

Aus dem pathologischen
Institut der Ludwig-Maximilians-
Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Frederick Klauschen

Experimentelle Etablierung einer Triplex-
Färbung der Biomarker CD3, FoxP3 und PD-L1
zur Charakterisierung histologischer und
molekularer Subtypen medullärer
Mammakarzinome

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität zu München

vorgelegt von
Svenja Elisabeth Fritsch
aus Marktredwitz
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Doris Mayr
Mitberichterstatter:	PD Dr. Dr. Ulrich Andergassen PD Dr. Rachel Würstlein
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	02.03.2023

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	X
Vorwort	XII
1 Einleitung	1
1.1 Tumorpathogenese.....	1
1.2 Epidemiologie	2
1.3 Mammakarzinome	5
1.3.1 Klassifikation Mammakarzinome	5
1.3.2 Risiko- und Schutzfaktoren	8
1.3.3 Klinische Symptomatik	9
1.3.4 Diagnose	9
1.3.5 TNM/Staging	10
1.3.6 Grading	12
1.4 Molekulare Marker von Mammakarzinomen	13
1.4.1 Östrogen-Rezeptor (ER)	14
1.4.2 Progesteron-Rezeptor (PR).....	15
1.4.3 Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)	15
1.4.4 Ki-67.....	16
1.4.5 Rezeptor-basierte molekulare Subgruppen von Mammakarzinomen.....	17
1.4.6 Genexpressionsanalyse	17
1.4.7 Marker der experimentellen Triplex-Färbung	18
1.5 Besonderheiten des medullären Mammakarzinoms	21
1.5.1 Makroskopisches Erscheinungsbild	21
1.5.2 Histologisches Erscheinungsbild	21
1.5.3 Therapie	22
1.5.4 Prognose des medullären Mammakarzinoms	25
1.6 Zielsetzung und Fragestellung.....	26

2	Material und Methoden	27
2.1	Patientenkollektiv	27
2.2	Untersuchungsmaterialien	27
2.3	Methoden	28
2.3.1	Grundlagen der Immunhistochemie	28
2.3.2	Durchführung der Triplexfärbung (CD3, FoxP3, PD-L1).....	29
2.3.3	Mikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte	30
2.3.4	Statistische Auswertung	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Auswertungen der Standardmarker (ER, PR, HER2, Ki-67)	37
3.2	Klassifizierung der medullären Mammakarzinome nach Rezeptor- basierten molekularen Subgruppen	38
3.3	Einteilung der medullären Mammakarzinome nach histologischem Subtyp.....	39
3.4	Überlebensstatus und Median der Überlebenszeit der Probandinnen	39
3.5	Marker der experimentellen Triplex-Färbung	42
3.5.1	CD3	42
3.5.2	FoxP3	46
3.5.3	PD-L1	51
3.6	Korrelationsanalyse – Parameter der Rezeptor-basierten Subgruppen, des Subtyps und der Parameter der Triplex-Färbung	56
3.7	Zusammenhänge zwischen den Parametern der Triplex-Färbung und den Parametern der Rezeptor-basierten Klassifikation	58
3.7.1	CD3 versus Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation	58
3.7.2	FoxP3 versus Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation	59
3.7.3	PD-L1 versus Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation	62
4	Diskussion	64
4.1	Fragestellung und experimenteller Kontext.....	64
4.2	Expression der Biomarker im Tumorgewebe	65
4.3	Zusammenhang der Biomarkerexpression mit der Rezeptor-basierten Klassifikation medullärer Mammakarzinome.....	70
4.4	Zusammenhang der Biomarkerexpression mit der histologischen Klassifikation medullärer Mammakarzinome.....	71
4.5	Tumormikroumgebung und Tumormikrozusammensetzung	74
4.6	Ausblick und Resümee	77

5	Literaturverzeichnis	84
6	Danksagung.....	121

Zusammenfassung

Mammakarzinome sind in Deutschland die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen. Entitäten, die bis 2019 histologisch als medulläre Mammakarzinome klassifiziert wurden, treten in nur rund 1 % der Neudiagnosen pro Jahr auf; sie kommen jedoch in einem deutlich jüngeren Alter vor als duktale, jetzt als Mammakarzinome of no special type (NST) bezeichnete, oder lobuläre Karzinome. Für die Therapieplanung werden Biopsien zum TNM-Staging, zum Grading, zur Rezeptorcharakterisierung und ggf. zur Genexpressionsanalyse entnommen.

An dieser Stelle setzt die hier vorliegende Arbeit an, um über zusätzliche Bestimmung von drei Biomarkern (Cluster of differentiation 3 (CD3), Forkhead Box Protein 3 (FoxP3), Programmed cell death ligand 1 (PD-L1)) im Tumorgewebe, weitere Prognosemuster und mögliche Therapieansätze, außerhalb der etablierten Routinemarkerbestimmungen, für die Zukunft zu schaffen. Die Umklassifikation der vormals eigenen Gruppe der medullären Mammakarzinome, nun als Unterteil der invasiven Mammakarzinome NST, durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahre 2019 fiel in die Experimentalphase dieser Arbeit. Für diese Abhandlung wurde die alte Einteilung aber beibehalten, weil genau jene medulläre Subgruppe von Brustkrebs hier im Mittelpunkt des Interesses lag.

Aus Biopsien von 70 Probandinnen mit medullärem Mammakarzinom der Kliniken der Ludwig-Maximilians-Universität München und der Frauenklinik München wurden neben den Standardbestimmungen bestehend aus histologischem Subtyp (typisch medulläre Mammakarzinome, atypisch medulläre Mammakarzinome, invasive Mammakarzinome NST mit medullären Eigenschaften) und der Rezeptor-basierten Klassifizierung (Östrogen-Rezeptor (ER), Progesteron-Rezeptor (PR), Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), Ki-67), die drei Biomarker CD3, FoxP3 und PD-L1 in einer neuen Triplex-Färbung gemeinsam angefärbt. Die CD3- und FoxP3-Expression wurde mit einem Immunreaktiven Score (IRS) und die PD-L1-Expression mit einem Immun-cell-(IC)-Score quantifiziert.

Die drei Biomarker wurden in allen Subtypen medullärer Mammakarzinome exprimiert. Aufgrund der vielen „Lost to Follow Up“ Fälle der einbezogenen Patientinnen waren keine detaillierten Untersuchungen zum Überleben möglich. Es waren aber keine offensichtlichen Zusammenhänge zwischen der medianen Überlebenszeit und den untersuchten Parametern erkennbar. Im Rahmen der Spearman-Korrelationsanalyse

wurde ein hochsignifikant positiver Zusammenhang zwischen der FoxP3- und PD-L1-Expression detektiert. Zusätzlich wurden positive Korrelationen des FoxP3-IRS und des PD-L1-IC-Scores zum Proliferationsmarker Ki-67 nachgewiesen. Tendenziell korrelierte auch die CD3- und FoxP3-Expression im medullären Mammagewebe.

Nach der alten histologischen WHO-Klassifizierung von 2012 bestand eine positive Korrelation zwischen der Subkategorie des typisch medullären Mammakarzinoms und der PD-L1-Expression. Außerdem waren typisch medulläre Mammakarzinome häufiger HER2- und PR-negativ.

Die vorliegende Analyse unterstreicht die Bedeutung des Immun-Checkpoint-Inhibitors PD-L1 zur Charakterisierung medullärer Mammakarzinome. Zudem scheint eine histologische Klassifizierung zusätzlich zur Rezeptor-basierten molekularen Klassifikation für die Prognosestellung bei medullären Mammakarzinomen sinnvoll.

Abkürzungsverzeichnis

+	positiv
AK	Antikörper
Aqua dest	destilliertes Wasser
BRCA	Breast-cancer early onset
CD	Cluster of Differentiation
DCIS	duktales Carcinoma in situ
ER	Östrogen-Rezeptor
FoxP3	Forkhead Box Protein 3
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
IBC-NST	Invasive breast carcinoma of no special type
IC	Immune Cell
ICI	Immun-Checkpoint-Inhibitor
IRS	immunreaktiver Score
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MRT	Magnetresonanztomographie
NSCLC	Non small cell lung carcinoma
NST	No special type
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
PR	Progesteron-Rezeptor
RT	Raumtemperatur
TILs	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TNBC	Triple negative breast cancer
Tregs	regulatory T cells
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGFA	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Inzidenz, Mortalität und Prävalenz bzw. Überlebensraten für maligne Erkrankungen der Brustdrüse in den Jahren 2015 und 2016 mit Prognose für 2020	3
Tabelle 2: Einteilung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von Mammakarzinomen 2012	6
Tabelle 3: Klassifikation invasiver Mammakarzinome nach der Einteilung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2019.....	7
Tabelle 4: Einteilung der Subklassifikationen Invasives Mammakarzinom ohne speziellen Typ (IBC-NST) gemäß der Richtlinie Weltgesundheitsorganisation (WHO) 2019	7
Tabelle 5: TNM Klassifikationen.....	11
Tabelle 6: Grading – Kriterien nach Elston und Ellis (links) und Differenzierungsgrade (rechts)	13
Tabelle 7: Rezeptor-basierte molekulare Subklassifizierung von Mammakarzinomen	17
Tabelle 8: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner – Bewertung der Färbeintensität und des Anteils positiver Zellen	34
Tabelle 9: Mediane Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Subtyp und von den Rezeptor-basierten Subgruppen	41
Tabelle 10: Mediane Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Mammakarzinom-Subtyp und vom Immunreaktiven Score (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression.....	42
Tabelle 11: Immunreaktiver Score (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression in den Rezeptor-basierten Subgruppen	43
Tabelle 12: Statistische Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Immunreaktiven Score (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression und der Zugehörigkeit zu den Rezeptor-basierten Subgruppen.....	44
Tabelle 13: Immunreaktiver Score (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression in den Mammakarzinom-Subtypen	45
Tabelle 14: Statistische Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Immunreaktiven Score (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression und der Zugehörigkeit zu den Mammakarzinom-Subtypen	46

Tabelle 15: Mediane Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Mammakarzinom-Subtyp und vom Immunreaktiven Score (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression.....	47
Tabelle 16: Immunreaktiver Score (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression in den Rezeptor-basierten Subgruppen	48
Tabelle 17: Statistische Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Immunreaktiven Score (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression und der Zugehörigkeit zu den Rezeptor-basierten Subgruppen	49
Tabelle 18: Immunreaktiver Score (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression in den Mammakarzinom-Subtypen	50
Tabelle 19: Statistische Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Immunreaktiven Score (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression und der Zugehörigkeit zu den Mammakarzinom-Subtypen.....	51
Tabelle 20: Mediane Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Mammakarzinom-Subtyp und vom Immun Cell Score (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression.....	52
Tabelle 21: Immun Cell Score (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression in den Rezeptor-basierten Subgruppen	52
Tabelle 22: Statistische Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Immun Cell Score (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression und der Zugehörigkeit zu den Rezeptor-basierten Subgruppen	54
Tabelle 23: Immun Cell Score (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression in den Mammakarzinom-Subtypen	54
Tabelle 24: Statistische Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Immun Cell Score (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression und der Zugehörigkeit zu den Mammakarzinom-Subtypen.....	56
Tabelle 25: Spearman-Korrelationsanalyse – Parameter der Rezeptor-basierten Subgruppen, des histologischen Subtyps und der Triplex-Färbung	57
Tabelle 26: Cluster of differentiation (CD3) Immune reactive Score (IRS) Werte in Abhängigkeit von der Expression der Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation – Kreuztabellen und statistische Zusammenhänge.....	58
Tabelle 27: Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Immune reactive Score (IRS) Werte in Abhängigkeit von der Expression der Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation – Kreuztabellen und statistische Zusammenhänge.....	60

Tabelle 28: Statistische Analyse des potentiellen Zusammenhangs zwischen den Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Immune reactive Score (IRS) Werten und dem Ki-67-Wert.....	61
Tabelle 29: Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Immun Cell (IC) Score Werte in Abhängigkeit von der Expression der Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation – Kreuztabellen und statistische Zusammenhänge.....	62
Tabelle 30: Statistische Analyse des potentiellen Zusammenhangs zwischen den Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Immun Cell (IC) Score Werten und dem Ki-67-Wert.....	63

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten (oben) und Sterberaten (unten) je 100.000 Frauen in den Mitgliedsstaaten der EU für 2011–2013	4
Abbildung 2: Altersstandardisierte Sterberate je 100.000 Frauen an Brustkrebs nach Bundesland, 2012–2014.....	8
Abbildung 3: Einteilungskategorien des TNM-Stagings	12
Abbildung 4: Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung eines medullären Mammakarzinoms	22
Abbildung 5: Flussdiagramm zur Mammakarzinombehandlung.....	25
Abbildung 6: Medulläres Mammakarzinom in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung ...	31
Abbildung 7: Progesteron- (A + B) und Östrogen- (C + D) Färbung eines medullären Mammakarzinoms	32
Abbildung 8: Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)- (A + B) und Ki-67- (C + D) Färbung eines medullären Mammakarzinoms	33
Abbildung 9: Triplex-Färbung eines medullären Mammakarzinoms – Anfärbung der CD3+-Zellen braun, der FoxP3+-Zellen blau und der PD-L1+ Zellen violett.....	35
Abbildung 10: Klassifizierung der Tumoren nach den Standardmarkern Östrogen-Rezeptor (ER), Progesteron-Rezeptor (PR), Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) und Ki-67 (n=70)	37
Abbildung 11: Klassifizierung der Tumoren nach den Rezeptor-basierten molekularen Subgruppen (n=70).....	38
Abbildung 12: Klassifizierung der Tumoren nach Subtyp (n=70)	39
Abbildung 13: Überlebensstatus am Ende der Erfassungsperiode	40
Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung des Immunreaktiven Scores (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression in den Rezeptor-basierten Subgruppen	43
Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung des Immunreaktiven Scores (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression in den Mammakarzinom-Subtypen	45
Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung des Immunreaktiven Scores (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression in den Rezeptor-basierten Subgruppen	48

Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung des Immunreaktiven Scores (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression in den Mammakarzinom-Subtypen	50
Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung des Immun Cell Scores (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression in den Rezeptor-basierten Subgruppen (0 = PD-L1-negativ, 1 = PD-L1-positiv).....	53
Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung des Immun Cell Scores (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression der Mammakarzinom-Subtypen (0 = PD-L1-negativ, 1 = PD-L1-positiv).....	55

Vorwort

Obwohl die Diagnose klassisch medulläres Mammakarzinom nur etwa 1% aller Mammakarzinome ausmacht, ist das mittlere Erkrankungsalter für medulläre Mammakarzinome mit 45-52 Jahren ungefähr 10 Jahre unter dem Durchschnittsalter für invasiv duktales Brustkrebs, nun als invasives Mammakarzinom of no special type (NST) klassifiziert, und trifft demnach die Patientinnen in einer Lebensphase in der sie wahrscheinlich beruflich und/oder sozial maximal eingebunden sind. Rund 26% dieser medullären Brusttumoren werden im Gegensatz zum, einstmals als invasiv duktales Mammakarzinom eingeordneten, invasiven Mammakarziom NST, sogar noch vor dem 35. Lebensjahr diagnostiziert [1].

Das bedeutet, ca. 700 Frauen bekommen in Deutschland pro Jahr die Neudiagnose medullärer Brustkrebs. Diese löst Unsicherheiten und Ängste aus und verändert den privaten, beruflichen und emotionalen Alltag der betroffenen Frauen und deren Familien grundlegend.

Auf Grund dessen beschäftigt sich die hier vorliegende Dissertation mit dieser überschaubar kleinen Subgruppe des Mammakarzinoms und deren Rezeptoreigenschaften. Dabei liegt bei diesen durchgeführten Experimenten ein Fokus auf den in der Brustkrebstherapie bedeutenden Rezeptoren (Östrogen-Rezeptor (ER), Progesteron-Rezeptor (PR), Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)) und diagnostischen/prognostischen Markern Cluster of differentiation 3 (CD3), Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) und Programmed cell death ligand 1 (PD-L1).

1 Einleitung

1.1 Tumorpathogenese

Malignitäten sind ein Charakteristikum multizellulärer Organismen und werden auch in einfachen Spezies (z. B. in Nesseltieren) gefunden [2–4]. Mit zunehmender Komplexität und Langlebigkeit steigt das Mutationsrisiko für einen Organismus bei Zellteilungen auch durch Akkumulation extrinsischer Faktoren. Die dabei entstehenden Zellvarianten können maligne Charakteristika entwickeln [2]. Während der Tumorentwicklung kommt es zu tiefgreifenden Veränderungen des Genoms (Mutationen in Onko- und Tumorsuppressorgenen, epigenetische Alterationen). Der maligne Phänotyp wird laut Hanahan und Weinberg auf zellulärer Ebene durch folgende Kennzeichen charakterisiert:

- Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren (evading growth suppressors)
- Vermeidung von körpereigenen Immunreaktionen (avoiding immune destruction)
- Unlimitiertes Replikationspotential (enabling replicative immortality)
- Tumorstimulierende begleitende Entzündung (tumor promoting inflammation)
- Gewebeinvasion und Metastasierung (activating invasion and metastasis)
- Fortwährende Angiogenese (inducing angiogenesis)
- Genomische Instabilität und Mutation (genome instability and mutation)
- Vermeidung von Apoptose (resisting cell death)
- Dysregulation der zellulären Energiekontrolle (deregulation cellular energetics)
- Fortwährende Proliferation (sustaining proliferative signaling)

Diese allgemeinen Malignitätscharakteristika kommen nicht in allen Tumoren gleichzeitig vor [5–7]. Das aus der Chaostheorie und Mathematik stammende Konzept eines komplexen und intervenierenden Systems kann auf natürliche Systeme (z. B. Immunsystem, neurale Netzwerke im Gehirn, Tumorentwicklung) übertragen werden [2, 8–10]. Die Komplexität bei der Tumorentwicklung ergibt sich daraus, dass maligne Zellen sich nicht nur durch ein verändertes Proliferationsverhalten auszeichnen, sondern besondere Charakteristika entwickeln, die auf spezifischen Veränderungen in ihren Genen und Signalwegen beruhen. Die Aufgabenteilung der Zelllinien in einem Tumor kann zum Therapieversagen und zur Rezidivbildung führen (siehe Kapitel 4). Außerdem wechselwirken Tumorzellen mit den Stromazellen in ihrer Umgebung und lösen beispielsweise Entzündungen aus. Tumorwachstum und Metastasierung sind somit

nicht ausschließlich eine Folge der endogenen Eigenschaften von Tumorzellen, sondern beruhen auf einem Zusammenspiel der Tumorzellen mit dem Tumorstroma bestehend aus normalen Zellen (z. B. Fibroblasten, Granulozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Lymphozyten) und der extrazellulären Matrix (ECM) [5–7].

Auch beim medullären Mammakarzinom bestimmt die Tumormikroumgebung die Prognose mit. Laut einer Theorie liegt beim (medullären) Mammakarzinom möglicherweise eine evolutionäre Fehlanpassung vor. Der nicht saisonal festgelegte monatliche Östrus, der eine frühe humane Entwicklung darstellt und im Tierreich unbekannt ist, bedeutet zwar einen Fruchtbarkeitsvorteil, aber auch ein erhöhtes Risiko für Mammakarzinome aufgrund des monatlich wiederkehrenden hormonbedingten proliferativen Stresses im Brust- und Ovarial-Gewebe. In ursprünglicheren Gesellschaftsformen wurde dieses Risiko durch schützende Faktoren wie frühe Schwangerschaften, langes Stillen der Kinder, eine vorwiegend frugale Diät und mehr körperliche Bewegung ausgeglichen [2, 11, 12].

1.2 Epidemiologie

Krebserkrankungen in Deutschland

Im Jahre 2020 sind laut einer Schätzung 275.000 Männer und 244.000 Frauen an Krebs neu erkrankt. 2016 erkrankten dagegen lediglich 258.520 Männer und 233.570 Frauen in Deutschland an Krebs; die krebsbedingten Sterbefälle lagen für beide Geschlechter zusammen bei 229.827. Von 1999–2013 sanken die Krebserkrankungsraten bei den über 75-Jährigen leicht, dafür stiegen sie im jungen Erwachsenenalter (15–44 Jahre) an. In allen Altersgruppen gehen die Sterberaten deutlich zurück, am stärksten jedoch bei den unter 55-Jährigen. Anfang der 1970er Jahre erkrankten in Deutschland nur halb so viele Menschen an Krebs wie heute. Dennoch hat die Zahl der Krebssterbefälle nur geringfügig zugenommen und ist bei Frauen seit Mitte der 1990er Jahre etwas rückläufig [13].

Brustkrebserkrankungen in Deutschland und Europa

2016 wurde bei 68.950 Frauen und bei 710 Männern eine Malignität der Brustdrüse diagnostiziert (siehe Tabelle 1). Unter den Mammakarzinom-bedingten Sterbefällen waren 18.570 Frauen und 166 Männer.

Tabelle 1: Inzidenz, Mortalität und Prävalenz bzw. Überlebensraten für maligne Erkrankungen der Brustdrüse in den Jahren 2015 und 2016 mit Prognose für 2020 [14]

Inzidenz	2015		2016		Prognose für 2020	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Neuerkrankungen	69.630	600	68.950	710	69.700	750
rohe Erkrankungsrate ¹	167,7	1,5	165,2	1,7	167,6	1,8
standardisierte Erkrankungsrate ^{1,2}	113,7	1,0	112,2	1,1	110,4	1,1
mittleres Erkrankungsalter ³	64	72	64	72		
Mortalität	2015		2016		2017	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Sterbefälle	18.136	159	18.570	166	18.401	192
rohe Sterberate ¹	43,7	0,4	44,5	0,4	43,9	0,5
standardisierte Sterberate ^{1,2}	23,0	0,2	23,4	0,3	22,9	0,3
mittleres Sterbealter ³	75	75	75	75	76	77
Prävalenz und Überlebensraten	5 Jahre		10 Jahre			
	Frauen	Männer	Frauen	Männer		
Prävalenz	313.500	2.600	584.900	4.200		
absolute Überlebensrate (2015–2016) ⁴	79 (78–82)	62	66 (65–69)	46		
relative Überlebensrate (2015–2016) ⁴	87 (86–90)	77	82 (81–86)	72		

¹ je 100.000 Personen ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung ³ Median ⁴ in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

Brustkrebs stellt in Deutschland bei Frauen mit rund 69.000 Neuerkrankungen jährlich die häufigste Krebserkrankung dar. Bei ca. 6000 Patientinnen wird jedes Jahr zudem ein Carcinoma in situ festgestellt. Damit erhält eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens eine Mammakarzinom-Diagnose. Bei der Erstdiagnose sind drei von zehn Patientinnen jünger als 55 Jahre. In den neuen Bundesländern sind die Neuerkrankungs- und Sterberaten nach wie vor niedriger als in den alten Bundesländern, lediglich bei Frauen unter 55 Jahren gleichen sich die Raten an.

Frauen ab 30 Jahren steht im Rahmen des Brustkrebsfrüherkennungsprogrammes eine jährliche Tastuntersuchung beim Gynäkologen zu [14]. Im Alter von 50 bis 69 Jahren haben sie in zweijährigen Abständen die Möglichkeit, eine Röntgenuntersuchung der Brust durchführen zu lassen (Mammographie-Screening). Diese Brustkrebsfrüherkennungsmaßnahme wurde zwischen 2005 und 2009 im deutschen Gesundheitswesen eingeführt. Die daraus folgende frühere Diagnosestellung von Mammakarzinomen führte zu einem kurzfristigen Anstieg der Erkrankungsraten, die aber anschließend wieder zurückgingen [13].

45 % der Mammakarzinom-Neuerkrankungen betreffen die Screening-Altersgruppe. Dagegen manifestiert sich das medulläre Mammakarzinom etwa 10 Jahre früher als das invasiv duktales Karzinom, heute Mammakarzinom NST genannt [1]. Auch werden

bei Patientinnen (50–69 Jahre), die ins Screening-Programm fallen, meist Frühstadien der Karzinome (in-situ und Stadium I) diagnostiziert. Ein Anzeichen des Erfolgs des Screenings ist die abnehmende Zahl an Diagnosen in fortgeschrittenen Stadien [13]. Zusammenfassend wurde durch das Mammographie-Screening die krebspezifische Mortalität um ca. 10 % reduziert [15].

Die Inzidenz von Mammakarzinomen zeigt in Europa ein deutliches Ost-West-Gefälle, mit um die Hälfte niedrigeren Raten in osteuropäischen Ländern (z. B. Ungarn, Polen, Bulgarien). Auch südeuropäische Länder, wie Spanien, Portugal und Griechenland, zeigen niedrigere Inzidenzen. Die Inzidenz in Deutschland liegt knapp über dem EU-Wert (siehe Abbildung 1, oben). Auch bei der Mortalität liegt Deutschland leicht über dem EU-Durchschnitt; allgemein sind die Ost-West-Unterschiede weniger deutlich als bei der Inzidenz. Die geringsten Sterberaten gibt es in Spanien, Portugal, Schweden und Finnland (siehe Abbildung 1, unten) [13].

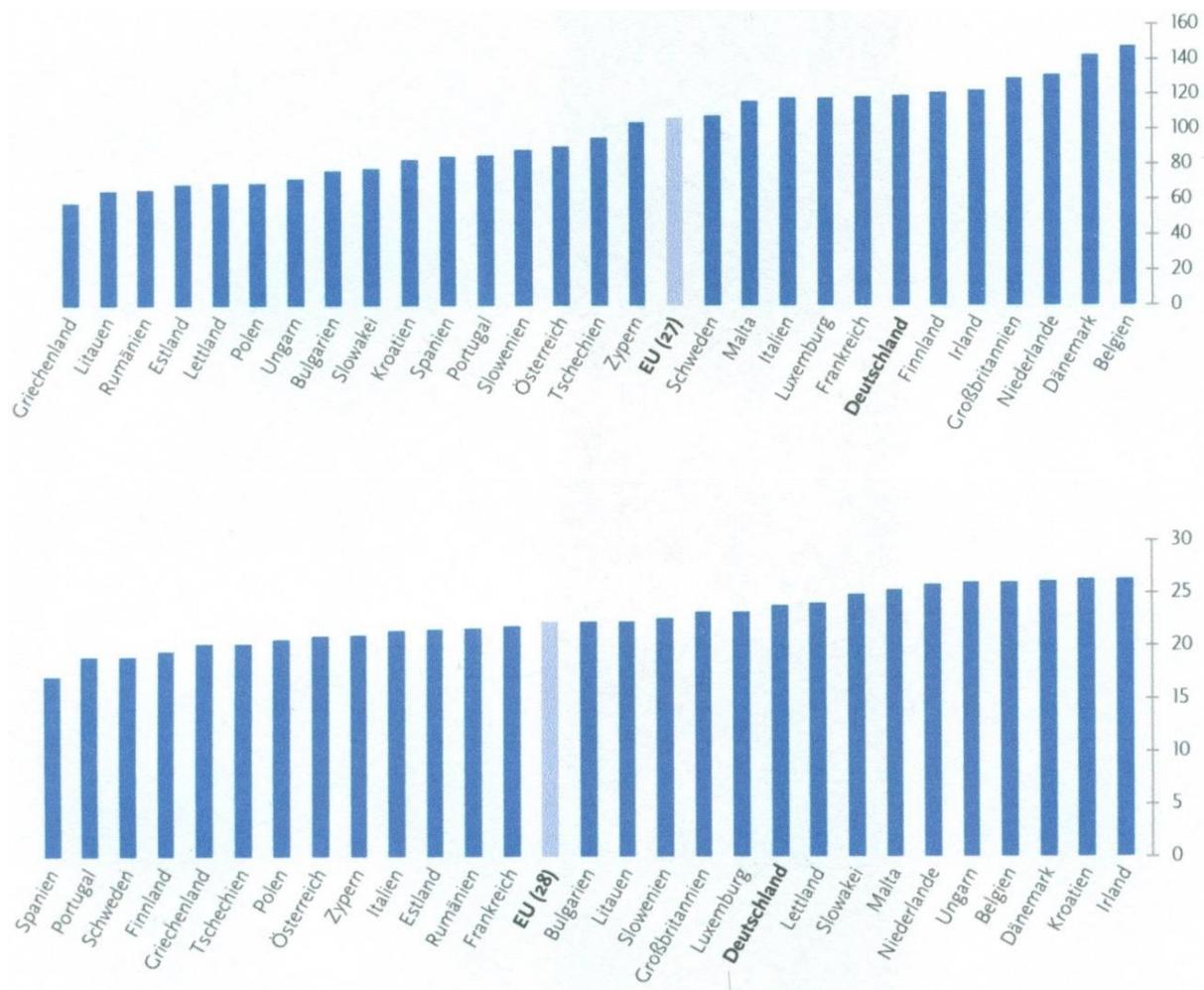


Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten (oben) und Sterberaten (unten) je 100.000 Frauen in den Mitgliedsstaaten der EU für 2011–2013 [13]

Epidemiologie des medullären Mammakarzinoms

Wie beschrieben, erfolgt die Erstdiagnose beim medullären Mammakarzinom häufiger bei jüngeren Frauen (45–52 Jahre) als beim vormals invasiv duktalem Karzinom. Rund 26 % der Betroffenen sind jünger als 35 Jahre. Insgesamt umfasst diese histologische Untergruppe des Mammakarzinoms weniger als 1 % aller Brustkrebsfälle; höhere Werte resultieren daraus, dass atypisch medulläre Karzinome und/oder invasive Mammakarzinome No special type (NST) mit medullären Eigenschaften hinzugezählt werden [1].

In der vorliegenden Dissertation wurden die drei histologischen Untergruppen des medullären Mammakarzinoms untersucht. Während der Durchführung der Experimente erfolgte eine Neueinteilung der medullären Mammakarzinome (siehe Kapitel 1.3.1).

1.3 Mammakarzinome

1.3.1 Klassifikation Mammakarzinome

Histologisch dominierte das invasiv duktales Mammakarzinom, jetzt invasives Mammakarzinom NST, gefolgt vom invasiv lobulären Karzinom, dem tubulären und muzinösen Karzinom und schließlich dem medullären Karzinom [16]. Hierbei handelt es sich um die alte Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2012 (siehe Tabelle 2). Die neue WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2019 (siehe Tabelle 3) wurde Mitte 2020 – in der Experimentphase der hier gemachten Studie – publiziert. Die entsprechenden Unterschiede dieser Klassifizierungen sind in den untenstehenden Grafiken verdeutlicht. In der vorliegenden Abhandlung wurden die drei medullären Subtypen nach der WHO-Klassifikation 2012 analysiert, da diese medulläre Gruppe auch in der neuen Einteilung nicht verschwunden ist, sondern unter dem neuen Namen der Mammakarzinome NST weiter existiert.

Tabelle 2: Einteilung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von Mammakarzinomen 2012 [1]**Invasives Mammakarzinom**

- Invasives Mammakarzinom ohne speziellen Typ (NST)
- Invasives lobuläres Mammakarzinom
- Tubuläres Mammakarzinom
- Kribriiformes Mammakarzinom
- Muzinöses Mammakarzinom
- Mammakarzinom mit medullären Eigenschaften**
 - Medulläres Mammakarzinom**
 - Atypisches medulläres Mammakarzinom**
 - Invasives Mammakarzinom NST mit medullären Merkmalen**
- Mammakarzinom mit apokriner Differenzierung
- Mammakarzinom mit Siegelringzellen
- Invasives mikropapilläres Mammakarzinom
- Metaplastisches Mammakarzinom NST
- Gemixtes metaplastisches Mammakarzinom
- Myoepitheliales Mammakarzinom

Karzinome, die bis 2019 als Mammakarzinome mit medullären Eigenschaften klassifiziert wurden, werden in der neuen Klassifikation der Gruppe der invasive breast carcinoma of no special type (IBC-NST) zugeordnet (siehe Tabelle 4). IBC-NST mit medullärer Struktur bedeutet, dass sie alle bestimmte Charakteristika, wie immunreaktive Mikroumgebung, Triplenegativität und Assoziation mit der Breast-cancer early onset (BRCA) 1 Mutation, mitbringen (siehe auch Kapitel 1.4.6.). Diese Karzinome werden als Teil des tumor-infiltrierenden lymphozytenreichen Brustkrebspektrum angesehen. Unbewusst wurde deshalb vor 2019 genau jene Gruppe als „medullär“ klassifiziert [17].

Tabelle 3: Klassifikation invasiver Mammakarzinome nach der Einteilung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2019 [17]

Klassifikation invasiver Mammakarzinome (WHO 2019)	
<ul style="list-style-type: none"> • Invasives Mammakarzinom ohne speziellen Typ/NST • Mikroinvasives Mammakarzinom • Lobuläres Karzinom • Tubuläres Karzinom • Kribriiformes Karzinom • Muzinöses Karzinom • Muzinöses Zystadenokarzinom • Invasives mikropapilläres Karzinom • Karzinom mit apokriner Differenzierung • Metaplastisches Karzinom 	
<p>Seltene und speicheldrüsenartige Tumoren („salivary gland-type“):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Azinuszellkarzinom • Adenoid-zystisches Karzinom • Sekretorisches Karzinom • Mukoepidermoides Karzinom • Polymorphes Adenokarzinom • Tall-Cell-Karzinom mit reversibler Polarität (TCCREP) 	

Tabelle 4: Einteilung der Subklassifikationen Invasives Mammakarzinom ohne speziellen Typ (IBC-NST) gemäß der Richtlinie Weltgesundheitsorganisation (WHO) 2019 [17]

IBC-NST Einteilung

- IBC-NST mit medullärer Struktur
- IBC-NST mit neuroendokriner Differenzierung
- IBC-NST mit osteoklast-ähnlichen stromalen Riesenzellen
- IBC-NST mit pleomorpher Struktur
- IBC-NST mit chorionkarzinomatöser Struktur
- IBC-NST mit melanotischer Struktur
- IBC-NST mit onkozytomatischer Struktur
- IBC-NST mit lipidreicher Struktur
- IBC-NST mit glykogenreicher klarer Zellenstruktur
- IBC-NST mit talgartiger Struktur

1.3.2 Risiko- und Schutzfaktoren

Neben einer frühen Menarche und einer späten Menopause werden auch lebensstilbezogene Faktoren (z. B. Übergewicht, hoher Alkoholkonsum, mangelnde Bewegung) und medizinische Parameter (z. B. länger andauernde Hormonersatztherapie, Verwendung von Kombinationspräparaten (Östrogen/Progesteron) zur Verhütung) als Risikofaktoren für Mammakarzinome beschrieben [13]. Weitere Risikofaktoren sind eine Strahlentherapie des Brustkorbs im Kinder- und Jugendalter, ein sehr dichtes Brustgewebe, bestimmte gutartige Brustveränderungen (z. B. Cytosarcoma phylloides) oder eine vorangegangene Brustkrebserkrankung. In geringerem Ausmaß gehört auch Rauchen dazu [14, 18].

Frühe und mehrfache Schwangerschaften und damit einhergehende lange Stillzeiten werden dagegen als schützend angesehen. Das niedrigere Alter der Frauen bei der Geburt des ersten Kindes und eine insgesamt höhere Geburtenrate in der ehemaligen DDR gelten als Gründe für die Brustkrebssterblichkeitsunterschiede (siehe Abbildung 2) zwischen alten und neuen Bundesländern [13].

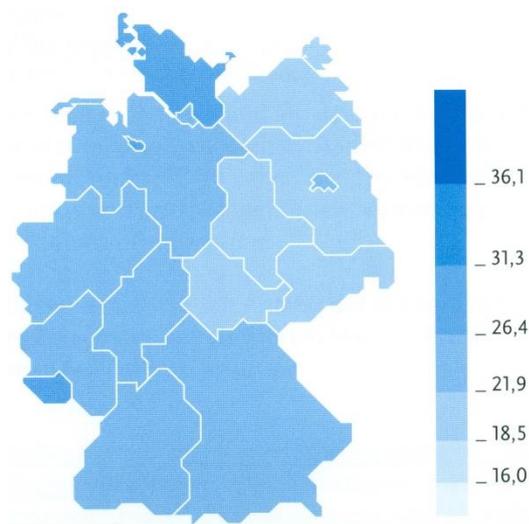


Abbildung 2: Altersstandardisierte Sterberate je 100.000 Frauen an Brustkrebs nach Bundesland, 2012–2014 [13]

Ab dem 50. Lebensjahr einer Frau spielt auch der Vitamin-D-Status für das Mammakarzinom-Risiko eine Rolle. Laut der dänischen Krebsgesellschaft fördert ein Vitamin-D-Mangel nicht nur die Osteoporose, sondern erhöht auch das Krebsrisiko, da das Vitamin an der Regulation des Zellwachstums beteiligt ist [19].

Der wichtigste Risikofaktor ist jedoch ein fortgeschrittenes Alter [20–22]. Ein frühes Alter bei der Erstdiagnose von Brustkrebs stellt wiederum einen Risikofaktor für Rezidive und den Tod dar [23–27].

1.3.3 Klinische Symptomatik

Ein tastbarer Knoten in der Brust ist meist das erste klinische Symptom von Mammakarzinomen. Weiter können Hautretraktionen, Mamilleninversionen, Absonderungen aus der Brustwarze und/oder Größen-, Farb-, Textur- und Umrissveränderungen der Brust auftreten. Extreme Fälle zeigen zudem Ulzerationen, Erytheme und Ödeme. In seltenen Fällen präsentiert sich ein Mammakarzinom nur durch eine Vergrößerung der axillären Lymphknoten, ohne pathologische Veränderungen an der Brust selbst. Da diese Symptome auch durch benigne Krankheiten der Brust hervorgerufen werden können, ist eine exakte Diagnose erforderlich [1, 17]. Im Zuge der gesetzlichen Früherkennung wird in Deutschland Frauen ab 30 Jahren im 2-Jahres-Intervall eine Mammauntersuchung mit Inspektion und Palpation inklusive des Brustlymphabflussgebietes beim Gynäkologen angeboten [28, 29].

1.3.4 Diagnose

Mammographie: Wie erwähnt, wird Frauen von 50–69 Jahren in Deutschland eine Mammographiekontrolle der Brust alle zwei Jahre im Mammakarzinom-Früherkennungsprogramm angeboten [13, 28]. Obwohl der Altersgipfel bei der Neudiagnose medullärer Mammakarzinome nicht mit dem Alter der Mammographiescreeningberechtigten Frauen übereinstimmt wird diese Diagnosemethode hier erwähnt, da sie ungeachtet davon, ob ein Knoten oder eine pathologische Brustveränderung durch eine klinische Präsentation gesichert ist oder im Rahmen des Screenings entdeckt wird, den ersten Diagnoseschritt nach einer Anamnese und einer klinischen Brustuntersuchung mit Inspektion und Palpation darstellt [1, 20–22, 29–34]. Da die aktualisierte europäische Brustkrebsleitlinie der EU-Kommission eine Empfehlung zur Mammographie für Frauen von 45–74 Jahre enthält, ist in Deutschland mit entsprechenden Veränderungen im nationalen Mammographieprogramm zu rechnen [35].

Sonographie: Die Mammasonographie wird bei hoher mammographischer Dichte eingesetzt, um den klinischen und mammographischen Befund zu vervollständigen [29, 36–38]. Weiter dient die Sonographie der Abklärung unklarer Mammographie- bzw. Magnetresonanztomographie-(MRT)-Ergebnisse der Mamma der Kategorien 0, III, IV und V,

nicht aber als alleinige Diagnosemethode [29, 36–41]. Besonderen Mehrwert hat die Sonographie bei der Unterscheidung zwischen soliden und zystischen Prozessen, um beim Vorliegen einer Zyste eine Biopsie zugunsten einer Punktion zu vermeiden [42].

Biopsie: Die histologische Abklärung der Diagnose bzw. die Einordnung des Mammakarzinoms sollte auch bei primär mit Mammographie und/oder MRT gesicherten Befunden via sonographisch gesteuerter Stanzbiopsie erfolgen [29, 43]. Bei fehlendem Herdbefund aber vorliegendem Mikrokalk wird die stereotaktische Vakuumbiopsie empfohlen [29, 43]. Lediglich in Ausnahmefällen steht die primäre, offene diagnostische Exzisionsbiopsie zur Verfügung [29, 43, 44].

Magnetresonanztomographie: Der Einsatz der MRT zur Diagnosestellung wird derzeit ausschließlich bei Patientinnen empfohlen, bei denen Untersuchungen mit konventioneller Mammographie, Sonographie und perkutaner Biopsie keine eindeutigen Befunde erbracht haben [29, 45]. Bei einem diagnostizierten Mammakarzinom wird eine MRT nur in begründeten Fällen prätherapeutisch durchgeführt [29, 46–48]. Laut einer multizentrischen, randomisierten, kontrollierten Studie aus den Niederlanden [49] hat die MRT einen signifikanten Mehrwert bei Patientinnen mit extrem dichtem Brustgewebe.

Tomosynthese: Eine vielversprechende Diagnosemethode, die in Zukunft als ergänzendes Screening in Betracht kommt, ist die digitale Brust Tomosynthese (DBT). Während die konventionelle Mammographie mit Röntgenstrahlen nur in zwei Ebenen arbeitet, durchleuchtet bei der Tomosynthese eine sich drehende Röntgenquelle aus verschiedenen Winkeln das Brustgewebe. Später werden diese Aufnahmen im Computer zu einem 3D-Modell zusammengeführt. Laut dem prospektiven populationsbasierten Malmö Breast Tomosynthesis Screening Trial (MBTST) besitzt dieses Verfahren eine höhere Sensitivität als die Mammographie [51–53].

1.3.5 TNM/Staging

Zur Bestimmung des Primärtumorstadiums hat sich das TNM-System etabliert. Hierbei steht der Buchstabe T für die Tumorgröße, N für die befallenen Lymphknoten und M für Metastasen (siehe Tabelle 5). Die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) hat die Kriterien zur besseren Übersicht in Stadien zusammengefasst. Die unterschiedlichen Stadien beeinflussen die Therapieplanung und Prognose (siehe Kapitel 1.5.3). Das Staging richtet sich vornehmlich nach der Größe des Tumors und berücksichtigt, ob und wie weit sich der Krebs vom primären Krankheitsherd in der Mamma

ausgebreitet hat (siehe Abbildung 3). Meist erfolgt das Staging nach der operativen Entfernung des Tumors und der Untersuchung der Lymphknoten [54, 55].

Tabelle 5: TNM Klassifikationen [16]

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
0	Tis	N0 (keine)	M0
I	T1mic	N0	M0
	T1a (1 - 5 mm)	N0	M0
	T1b (6 - 10 mm)	N0	M0
	T1c (11 - 20 mm)	N0	M0
IIA	T0, T1mic, T1	N1 (1-3 LK in der Axilla und/oder der ipsilateralen Mammaria-Interna-Region)	M0
	T2 (21- 50 mm)	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3 (≥ 51 mm)	N0	M0
IIIA	T0, T1mic, T1, T2	N2 (4-9 LK in der Axilla)	M0
	T3	N1	M0
IIIB	T4 (Infiltration der Brustwand und/oder der Haut, und/oder ipsilaterale Satellitenmetastasen und/oder inflammatorisches Mammakarzinom)	N0 - 2	M0
IIIC	alle T	N3 (≥ 10 LK n der Axilla und/oder Befall infra- oder supra-klavikulärer LK)	M0
IV	alle T	alle N	M1 (Metastasen außerhalb der Brust und der benachbarten LK-Regionen)

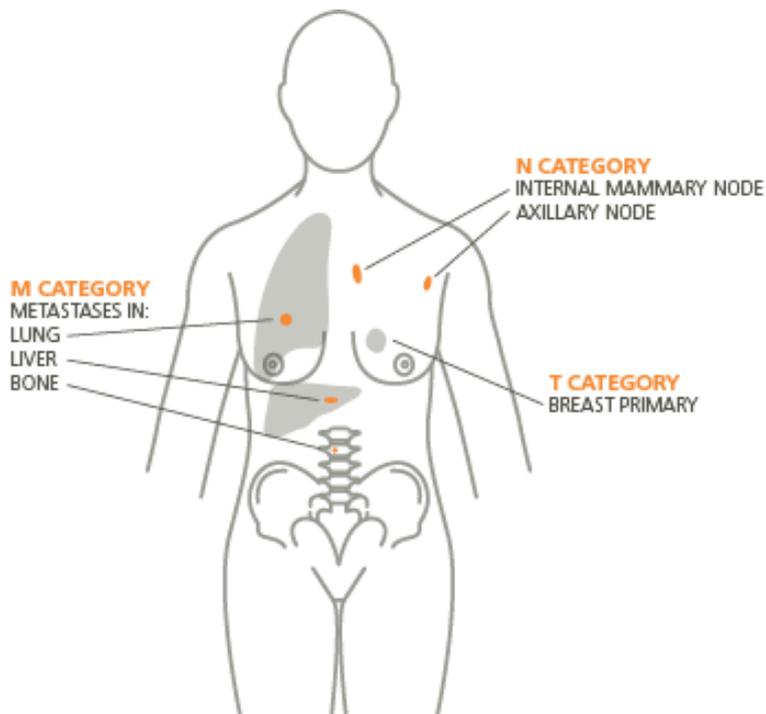


Abbildung 3: Einteilungskategorien des TNM-Stagings [55]

1.3.6 Grading

Das aktuelle histopathologische Grading von Tumorgewebe basiert auf dem System von Bloom, Richards und Scarff, das zur besseren Handhabung von Elston und Ellis [56, 57] modifiziert wurde. Die Abweichung des histologischen Differenzierungsgrads einer Gewebeprobe vom physiologischen Gewebebild erlaubt Rückschlüsse auf die Malignität und Prognose eines malignen Tumors. Unterschieden werden drei histologische Grade (manchmal auch vier). Lässt sich der Differenzierungsgrad nicht beurteilen, wird das Ergebnis mit „G9“ angegeben. Zu den Kriterien des Gradings gehören die Tubulus- und Drüsenbildung im Tumorgewebe, nukleäre Pleomorphien und die Anzahl der Mitosefiguren (siehe Tabelle 6). Die genannten Parameter weisen auf eine schlechtere Differenzierung, einen höheren histologischen Grad und eine schlechtere Prognose hin. Medulläre Mammakarzinome zeigen jedoch Abweichungen von dieser Regel (siehe Kapitel 1.5.4). Der Score (Zahlenwert) beim Grading gibt demnach an, inwieweit sich die Tumorzellen aus einer Biopsie im Aussehen und Wachstumsmuster von normalen Brustgewebezellen unterscheiden. Bei einer vierstufigen Einteilung ist bei G4 eine Zuordnung zum Ausgangsgewebe nicht mehr möglich.

Tabelle 6: Grading – Kriterien nach Elston und Ellis (links) [1, 56] und Differenzierungsgrade (rechts) [55]

Feature	Score
Tubule and gland formation	
Majority of tumour (> 75%)	1
Moderate degree (10–75%)	2
Little or none (< 10%)	3
Nuclear pleomorphism	
Small, regular uniform cells	1
Moderate increase in size and variability	2
Marked variation	3
Mitotic counts	
Dependent on microscope field area	1–3
Final grading	
Add scores for gland formation, nuclear pleomorphism and mitotic count:	
Grade 1	Total score, 3–5
Grade 2	Total score, 6 or 7
Grade 3	Total score, 8 or 9

Grading	Differenzierung des malignen Gewebes
G1	Gute/hohe Differenzierung mit hoher Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe
G2	Mäßige Differenzierung
G3	Schlechte/niedrige Differenzierung
G4	Undifferenziertes Gewebe
G9	Grad der Differenzierung ist nicht zu beurteilen

1.4 Molekulare Marker von Mammakarzinomen

Bei der Neudiagnose eines Mammakarzinoms werden in der Regel verschiedene Rezeptoren im Tumorgewebe analysiert. Die Untersuchungen erfolgen an Gewebematerial, das bei einer Biopsie oder Tumorentfernung gewonnen wurde. Diese biologischen Tumormarker (z. B. Rezeptoren) helfen dabei, die Malignität des Tumors und damit die Prognose für die Patientin abzuschätzen und erlauben eine individuelle zielgerichtete Therapie der Patientin [58].

Zu den wichtigsten Markern zählen die Rezeptoren für Östrogen (ER) und Progesteron (PR). Diese Hormone können das Wachstum von Brustkrebszellen fördern, indem sie nach Bindung an ihre Rezeptoren ein Wachstumssignal initiieren. Zur Bestimmung der Hormonabhängigkeit des Wachstums eines Mammakarzinoms wird die Anzahl Rezeptor-positiver Zellen und die Anzahl der Hormonrezeptoren pro Zelle bestimmt. Tragen mehr als ein Prozent aller Tumorzellen spezifische Rezeptoren gilt der Tumor als hormonempfindlich und wird als ER-positiv (ER+) und/oder PR+ bezeichnet.

Das Wachstum hormonabhängiger Tumorzellen lässt sich durch Hormonentzug verlangsamen oder stoppen. Ist eine (Anti-)Hormontherapie bzw. endokrine Therapie möglich, kann eventuell auf eine für die Patientin belastende Chemotherapie verzichtet werden [58].

Grann et al. schätzten den Überlebensvorteil aufgrund zielgerichteter Therapien von Patientinnen mit ER+- und/oder PR+-Tumoren auf rund 10 % im Vergleich zu Patientinnen mit ER-/PR-negativen Tumoren. Dieser Überlebensvorteil beruht darauf, dass ER-/PR-negative Tumoren höhere Proliferationsraten und mehr Zellen in der S-Phase aufweisen und damit eine kleinere Wahrscheinlichkeit haben, auf Hormontherapien anzusprechen [59–77]

1.4.1 Östrogen-Rezeptor (ER)

Das Steroidhormon Östrogen beeinflusst bei der Frau die Bildung und Entwicklung der Geschlechtsorgane (z. B. Aufbau einer neuen Schleimhaut im Uterus im Rahmen des Zyklus, sowie Stärkung des Dickenwachstums der Uterusmuskulatur). In der Zervix fördern Östrogene die Zunahme und die Spinnbarkeit des Zervixsekrets und die Abnahme der Viskosität des Zervixschleims. Ebenso löst Östrogen eine Proliferation des Vaginalepithels und des Brustdrüsengewebes aus. Die geschlechtsspezifischen Merkmale von Frauen (z. B. Klang der Stimme, Verteilungsmuster des subkutanen Fettgewebes) unterliegen ebenfalls der Östrogen-Kontrolle. Bei Männern und Frauen fördert Östrogen das Skelettwachstum über die Stimulation von Osteoblasten und schützt so vor Arteriosklerose und Osteoporose. Östrogene werden hauptsächlich in den Ovarien und in den Granulosazellen der Ovarienfollikel gebildet, aber auch in der Plazenta und in den Nebennieren bzw. bei Männern in den Hoden. In geringerem Ausmaß ist das Muskel-, Nerven- und Fettgewebe an der Östrogen-Produktion beteiligt.

Die Gruppe der Östrogene umfasst verschiedene Vertreter wie Östradiol, Östratriol und Östron. Im Blut wird Östrogen an Plasmaproteine (Sexualhormon-bindendes-Protein (SHBG)) bzw. an Albumin gebunden transportiert [78]. Humane Zellen exprimieren zwei ER (ER α und ER β). ER α kommt vornehmlich in Ovar-, Mamma-, Vagina-, Cervix-, Uterus-, Leber- und Hypophysengewebe sowie in der Herz- und Skelettmuskulatur vor; ER β dagegen in der Prostata, im Zentralen Nervensystem (ZNS) sowie im Hoden-, Lungen, Urogenitaltrakt- und Ovargewebe [79–81]. Laut Gronemeyer et al. stimuliert ER α als aktivierender Faktor nach Bindung von Östradiol-17 β Mammakarzinom-Zellen zur Proliferation, während der aktivierte ER β eher anti-proliferative Effekte hat und somit die Auswirkungen von ER α abmildert [82–83].

Beispielsweise ist Tamoxifen ein hormonantagonisierendes Medikament bei Östrogen-abhängigen Mammakarzinomen. Tamoxifen verhindert bzw. verlangsamt das

Wachstum dieser Karzinome durch Bindung an den ER und wird als adjuvantes Therapeutikum zusammen mit Zytostatika verwendet [78].

1.4.2 Progesteron-Rezeptor (PR)

Progesteron ist ein Zwischenprodukt der Synthese weiterer Steroidhormone und der wichtigste Vertreter der Gestagene. Gebildet wird Progesteron im Corpus luteum des Ovars und in der Plazenta.

Im weiblichen Organismus fördert Progesteron beim monatlichen Zyklus den Anstieg der Körpertemperatur um 0,4–0,6 °C und steigert zusammen mit Östrogenen die Proliferations- und Sekretionsbereitschaft der Alveoli der Brustdrüsen. Außerdem bereitet Progesteron die Uterusschleimhaut auf die Einnistung der befruchteten Eizelle vor, indem es das Drüsenwachstum (Sekretionsphase) sowie die Einlagerung von Glykogen in die Stromazellen der Schleimhaut stimuliert und den Tonus des Myometriums absenkt. Nach der Ovulation bewirkt Progesteron in der Zervix die Schließung des Muttermunds sowie eine Mengenabnahme und eine verminderte Spinnbarkeit bzw. höhere Viskosität des Zervixschleims. Bei einer fehlenden Befruchtung nach der Ovulation führt der Progesteron-Abfall zu degenerativen Veränderungen, welche die Menstruation nach sich ziehen. Bei einer Befruchtung der Eizelle unterstützt Progesteron die Nidation und die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft. Ein Absinken des Progesteron-Spiegels hat einen Schwangerschaftsabbruch zur Folge. Wie Östrogen wird Progesteron im Blut an ein Protein (Transcortin) gebunden transportiert.

Im Gegensatz zu Östrogen wirkt Progesteron über einen einzigen PR, welcher wie der ER Wachstumssignale an Tumorzellen sendet [78]. Beim PR existieren zwei weitgehend identische Isoformen; dem PRA fehlen jedoch am N-Terminus 164 Aminosäuren, wodurch diese Isoform kürzer ist als PRB. Im gesunden (Brust-) Gewebe liegen beide Isoformen in gleichem Mengenverhältnis vor. Die Transformation zu malignem Gewebe wird von einem zunehmenden Missverhältnis zwischen PRA und PRB begleitet. Laut Mote et al. entsteht hier häufig eine PRA-Dominanz [84–87].

1.4.3 Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)

Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an den transmembranen HER2 wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, welche die Zelle zur Teilung und Differenzierung anregt. Dieser Vorgang ist für die normale Entwicklung und das Wachstum des Mammagewebes essentiell. Der HER2 wird nahezu in allen Zelltypen mit Ausnahme

von Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert. Eine erhöhte HER2-Expression wird mit Malignität und einer schlechteren Prognose beim Mammakarzinom in Verbindung gebracht. Eine vermehrte Synthese des Onkoproteins HER2 betrifft 25–30 % aller Brustkrebspatientinnen.

Eine hohe HER2-Dichte auf der Zelloberfläche von Mammakarzinomen geht mit einem schnelleren Tumorwachstum, einem aggressiveren Verlauf der Krebserkrankung und einer reduzierten Wirksamkeit einer Tamoxifen-Therapie einher. Gezielte, gegen HER2 gerichtete Therapeutika (z. B. Herceptin) blockieren den Rezeptor und hemmen so das Zellwachstum. Dadurch verbessert sich die schlechtere klinische Prognose für HER2+-Tumoren (kürzeres krankheitsfreies Überlebensintervall und geringeres Gesamtüberleben) [58, 78, 88–114]. Diverse Studien belegen, dass der HER2-Status häufig positiv mit dem ER-Status verknüpft ist; besonders groß ist die Korrelation bei Patientinnen mit genetisch betrachtet orientalischen Wurzeln [88, 115–119].

Die zielgerichtete adjuvante Behandlung für HER2+-Tumoren erfolgt mit einem monoklonalen Antikörper (AK) (Trastuzumab, Handelsname Herceptin), der über die Blockade des Rezeptors das Wachstum des Tumors und die Angiogenese in den Tumormetastasen hemmt. Bei einer Kombination mit anderen antineoplastischen Behandlungen zeigt Trastuzumab einen synergistischen Effekt [78, 105, 107, 120–125].

1.4.4 Ki-67

Bei Ki-67 handelt es sich nicht um einen Rezeptor. Das Protein wird aber in der Tumorbio­logie als Marker für sich teilende Zellen verwendet. Ki-67 wird in den aktiven G(1)-, S-, G(2)- und M-Phasen des Zellzyklus exprimiert, ist aber in der G(0)-Phase von ruhenden Zellen nicht nachweisbar, da es in der Interphase im Zellkern gelagert wird. Deswegen markiert die Ki-67-Färbung im Tumorgewebe die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation. Der Ki-67-Nachweis wird zur Bestimmung molekularer Subgruppen von Mammakarzinomen standardmäßig eingesetzt [126–128]. Beim Grading von Mammakarzinomen stellt der Ki-67-Nachweis neben der Tubulusformation und dem nukleären Pleomorphismus ein Kriterium dar. Der Ki-67-Status bestimmt mit, ob eine additive Chemotherapie und/oder eine endokrine Therapie für Hormonrezeptor-positive Mammakarzinome sinnvoll ist. Je höher der Ki-67-Index ist, umso schlechter ist die Prognose und der klinische Verlauf. Laut einer etablierten histologischen Klassifikation wird die Ki-67-Expression in niedrig (<10 % der Zellen), mittel (10–25 % der Zellen) und hoch (>25 % der Zellen) eingeteilt.

Die Ki-67-Expression ist in malignem Gewebe gegenüber gesundem Gewebe signifikant erhöht. Ein hoher Ki-67-Index korreliert mit einer niedrigen Differenzierung des Gewebes, einer höheren Metastasierungsrate und einem höheren Staging des Tumors. Manche Wissenschaftler halten Ki-67 für einen unabhängigen Prognosefaktor für das Überleben der Patientin und/oder dem Auftreten von Rezidiven [29, 126–140].

1.4.5 Rezeptor-basierte molekulare Subgruppen von Mammakarzinomen

Aus den Expressionsprofilen der oben genannten Rezeptoren und Ki-67 ergeben sich molekulare Tumorgruppen (siehe Tabelle 7), welche die Therapieoptionen mitbestimmen. Die Subklassifikation erlaubt eine bessere Prognose bezüglich der Wirksamkeit von Therapieansätzen als die bloße histologische Betrachtung des Tumorgewebes (siehe Kapitel 1.5.2) [141].

Tabelle 7: Rezeptor-basierte molekulare Subklassifizierung von Mammakarzinomen [16]

Molekularer Subtyp	Subgruppe	Definition (Approximation mit Surrogatparametern)	Anmerkungen
Luminal A		<ul style="list-style-type: none"> • ER und PgR positiv • HER2 negativ • Ki67 niedrig 	„luminal A-like“
Luminal B	HER2 negativ	<ul style="list-style-type: none"> • ER positiv und eines der folgenden Kriterien <ul style="list-style-type: none"> ◦ PgR negativ ◦ Ki67 hoch 	„luminal B-like“ HER2 negativ
	HER2 positiv	<ul style="list-style-type: none"> • ER positiv • HER2 überexprimiert oder amplifiziert • Ki67 niedrig oder hoch 	„luminal B-like“ HER2 positiv
HER-2 enriched		<ul style="list-style-type: none"> • HER2 überexprimiert oder amplifiziert • ER und PgR negativ 	
Basal like		<ul style="list-style-type: none"> • ER und PgR negativ • HER2 negativ 	weitgehende Überlappung mit dem triple (dreifach) negativen Karzinom

Legende:

ER – Östrogenrezeptor, HER2 – Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, Ki67 – PgR – Progesteronrezeptor,

1.4.6 Genexpressionsanalyse

Ein Genexpressionstest untersucht individuelle Genaktivitäten, die mit der Tumorerkrankung in Zusammenhang stehen. Bei ca. 30 % der Patientinnen mit einem Mammakarzinom im jungen Alter (circa 20.000 Frauen pro Jahr) ist anhand der etablierten Subklassifizierung (siehe Tabelle 7) keine eindeutige Therapieempfehlung möglich. Genexpressionstests erlauben präzisierte Aussagen zum Tumorrückfallri-

siko. Nach einer Brustkrebstherapie (Operation und/oder Hormontherapie) wird bei Patientinnen mit durch eine Genexpressionsanalyse festgestelltem geringen Sterberisiko (durch ein Rezidiv bzw. einer Fernmetastase) auf die belastende Chemo-/Strahlentherapie verzichtet und somit eine Übertherapie vermieden.

Beispiele für solche Genexpressionstests sind Oncotype DX, Endopredict, Prosigna und Mammaprint. Eine zusätzliche Gewebebiopsie ist nicht nötig, da Gewebematerial verwendet wird, das vor oder während einer Operation entnommen wurde. Nach ca. zwei Wochen sind die Ergebnisse dieser Tests gemeinhin verfügbar [142–147].

Ein weiteres Beispiel für eine pathogenetische Analyse ist die Bestimmung einer potentiellen BRCA 1 oder BRCA 2 Keimbahnmutation. Diese spielt weniger bei der Therapieplanung, sondern stärker bei der humangenetischen Beratung von Familienmitgliedern von Krebspatienten eine Rolle. Auch die hier untersuchten medullären Mammakarzinome sind in circa 13 % der Fälle mit einer BRCA1-Mutation assoziiert [148, 149].

Diese Genanalyse ist aber nicht Betrachtungsgegenstand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente und wird lediglich der Vollständigkeit halber genannt.

1.4.7 Marker der experimentellen Triplex-Färbung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde eine neue Triplex-Färbung mit onkologischen Biomarkern (CD3, FoxP3 und PD-L1) genutzt, die zusätzliche Informationen bezüglich der Diagnostik, Prognose und Therapie der medullären Mammakarzinome liefern könnte.

CD3

Bei CD3 handelt es sich um einen aus vier Polypeptidketten (zwei epsilon-Ketten, einer gamma-Kette und einer delta-Kette) bestehenden Membranproteinkomplex. Zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und zwei zeta-Ketten bildet CD3 den TCR-CD3-Komplex. Dieser Komplex erkennt an Major-Histocompatibility-Complex (MHC) gebundene Antigene. Bei Bindung werden die T-Zellen aktiviert. Dabei kommt es zur Proliferation der T-Zellen und zur Aktivierung von Effektorfunktionen der T-Lymphozyten. Dazu zählen zytolytische Aktivitäten und die Sekretion von Signalmolekülen (z. B. Interleukine, Interferon-(IFN)- γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Transforming-growth-factor-(TGF)- β) [150–153]. CD3+-T-Zellen spielen bei Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten und Malignitäten eine wichtige Rolle [154].

Meist dient die CD3-Färbung von Gewebeproben der Identifikation lymphoider Pathologien (z. B. T-Zell-Lymphom, Natural-Killer-(NK)-Cell-Lymphom, Hodgkin-Lymphom). Die Analyse des Expressionsmusters hilft bei der Klassifizierung der Erkrankung und bei der Planung einer geeigneten Therapie [153, 151].

Eine Behandlung mit monoklonalen AK gegen CD3 wird aktuell zur Unterdrückung der Rejektion von Transplantaten (Niere, Herz, Leber) eingesetzt [155]. Die klinischen Erfolge bei einer Behandlung von Diabetes Typ 1 mit monoklonalen AK gegen CD3 bestätigten sich in Phase III Analysen nur teilweise [156–158]. Neuere Untersuchungen lassen allerdings doch einen positiven Effekt monoklonaler AK gegen CD3 bei der Prävention von Diabetes Typ 1 vermuten [153].

Auch bei mild bis moderat betroffenen Covid-19 Patienten könnte eine anti-CD3-Therapie wirksam sein. Foralumab, ein nasal verabreichter monoklonaler AK gegen CD3, fördert die Auflösung von durch Covid-19 hervorgerufenen Lungeninfiltraten und senkt die Inflammationsmarker im Blut der Patienten, wie aus einer brasilianischen Pilotstudie hervorgeht [159].

Bei CD3+ medullärem Brustkrebs könnte in Zukunft eine rekombinante anti-CD3 Nanobody-Therapie hilfreich sein. In vivo Versuche an Mäusen belegen eine Suppression des Tumorwachstums durch die Unterdrückung der Angiogenese in der Malignität. Laut Moradi-Kalbolandi et al. führt die Behandlung mit anti-CD3 Nanobodies zu einer durch körpereigene zytotoxische T-Zellen vermittelten Abnahme der Karzinomproliferation [160, 161].

Forkhead Box Protein 3 (FoxP3)

Die Forkhead-Box-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die basale Zellfunktionen (z. B. Proliferation, Wachstum, Ausdifferenzierung, Lebensdauer) steuern und bei der embryonalen Entwicklung eine entscheidende Rolle spielen [162–164].

Das in der vorliegenden Dissertation untersuchte FoxP3 reguliert als Transkriptionsfaktor die Effektorfunktionen, die Stabilität und die Verbreitung regulatorischer T Zellen (Tregs) im menschlichen Immunsystem. Außerdem beeinflusst FoxP3 die Expression verschiedener Proteine, wie Interleukin 2, Interleukin 17 und Interferon- γ , was zur Unterdrückung von Effektor- und Helfer- T-Zellen sowie zur Expansion von Tregs führt. Tregs wirken dämpfend auf die angeborene und adaptive Immunantwort und spielen eine Schlüsselrolle bei der Bekämpfung von Autoimmunität.

FoxP3 ist an der immun-induzierten Bekämpfung von Tumorzellen und Autoimmunerkrankungen beteiligt. Die Ursache des Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomal-(IPEX)-Syndroms sind FoxP3-Mutationen auf dem X-Chromosom. Tierversuche belegen, dass FoxP3⁺-Tregs den Schweregrad von Erkrankungen wie Multiple Sklerose, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Diabetes, Asthma, Nierenerkrankungen und Thyreoiden verringern. Bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (z. B. Systemischer Lupus erythematoses (SLE)) sind FoxP3⁺-Tregs dysfunktional.

Bei Patienten mit soliden Tumoren blockiert ein lokal erhöhter FoxP3-Spiegel die Unterdrückung der karzinomatösen Zellen durch das Immunsystem. Ein hoher Anteil an FoxP3⁺-Zellen wirkt sich demnach negativ auf die Prognose aus. Bei in vivo und in vitro Experimenten zum medullären Mammakarzinom wurde durch eine FoxP3-Überexpression das Zellwachstum zwar gehemmt, aber das Gesamtüberleben verringert. FoxP3 kann somit als prognostischer Faktor für eine Metastasierung dienen. Erhöhte Mengen an FoxP3 im Tumorgewebe fördern durch die Hemmung der T-Zell-Proliferation die Tumorgenese und stören somit die körpereigene Anti-Tumor-Immunantwort [165–179].

Programmed cell death ligand 1 (PD-L1)

PD-L1 ist ein Transmembranprotein in aktivierten Immunzellen und Tumorzellen. Der Hauptrezeptor für PD-L1 ist PD-1. Daneben bindet PD-L1 auch an B7 auf der Oberfläche von CD8⁺-T-Zellen. PD-L1 wird in großen Mengen in der Lunge, im Herzen, in der Plazenta und in der Skelettmuskulatur exprimiert und in geringerem Maße auch in Leber, Milz, Nieren, Thymus und aktivierten T- und B-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten und Keratinozyten.

Die physiologische Funktion von PD-L1 ist der Schutz vor autoreaktiven T-Zellen, da bei der PD-1-PD-L1-Interaktion die T-Zell-Aktivierung und die durch zytotoxische T-Lymphozyten vermittelte Lyse dieser Zellen verhindert wird. Dieser Mechanismus verhindert eine exzessive und/oder chronische autoimmune Inflammation.

Manche solide Tumoren zeigen eine hohe PD-L1-Expression und entgehen dadurch der durch aktivierte T-Zellen ausgelösten Immunantwort (Immunevasion). Damit sind hohe PD-L1-Konzentrationen mit einer negativen Prognose assoziiert. Im Rahmen einer Immuntherapie verhindern PD-L1-AK die Bindung an den PD-1 und restaurieren somit die Effektorfunktion der T-Zellen. Auch Tumoren, die kein PD-L1 exprimieren,

können gegenüber PD-L1-AK sensitiv sein und auf eine solche Immuntherapie ansprechen. Umgekehrt gibt es PD-L1+-Tumoren, die nicht auf eine Therapie mit PD-L1-AK reagieren (siehe Kapitel 4).

Zu den therapeutisch eingesetzten PD-L1-AK gehören Atezolizumab (Bronchialkarzinom, fortgeschrittenes Urothelkarzinom), Durvalumab (nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (engl. non small cell lung carcinoma, NSCLC)) und Pembrolizumab (NSCLC, endozervikales Adenokarzinom, Urothelkarzinom, Plattenepithelzervixkarzinom und Triple-negativer Brustkrebs (engl. triple negative breast cancer, TNBC)). Die PD-L1-AK-Therapie wird auch bei fortgeschrittenen Tumoren genutzt [180–196].

1.5 Besonderheiten des medullären Mammakarzinoms

1.5.1 Makroskopisches Erscheinungsbild

Der durchschnittliche Durchmesser von medullären Mammakarzinomen beträgt bei der Erstdiagnose 2–2,9 cm. Makroskopisch ist der weiche bis halbfeste Tumor gut vom gesunden Brustgewebe abgrenzbar. Die Schnittfläche präsentiert sich homogen grau und fast saftig. Das oftmals fleischig hervorquellende Tumorgewebe wird von zentral liegenden Nestern mit Nekrosen und Hämorrhagien durchzogen, die manchmal zu einer zystischen Degeneration führen [1, 197, 198].

1.5.2 Histologisches Erscheinungsbild

Medulläre Mammakarzinome werden histologisch nach den Ridolfi-Kriterien beurteilt und müssen die folgenden fünf Punkte erfüllen:

1. Synzytiales Wachstumsverhalten: Mehr als 75 % der Tumorzellen wachsen in Strängen von pleomorphen Zellen, die in anastomosierenden Trabekeln arrangiert sind (siehe Abbildung 4).
2. Zirkumskription: Der Tumor ist mikroskopisch nach allen Seiten gut abgrenzbar und konvex (siehe Abbildung 4).
3. Abwesenheit von Komponenten eines duktales Carcinoma in situ (DCIS): Wenn im Tumor Anzeichen für ein DCIS-Wachstum vorkommen, sollten sie entweder lediglich in einem Mikroskopiefeld und auch nur peripher auftauchen oder völlig getrennt von der Tumormasse liegen.
4. Abwesenheit von mikroglandulären Formationen: Jegliche Präsenz einer Drüsenformation innerhalb des Tumors wird als mikroglanduläre Formation gewertet.

5. Moderate bis hervorstechende diffuse mononukleäre Infiltration: Die Intensität dieser mononukleären Entzündungsreaktion wird von Ridolfi auf einer Skala von 0–4 kategorisiert (siehe Abbildung 4).

Tumoren die alle fünf Kriterien aufweisen, werden als „typisch medulläre“ Mammatumoren bezeichnet. Karzinome die zwingend Kriterium 1 und wenigstens drei der vier anderen Kriterien erfüllen, gelten als „atypisch medulläre“ Karzinome. „Invasive Mammakarzinome NST mit medullären Eigenschaften“ erfüllen entweder das erste Kriterium nicht oder weniger als drei der vier anderen Punkte [197, 199].

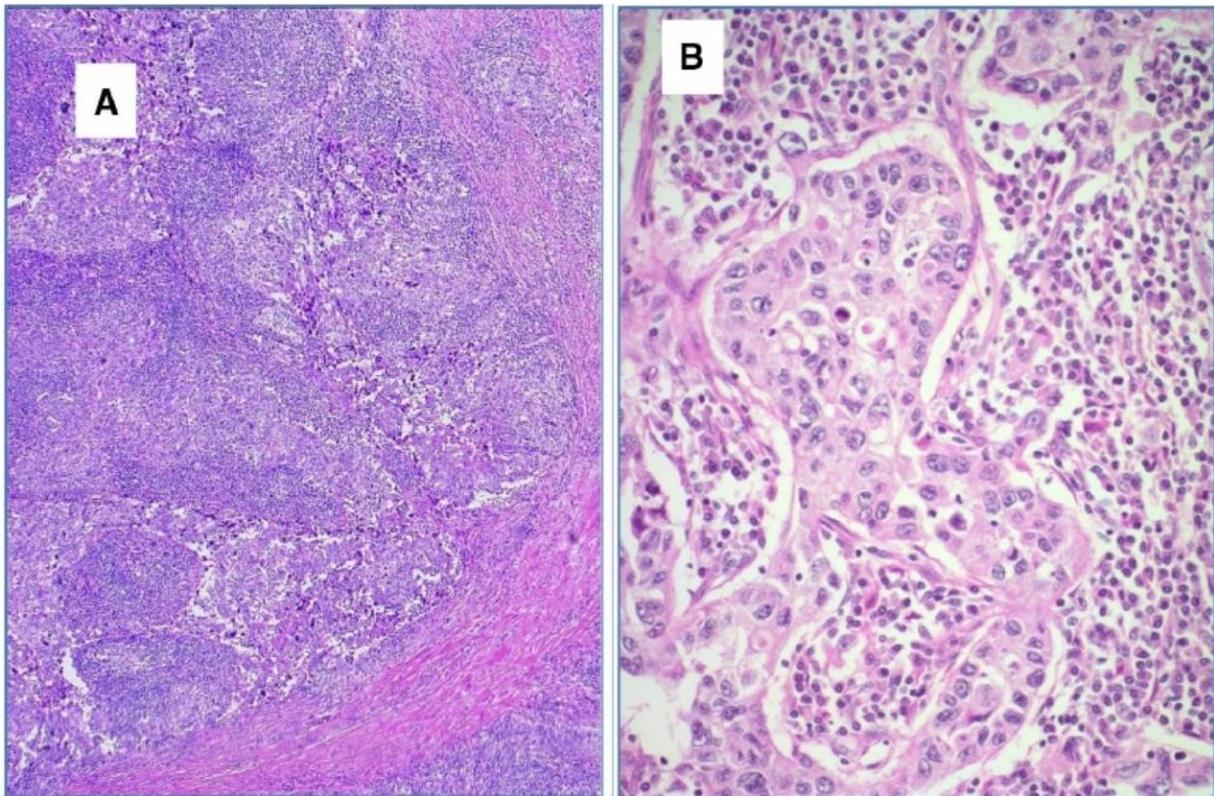


Abbildung 4: Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung eines medullären Mammakarzinoms
A: (low power view) ausgedehnte lymphozytische Infiltrate, serpentinartig synzytiale Krebszellformationen, scharfe Abgrenzbarkeit des Tumors von der Peripherie [148], B: (high power view) synzytiales Tumorzellwachstum, hoher nukleärer Polymorphismus und zahlreiche Mitoseaktivitäten [148]

1.5.3 Therapie

Operative Therapie

Primär wird bei allen nicht fortgeschrittenen Tumoren eine brusterhaltende Therapie angestrebt. Die Tumoresektion in sano (R0 Status) bildet die Basis für eine positive Prognose. Eine brusterhaltende Therapie mit anschließender Radiotherapie der ge-

samten Brust ist in Bezug auf das Überleben der Patientin mit der alleinigen Mastektomie vergleichbar. Bei inkompletter Entfernung des Tumors, inflammatorischen Karzinomen (Ausnahme: medulläre Mammakarzinome), einer Kontraindikation zur Nachbestrahlung oder bei einem ausdrücklichen Wunsch der aufgeklärten Patientin wird eine Mastektomie durchgeführt [29].

Therapie der Axilla

Bei der Beurteilung der Axilla wird eine variable Anzahl (10–25) der zum Tumor ipsilateralen Achsellymphknoten chirurgisch entnommen und pathohistologisch aufgearbeitet, um vorhandene Lymphknotenmetastasen nachzuweisen und zu entfernen. Das axillare Staging kann bei vorliegender Fernmetastasierung entfallen (siehe Abbildung 5), da eine palliative Therapie erfolgt. Eine Entfernung der Sentinellymphknoten wird jedoch bei lokoregional Primärerkrankten mit negativem Tast- und Sonographiebefund und bei Patientinnen im Anschluss an eine primär systemische Therapie (PST) empfohlen. Auf eine radikale Axilla-Dissektion kann bei Patientinnen mit pT1-pT2/cN0-Tumoren, die nach der brusterhaltenden Therapie eine perkutane Radiotherapie erhalten haben und bei denen in der Sentinel-Lymphonodektomie lediglich ein oder zwei positive Sentinel-Lymphknoten nachgewiesen wurden, verzichtet werden. Bei einer Mikrometastasierung wird auf eine Therapie der Lymphabflussgebiete gänzlich verzichtet. Eine radikale Axilla-Dissektion wird für Patientinnen mit Mastektomie bzw. bei einem prätherapeutischen cN1-Status empfohlen [29].

Chemo- und adjuvante Therapieformen

Die an die Operation anschließende Therapie des medullären Mammakarzinoms unterscheidet sich bei keiner der drei Formen (klassische Form, atypisch medulläres Mammakarzinom, Mammakarzinom NST mit medullären Eigenschaften) von der Behandlung von Mammakarzinomen mit einem anderen histologischen Subtyp. Jedoch hat die Prognose eines medullären Mammakarzinoms deutlich positivere Tendenzen (siehe Kapitel 1.5.4). Im Hinblick auf die postoperative Therapie ist die molekulare Subtypisierung (siehe Kapitel 1.4.5) und die Genexpressionsanalyse (siehe Kapitel 1.4.6) wichtiger als die histologische Klassifizierung. Bei der postoperativen Behandlung wird außerdem zwischen einer lokoregional begrenzten Primärerkrankung und einem rezidierten und/oder metastasierten Mammakarzinom unterschieden [29]:

Lokoregional begrenzte Primärerkrankung: Die Rezeptor-basierte molekulare Subtypisierung (siehe Kapitel 1.4.5, Tabelle 7) bestimmt den klinischen Verlauf und das An-

sprechen auf die Therapie entscheidend mit und wird daher für die individuelle Therapieplanung genutzt. Bei den meisten Subtypen wird eine Chemotherapie durchgeführt, lediglich bei Typ Luminal A ist eine endokrine Therapie nach der Operation ausreichend. Bei HER2+-Tumoren wird die Chemotherapie um eine Anti-HER2-Therapie ergänzt [29].

Rezidiertes und/oder metastasiertes Mammakarzinom: Ein lokoregionales Rezidiv wird regional therapiert. Eine komplette Exzision des Rezidivtumors wird angestrebt. Postoperative Radiotherapie verbessert die lokale Tumorkontrolle und wirkt sich positiv auf das Überleben der Patientin aus. Gelingt die lokale Tumorkontrolle, ist von einem Langzeitüberleben trotz Rezidivbildung des Mammakarzinoms auszugehen. Bei Inoperabilität muss eine Radiotherapie erfolgen. Obwohl prospektive randomisierte Studien zur Wirksamkeit fehlen, kann auch nach lokaler chirurgischer Therapie/Strahlentherapie eine adjuvante Chemotherapie erwogen werden [29, 200]. Beim Auftreten von Fernmetastasen ist vornehmlich eine systemische medikamentöse Therapie und Chemotherapie angezeigt. In Abhängigkeit von der Verbreitung der Fernmetastasen sind lokale Therapiemaßnahmen möglich. Primär handelt es sich um eine palliative Versorgung der Patientin unter Einbindung multiprofessioneller und interdisziplinärer Ansätze [29].

Abbildung 5 stellt die therapeutischen Optionen bei einem Mammakarzinom zusammenfassend dar.

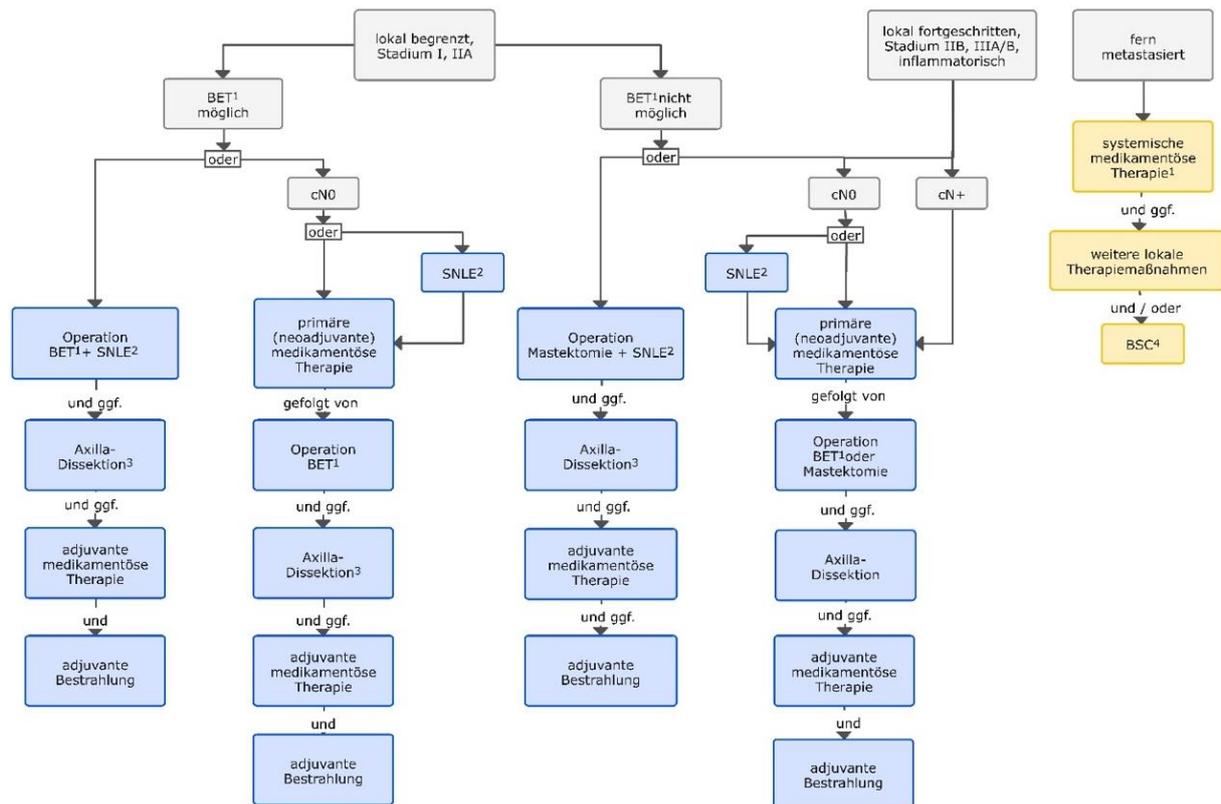


Abbildung 5: Flussdiagramm zur Mammakarzinombehandlung [16]
 Blau: kurative Therapie, gelb: palliative Therapie; ¹BET = Brusterhaltende Therapie, ²SNLE = Wächterlymphknotenbiopsie (Sentinel Node Technik), ³Eine Axilla-Dissektion ist bei dieser Indikation nur selten erforderlich, ⁴BSC = Best Supportive Care

1.5.4 Prognose des medullären Mammakarzinoms

Obwohl medulläre Mammakarzinome ein aggressives Tumorwachstum und -verhalten zeigen (z. B. hohes Grading, Aneuploidie, oft Triple-negativ) ist hier eher eine Tendenz zu einer besseren Prognose vorhanden als beim invasiv duktalem, jetzt invasivem Mammakarzinom NST oder lobulären Karzinomen mit vergleichbarem Grading [201–207]. Klinisch und radiologisch können medulläre Mammatumoren leicht mit benignen Fibroadenomen verwechselt werden [208]. Die rezidivfreie 10-Jahres-Überlebensrate von medullären Mammakarzinomen liegt bei über 80 % [1, 204, 206]. Laut Mateo et al. beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate nach einer Chemotherapie bei medullärem Brustkrebs 93–95 % [209]. Allgemein reagieren Tumoren mit lymphoplasmatischem Infiltrat besser auf Chemotherapeutika. Daher wird vermutet, dass medulläre Mammakarzinome auch aufgrund ihrer prominenten Entzündungsreaktion eine gemeinhin bessere Prognose haben [1, 202, 203, 210, 211]. Dies gilt nicht für medulläre Mammakarzinome mit einem Durchmesser > 3 cm, mit Lymphknotenmetastasen und/oder bei Patientinnen mit BRCA1-Mutation. Bei einem Befall von mehr als vier

Lymphknoten ist ein Rezidiv bzw. der Tod dieser Patientinnen innerhalb von fünf Jahren wahrscheinlich [204].

Für das atypisch medulläre Karzinom gelten die Aussagen zur Prognose nur eingeschränkt. Das Gesamtüberleben ist gegenüber einem typisch medullären Mammakarzinom deutlich reduziert [212].

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Medulläre Mammakarzinome besitzen eine Tendenz zur besseren Prognose als vergleichbare invasiv duktale, nun invasive Mammakarzinome NST genannt, oder lobuläre Mammakarzinome. Betroffen sind aber meist Frauen jüngeren Alters, welche die Mammakarzinom-Diagnose mitten im Leben stehend trifft [1, 201]. Das langfristige Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Verbesserung der Therapieoptionen für Patientinnen mit medullären Mammakarzinomen durch die molekulare Charakterisierung.

Dazu sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Exprimiert das Tumorgewebe von medullären Mammakarzinomen CD3, FoxP3 und PD-L1?
2. Bestehen zwischen der Rezeptor-basierten molekularen Subklassifizierung und CD3, FoxP3 bzw. PD-L1 signifikante Assoziationen, die Schlussfolgerungen auf die Prognose bzw. auf die Wirksamkeit therapeutischer Ansätze (targeted therapy) erlauben?
3. Bestehen auch zwischen den histologischen Subgruppen des medullären Mammakarzinoms (WHO 2012) und CD3, FoxP3 bzw. PD-L1 signifikante Assoziationen, die Rückschlüsse auf die Prognose bzw. auf die Wirksamkeit therapeutischer Ansätze (targeted therapy) erlauben?
4. Ermöglicht das Expressionsprofil der Biomarker ein Fazit über die Tumormikroumgebung von medullären Mammakarzinomen?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Das hier verwendete Patientenkollektiv besteht aus 70 Patientinnen der Kliniken der Ludwig-Maximilians-Universität und der Frauenklinik München, die in den Jahren 1998 bis 2018 in den genannten Häusern in Behandlung waren. Um geeignete medulläre Mammakarzinome im Archiv des Pathologischen Instituts ausfindig zu machen, wurde als Suchsoftware das Programm PathoPro angewandt. Für die Subtypisierung der Mammakarzinome wurden vorhandene Hämatoxylin-Eosin-Schnitte unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Die Einteilung erfolgte dabei in klassisch medulläre Mammakarzinome, atypisch medulläre Mammakarzinome und Mammakarzinome NST mit medullären Eigenschaften. Zugehörige in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebelöcher wurden aus den Archiven der LMU und der Frauenklinik München geordert, um Schnitte für die Versuchsreihen herzustellen. Dabei wurden Paraffinblöcke mit einem möglichst hohen Anteil an repräsentativem Tumorgewebe ausgewählt. Relevante Daten der Karzinome (z. B. Grading, TNM-Klassifikation, Follow-Up) stammten aus den Datenbanken des Pathologischen Instituts der LMU, der Frauenklinik München und des Tumorregisters München.

Alle Daten der Patientinnen sind in dieser Arbeit anonymisiert.

2.2 Untersuchungsmaterialien

Verbrauchsmaterialien

- Deckgläser „Thermo Scientific“, 24x60mm, Fa. Merzel Gläser (Braunschweig, D.)
- Eppendorfgefäße, 15ml, Fa. Eppendorf AG (Hamburg, D.)
- Messzylinder, 1000ml, Fa. Vitlab (Grossostheim, D.)
- Beschichtete Objektträger „Q Path“, Fa. Waldemar Knittel (Braunschweig, D.)
- Pipettenspitzen „eTIPS“ Standard, Fa. Eppendorf AG (Hamburg, D.)

Geräte

- Dampfkochtopf, Fa. Fissler GmbH (Idar-Oberstein, D.)
- Digitale Mikroskopkamera, Fa. JVC KY-F55BE (Yokohama, J.)
- Inkubationsschrank, Fa. Memmert (Schwabach, D.)
- Lichtmikroskop, Fa. Leitz Diaplan (Wetzlar, D.)
- Pipetten, Fa. Eppendorf AG (Hamburg, D.)

- Mikrowelle, Fa. Miele (Gütersloh, D.)

Antikörper

- Primär-AK: CD3, Fa. DCS (Hamburg, D.), CI008C002
- Primär-AK: FoxP3, Fa. Abcam (Cambridge, UK), ab20034
- Primär-AK: PD-L1, Fa. DCS (Hamburg, D.), PI516C002

Chemikalien

- Destilliertes Wasser (Aqua dest), Apotheke Innenstadt LMU München
- Ethanol 100 %, 96 %, 70 %, Apotheke Innenstadt LMU München
- Leitungswasser
- Roti-Histol, Fa. Carl Roth (Karlsruhe, D.)
- 3'3' Diaminobenzidin (DAB)+, Fa. Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
- ImmPACT VIP, Fa. Vector (Burlingame, USA)
- Protein Block, Fa. Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
- Vector Blue, Fa. Vector (Burlingame, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) Puffer, Fa. Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
- Target Retrieval Mikrowellenpuffer, Fa. Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
- VectaMount Permanent Mounting Medium, Fa. Vector (Burlingame, USA)
- 7,5 % Wasserstoffperoxid, Apotheke Innenstadt LMU München
- Xylol, Apotheke Innenstadt LMU München

Detektionssysteme

- ImmPress HRP Reagent Kit Anti-Rabbit IgG, Fa. Vector (Burlingame, USA)
- ZytoChem Plus AP Polymer anti-Mouse, Fa. Zytomed Systems (Berlin, D.)

2.3 Methoden

2.3.1 Grundlagen der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie erlaubt den Nachweis von Molekülen (z. B. Peptide, Proteine) in Geweben über eine Antigen-AK-Reaktion. Ein Gewebeschnitt, in dem ein Antigen nachgewiesen werden soll, wird mit einer Lösung mit einem gegen das Antigen spezifischen AK inkubiert. Der AK lagert sich an das Antigen in der Zelle oder im extrazellulären Raum an [213]. Über einen mit einem Marker gekoppelten Sekundär-AK, der den Antigen-spezifischen AK erkennt, wird das Antigen sichtbar gemacht und kann im

Lichtmikroskop quantifiziert werden. Mit dieser Methode wurden die hier verwendeten Gewebeschnitte im immunhistochemischen Labor der LMU gefärbt und anschließend auf ihre ER-, PR-, HER2- und Ki-67-Expression überprüft und kategorisiert.

2.3.2 Durchführung der Triplexfärbung (CD3, FoxP3, PD-L1)

Gewebeprobenaufarbeitung

Die in Paraffinblöcke eingebetteten Präparate wurden mit einem Schlittenmikrotom in 2–3 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden auf gut haftende, beschichtete Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 50 °C in einem Brutschrank gelagert.

Entparaffinierung

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte 30 min in Xylol und anschließend jeweils 5 min in 100 %igem, 96 %igem und 70 %igem Ethanol sowie abschließend 5 min in Aqua dest geschwenkt.

Vorbehandlung

Die Gewebeschnitte wurden bei 750 Watt zweimal 15 min in einer Mikrowelle erhitzt, anschließend 20 min bei Raumtemperatur (RT) abgekühlt und danach zweimal für 5 min in einer TRIS-Pufferlösung gespült.

Blockierung der endogenen Peroxidasen

Zur Ausschaltung der endogenen Peroxidasen wurden die Schnitte 10 min in einer 7,5 %igen wässrigen Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert, anschließend 10 min unter fließendem Wasser und dann zweimal für 5 min in TRIS-Puffer gespült.

Erster Teil der Triplex-Färbung

Nach dem Auftropfen eines Protein-Block-Reagenz wurde der Überstand auf den Gläsern abgekippt und die Schnitte 10 min lang bei RT gelagert. Der erste Schritt der neu entwickelten Färbung war die Inkubation (60 min, RT) der Gewebeschnitte mit dem primären AK-Mix für CD3 (1:100) und FoxP3 (1:60). Danach wurden die Schnitte zweimal für 5 min in TRIS-Puffer gespült. Nach der Zugabe von Polymer-Mix (ImmPress HRP Reagent Kit Anti-Rabbit IgG und ZytoChem Plus AP Polymer anti-Mouse zu gleichen Teilen) wurden die Schnitte 30 min bei RT inkubiert und anschließend erneut zweimal für 5 min mit TRIS-Puffer gespült. Nach Einwirkung des Vector Blue Chromogens (20 min, RT) wurden die Gewebeschnitte erst 5 min unter fließendem Wasser

und anschließend 5 min in TRIS-Puffer gespült. Nach Zugabe der DAB+-Lösung wurden die Schnitte nochmals gewässert.

Elution

Die Elution fand in einem Dampfgerät statt. Die Schnitte wurden 10 min in Aqua dest erhitzt und dann durch Aqua dest auf RT abgekühlt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal für 5 min in TRIS-Puffer gespült.

Zweiter Teil der Triplex-Färbung

Nach einer Inkubation mit Protein-Block-Reagenz (10 min, RT) und Abkippen des Überstandes wurden die Schnitte 60 min bei RT mit dem primären AK für PD-L1 (1:90) inkubiert; danach erfolgte eine zweimalige Spülung in TRIS-Puffer für jeweils 5 min. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Polymer (ImmPress HRP Reagent Kit Anti-Rabbit IgG) 30 min lang bei RT inkubiert und zweimal je 5 min mit TRIS-Puffer gespült. Weiter erfolgte eine Inkubation mit ImmPACT VIP Chromogen (5 min, RT) und eine Spülung 5 min unter fließendem Wasser. Nach weiteren kurzen Spülschritten in 70 % Alkohol, 96 % Alkohol und 100 % Alkohol wurden die Schnitte 5 min mit Roti-Histol behandelt. Die Eindeckung erfolgte mit dem VectaMount Permanent Mounting Medium.

2.3.3 Mikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte

Alle in dieser Dissertation verwendeten Gewebeschnitte waren auswertbar. Damit wurden hier 70 Biopsien von 70 Patientinnen, wie beschrieben bearbeitet (siehe Kapitel 2.3.1) und analysiert.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Abbildung 6 zeigt die Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines medullären Mammakarzinoms.

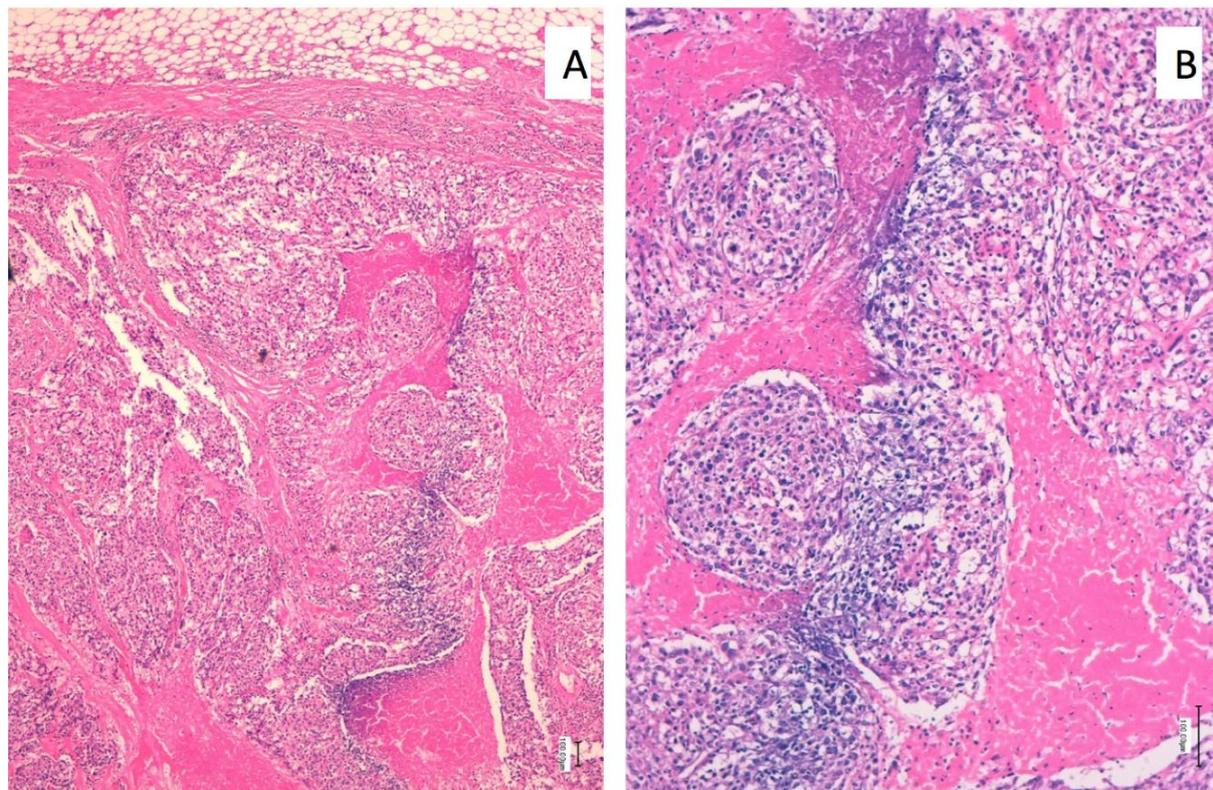


Abbildung 6: Medulläres Mammakarzinom in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

PR- und ER-Färbung

Gewebeschnitte wurden als PR+ bzw. ER+ bezeichnet, wenn mehr als 1 % aller Tumorzellen in der immunhistochemischen Färbung positiv waren (siehe Abbildung 7).

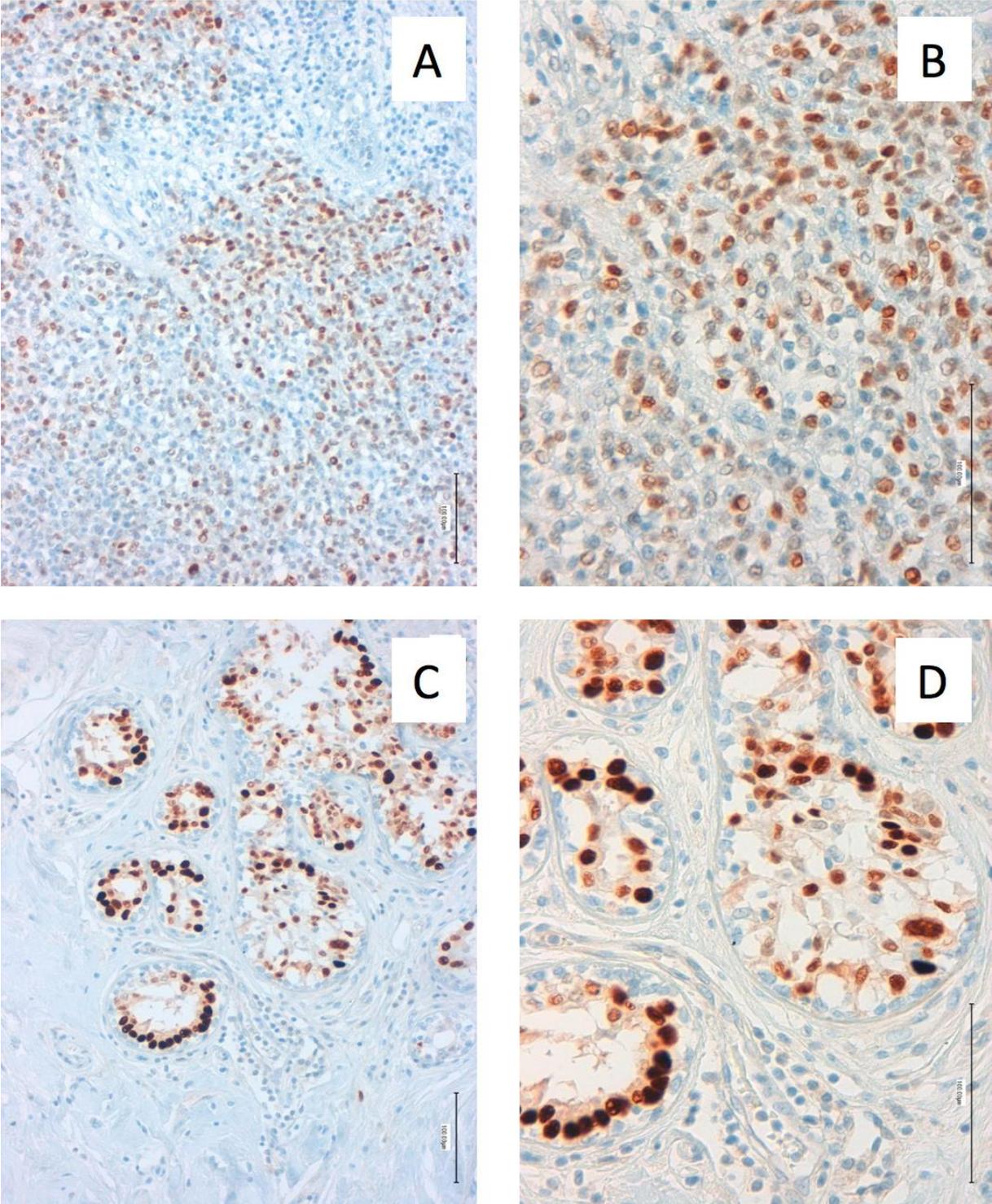


Abbildung 7: Progesteron- (A + B) und Östrogen- (C + D) Färbung eines medullären Mammakarzinoms

HER2- und Ki-67-Färbung

Zur Klassifizierung einer Gewebeprobe als HER2+ musste der Rezeptor in mindestens 30 % der Tumorzellen nachweisbar sein (siehe Abbildung 8 A, B). Gewebeschnitte galten als Ki-67+, wenn mindestens 14 % der Tumorzellen angefärbt wurden (siehe Abbildung 8 C, D).

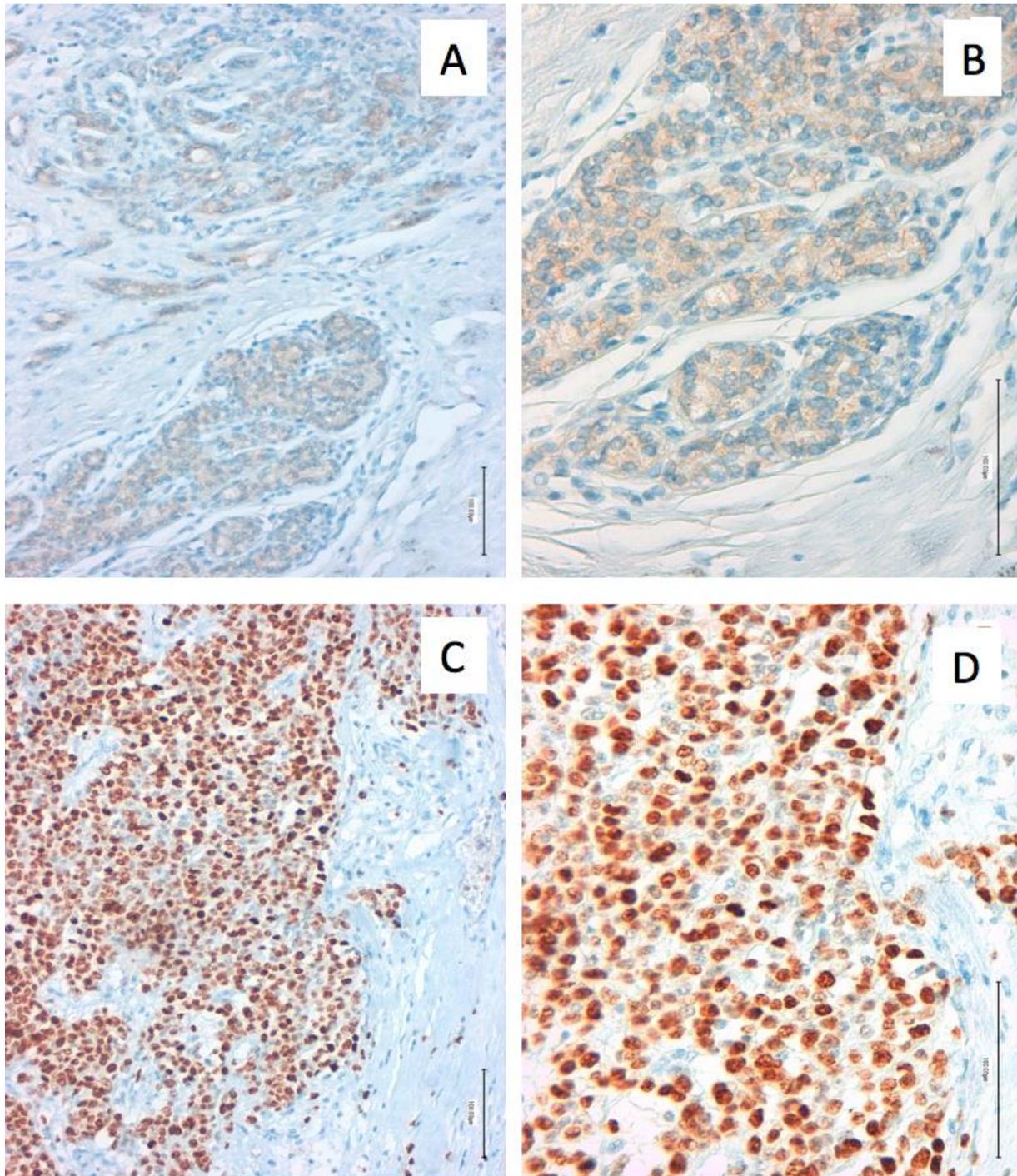


Abbildung 8: Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)- (A + B) und Ki-67- (C + D) Färbung eines medullären Mammakarzinoms

Triplex-Färbung (CD3, FoxP3 und PD-L1)

Mit der in der vorliegenden Dissertation entwickelten Triplex-Färbung lassen sich in einem Gewebeschnitt die Biomarker CD3, FoxP3 und PD-L1 nachweisen (siehe Abbildung 9). Zur mikroskopischen Beurteilung wurde für CD3 und FoxP3 der immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner verwendet. Der IRS entspricht dem Produkt aus Färbeintensität (0–3 Punkte) und Anzahl der gefärbten Zellen (0–4 Punkte, siehe Tabelle 8). Maximal sind somit 12 Punkte erreichbar.

Tabelle 8: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner – Bewertung der Färbeintensität und des Anteils positiver Zellen [79]

Punkte	Färbeintensität	Anteil positive Zellen (%)
0	keine Färbung	Keine
1	schwach	1–10
2	mittel	11–50
3	stark	51–80
4	/	81–100

Für PD-L1 wurde ein Immune Cell (IC) Score ermittelt. Dieser IC-Score gibt den Anteil der Fläche des Karzinoms in Prozent an, der durch PD-L1+ tumorinfiltrierende Immunzellen (dendritische Zellen, Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen) gebildet wird. Bei einem IC-Score > 1 % wird die Gewebeprobe als PD-L1+ bewertet [214].

Für alle drei Triplex Marker wurden sowohl Tumorzellen als auch bindegewebige Stromazellen in dieser Experimentenreihe ausgewertet.

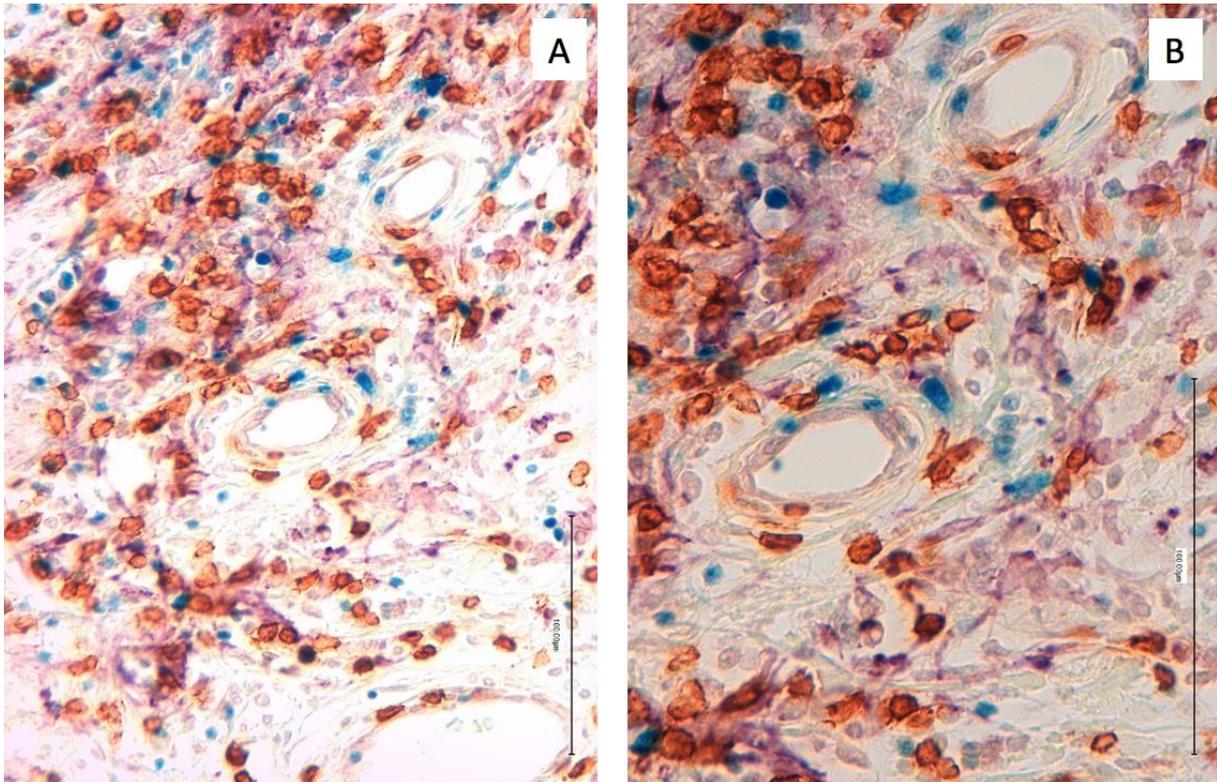


Abbildung 9: Triplex-Färbung eines medullären Mammakarzinoms – Anfärbung der CD3+-Zellen braun, der FoxP3+-Zellen blau und der PD-L1+ Zellen violett
CD3 = Cluster of differentiation 3, FoxP3 = Forkhead Box Protein 3, PD-L1 = Programmed cell death ligand 1

2.3.4 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS 24 (Statistical Package for Social Sciences 24) durchgeführt.

Zu Beginn wurden die Häufigkeit des Vorkommens der Standardmarker ER, PR, HER2 und Ki-67 in den verwendeten Gewebeproben ermittelt. Diese Daten dienen der Klassifizierung der Tumoren in „Triple negative“, „HER2 Typ“, „Luminal A“, „Luminal B mit HER2 negativ“ und „Luminal B mit HER2 positiv“.

Weiter folgte eine Analyse der Biopsien nach der Einteilung der medullären Mammakarzinome in die histologischen Subgruppen (WHO 2012): „typisch medullär“, „atypisch medullär“ und „Mammakarzinom NST mit medullären Eigenschaften“.

Der Lebensstatus der Probandinnen wurde aufgrund der zahlreichen „Lost-to-Follow-up“ Fälle lediglich durch den Median der Überlebenszeit der Patientinnen angegeben; eine Kaplan-Meier-Analyse war deshalb entbehrlich. Dieser Median der Überlebenszeit wurde für die histologischen Subgruppen und für die Rezeptor-basierten Subtypen

ermittelt. Zudem wurde innerhalb der histologischen Subgruppen die mediane Überlebenszeit in Abhängigkeit des CD3- bzw. FoxP3-IRS sowie des PD-L1-IC-Scores bestimmt.

Die Überprüfung der potentiellen Signifikanz der Assoziation der untersuchten Parameter erfolgte anhand von Spearman-Korrelationsanalysen sowie Chi-Quadrat-Testungen. Aufgrund der fast gleichlautenden Berechnungsformeln wurde auf eine Pearson-Tabelle verzichtet, da diese keinen effektiven Mehrwert liefert.

P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet; P-Werte $< 0,01$ als hochsignifikant. Mit Hilfe des Cramers-V wurden die jeweiligen Effektstärken der Signifikanzen dargestellt. Es gilt ein Wert von 0,1 als klein, ein Wert von 0,3 als mittel und ein Wert von 0,5 als groß.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertungen der Standardmarker (ER, PR, HER2, Ki-67)

Von den 70 ausgewerteten Patientinnen zeigte weniger als die Hälfte (n=27, 38,6 %) einen ER+-Tumor. Auch PR+-Tumoren waren in der Minderheit (n=20, 28,6 %). Nur ein Viertel der Patientinnen hatte einen HER2+-Tumor (n= 17, 24,3 %). Dagegen war das Verhältnis von Ki-67+ (n=36, 51,4%) und Ki-67-negativen Tumoren (n=34, 48,6 %) fast ausgeglichen (siehe Abbildung 10).

Marker	Ausprägung	Anzahl	Anteil (%)
Östrogen-Rezeptor (ER)	negativ	43	61,4
	positiv	27	38,6
Progesteron-Rezeptor (PR)	negativ	50	71,4
	positiv	20	28,6
Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)	negativ	53	75,7
	positiv	17	24,3
Ki-67	negativ, <14 %	34	48,6
	positiv, >14 %	36	51,4

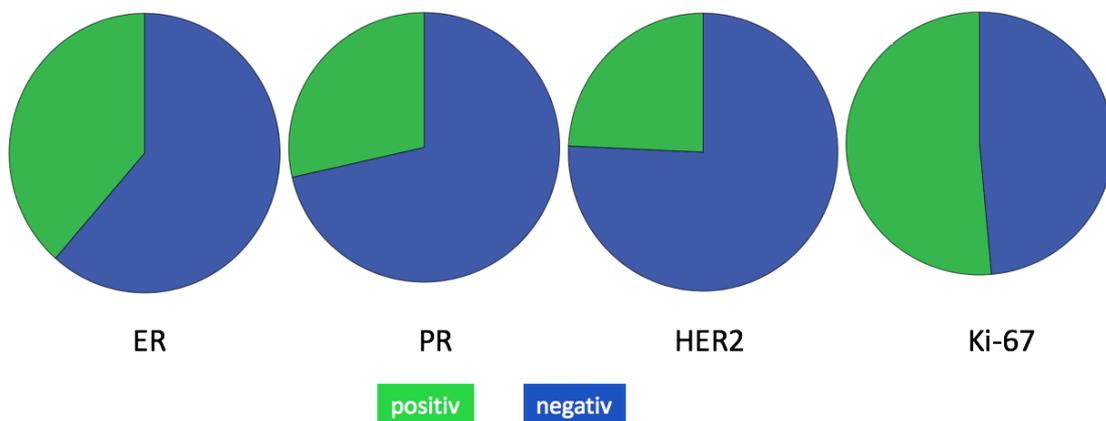


Abbildung 10: Klassifizierung der Tumoren nach den Standardmarkern Östrogen-Rezeptor (ER), Progesteron-Rezeptor (PR), Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) und Ki-67 (n=70)

3.2 Klassifizierung der medullären Mammakarzinome nach Rezeptor-basierten molekularen Subgruppen

Die größte Untergruppe im vorliegenden Kollektiv stellten mit 35 Tumorproben (50 %) TNBC dar. „TNBC“ sind typisch für klassisch medulläre Mammakarzinome. 15 Tumorproben (21,4 %) wurden als „Luminal B mit HER2 negativ“ klassifiziert, neun Tumorproben (12,9 %) als „Luminal A“ und acht Tumorproben (11,4 %) mit „Luminal B mit HER2 positiv“. Nur drei Patientinnen (4,3 %) gehörten dem „HER2-Typ“ an (siehe Abbildung 11).

Rezeptor-basierte molekulare Subgruppen	Anzahl	Anteil (%)
Basal like (Triple-negativ, TNBC)	35	50,0
HER2-Typ	3	4,3
Luminal A	9	12,9
Luminal B (HER2-negativ)	15	21,4
Luminal B (HER2-positiv)	8	11,4
Gesamt	70	100,0

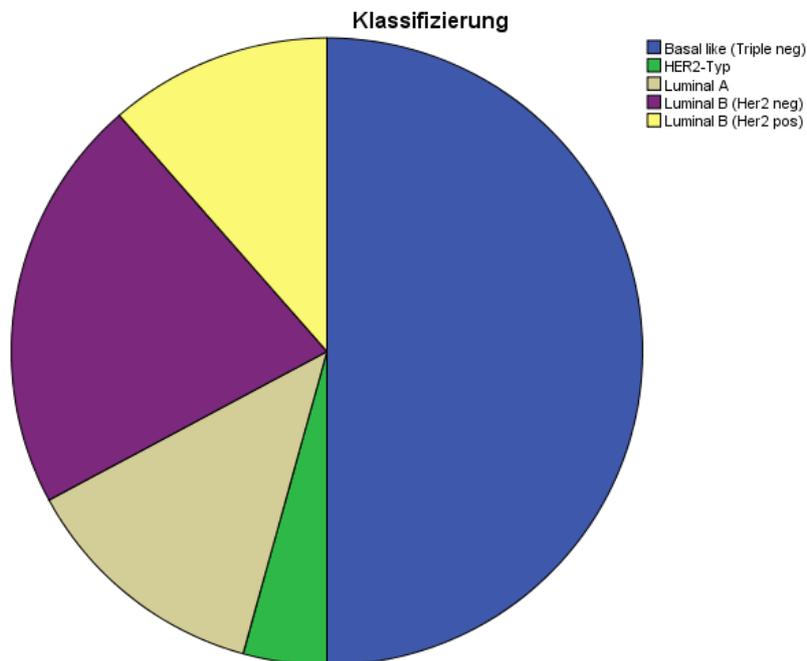


Abbildung 11: Klassifizierung der Tumoren nach den Rezeptor-basierten molekularen Subgruppen (n=70)
HER2 = Human epidermal growth factor receptor 2

3.3 Einteilung der medullären Mammakarzinome nach histologischem Subtyp

Die meisten Tumorproben (55,7 %, n=39) entsprachen nach der WHO-Einteilung von 2012 einem typisch medullären Mammatumor. 24,3 % (n=17) der Biopsien wurden als Mammakarzinome NST mit medullären Eigenschaften klassifiziert. Atypisch medulläre Tumoren waren mit 20 % (n=14) am seltensten vertreten (siehe Abbildung 12).

Subtyp nach WHO Einteilung 2012	Anzahl	Anteil (%)
typisch medullär	39	55,7
atypisch medullär	14	20,0
mit medullären Eigenschaften	17	24,3
Gesamt	70	100,0

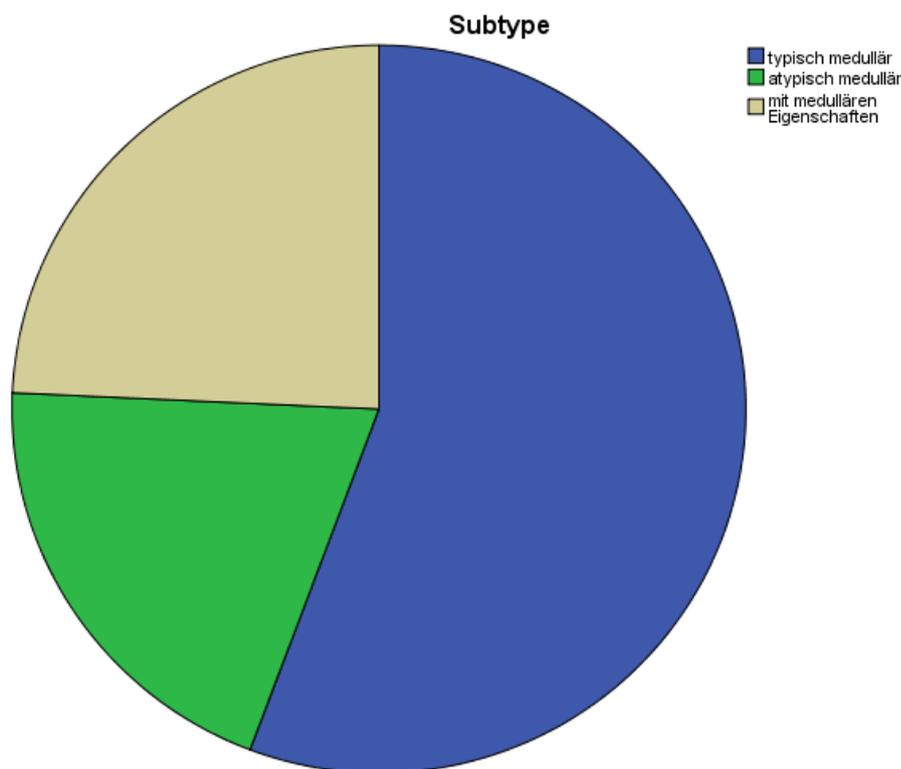


Abbildung 12: Klassifizierung der Tumoren nach Subtyp (n=70)

3.4 Überlebensstatus und Median der Überlebenszeit der Probandinnen

Insgesamt ging bei 38 der 70 Patientinnen im Laufe der Jahre der Zugriff auf ihre Daten verloren (Lost-to-Follow-up). Damit standen von 54,3 % der Patientinnen keine Überlebensdaten zur Verfügung. Von 45,7 % (n=32) waren die Daten bis zum Ende der

Erfassungsperiode im Jahre 2018 bekannt. Bis zum Ende der Erfassungsperiode verstarben neun Patientinnen (12,9 %), 23 (32,9 %) waren 2018 noch am Leben. Bezogen auf die vorhandenen Daten (n=32) betrug der Anteil der Überlebenden 71,9 % (siehe Abbildung 13).

Überlebensstatus		Anzahl	Anteil (%)	Anteil (%) bezogen auf vorhandene Daten
Daten vorhanden	lebend	23	32,9	71,9
	tot	9	12,9	28,1
	Gesamt	32	45,7	100,0
Daten fehlend		38	54,3	
Gesamt		70	100,0	

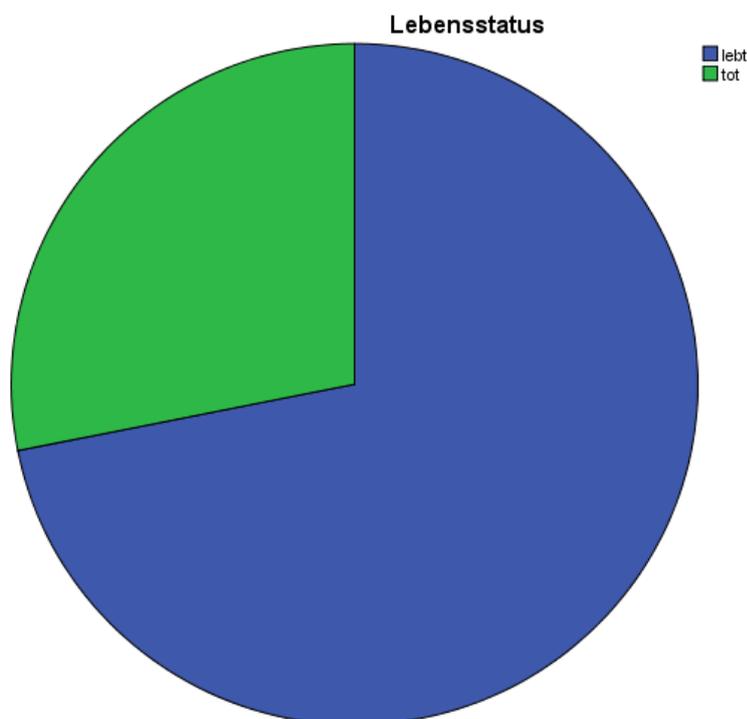


Abbildung 13: Überlebensstatus am Ende der Erfassungsperiode

Aufgrund der begrenzten Anzahl an Überlebensdaten, die für diese Dissertation zur Verfügung standen, wurden lediglich mediane Überlebenszeiten berechnet. Der erreichbare Maximalwert lag bei 16 Jahren (siehe Tabelle 9). Diese Patientinnen waren 2018 am Leben. Bei den Patientinnen mit dem Subtyp „typisch medulläres Mammakarzinom“ zeigten Patientinnen mit den Unterklassifizierungen „Luminal A“ und „Luminal B mit HER2 negativ“ das längste mediane Überleben (16 Jahre). Probandinnen mit

dem gleichen Subtyp, aber mit der Unterklassifizierung „HER2 Typ“ bzw. „TNBC“ überlebten im Median nur 10,5 Jahre bzw. 9,75 Jahre. Patientinnen mit dem Subtyp „atypisch medulläres Mammakarzinom“ und den Klassifizierungen „Luminal B mit Her2 negativ“, „Luminal B mit HER2 positiv“ und „TNBC“ waren ebenfalls 2018 noch am Leben (mediane Überlebenszeit: 16 Jahre). Beim gleichen Subtyp mit der Klassifizierung „Luminal A“ verstarben die Patientinnen dagegen im Median 3,5 Jahre nach der Diagnosestellung. Patientinnen mit einem „Mammakarzinom mit medullären Eigenschaften“ und der Unterklassifizierung „Luminal A“ überlebten ebenfalls im Median 16 Jahre. Beim gleichen Subtyp und der Klassifizierung „Luminal B mit HER2 negativ“ lag das mediane Überleben bei 8 Jahren nach der Diagnose. Eine kürzere Überlebenszeit mit 7,5 Jahren zeigten Patientinnen mit diesem Subtyp bei einer Klassifizierung als „TNBC“ oder „Luminal B mit HER2 positiv“ (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Mediane Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Subtyp und von den Rezeptor-basierten Subgruppen

Subtyp	Rezeptor-basierte molekulare Subgruppen	Subgrup-mediane Überlebenszeit (Jahre)
typisch medullär	Luminal A	16,00
	Luminal B (HER2 neg)	16,00
	HER2 Typ	10,50
	Triple Negative (TNBC, Basal like)	9,75
atypisch medullär	Luminal A	3,50
	Luminal B (HER2 neg)	16,00
	Triple Negative (TNBC, Basal like)	16,00
	Luminal B (HER2 pos)	16,00
mit medullären Eigenschaften	Luminal A	16,00
	Luminal B (HER2 neg)	8,00
	Triple Negative (TNBC,Basal like)	7,50
	Luminal B (HER2 pos)	7,50

HER2 = Human epidermal growth factor receptor 2

3.5 Marker der experimentellen Triplex-Färbung

3.5.1 CD3

Überlebenszeit

Patientinnen mit einem „typisch medullären“ oder einem „atypisch medullären“ Mammakarzinom und einem CD3-IRS-Score von 4 erreichten im Median die maximale Überlebenszeit von 16 Jahren. Bei niedrigeren CD3-IRS-Score-Werten sank die mediane Überlebenszeit auf 9 Jahre (CD3-IRS-Score = 2, „typisch medulläre“ Tumoren) oder auf 3,5 Jahre (CD3-IRS-Score = 1 „atypisch medulläre“ Karzinome). Bei Patientinnen mit Mammakarzinomen „NST mit medullären Eigenschaften“ ergab sich ein anderes Bild. Hier überlebten die Probandinnen mit einem CD3-IRS-Score von 1 am längsten (16 Jahre). Patientinnen mit einem CD3-IRS-Score von 2 (5,5 Jahre) oder mit dem CD3-IRS-Score von 4 (7 Jahre) zeigten ein deutlich kürzeres Überleben (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Mediane Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Mammakarzinom-Subtyp und vom Immunreaktiven Score (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression

Subtyp	CD3-IRS		mediane Überlebenszeit (Jahre)
typisch medullär	CD3-IRS	2	9,00
		4	16,00
atypisch medullär	CD3-IRS	4	16,00
		1	3,50
mit medullären Eigenschaften	CD3-IRS	2	5,50
		4	7,00
		1	16,00

Verteilung des CD3-IRS in den Rezeptor-basierten Subgruppen

Insgesamt traten im Kollektiv 35 TNBC auf (siehe Tabelle 11 und Abbildung 14). Am häufigsten waren in dieser Gruppe CD3-IRS-Score-Werte von 6 (n=12) oder von 4 (n=9) vertreten. 15 der untersuchten Mammakarzinome waren der Subgruppe „Luminal B mit HER2 negativ“ zuzuordnen. Auch hier zeigten die meisten Tumoren einen CD3-IRS-Score von 6 (n=6). Neun Tumoren entsprachen der Subgruppe „Luminal A“; in dieser Gruppe dominierte ein CD3-IRS-Score von 4 (n=5). Acht Patientinnen wurden in die Subgruppe „Luminal B mit HER2 positiv“ klassifiziert; davon zeigte die Hälfte

(n=4) einen CD3-IRS-Score von 4. Die drei Probandinnen mit dem Subtyp „HER2 Typ“ hatten entweder einen CD3-IRS-Score von 6 (n=2) oder 4 (n=1).

Tabelle 11: Immunreaktiver Score (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression in den Rezeptor-basierten Subgruppen

Rezeptor-basierte molekulare Subgruppen	CD3-IRS					Gesamt
	1	2	4	6	9	
Luminal A	1	1	5	1	1	9
Luminal B (HER2 neg)	0	1	4	6	4	15
Luminal B (HER2 pos)	0	0	4	3	1	8
HER2 Typ	0	0	1	2	0	3
Triple Negative (TNBC, Basal like)	2	7	9	12	5	35
Gesamt	3	9	23	24	11	70

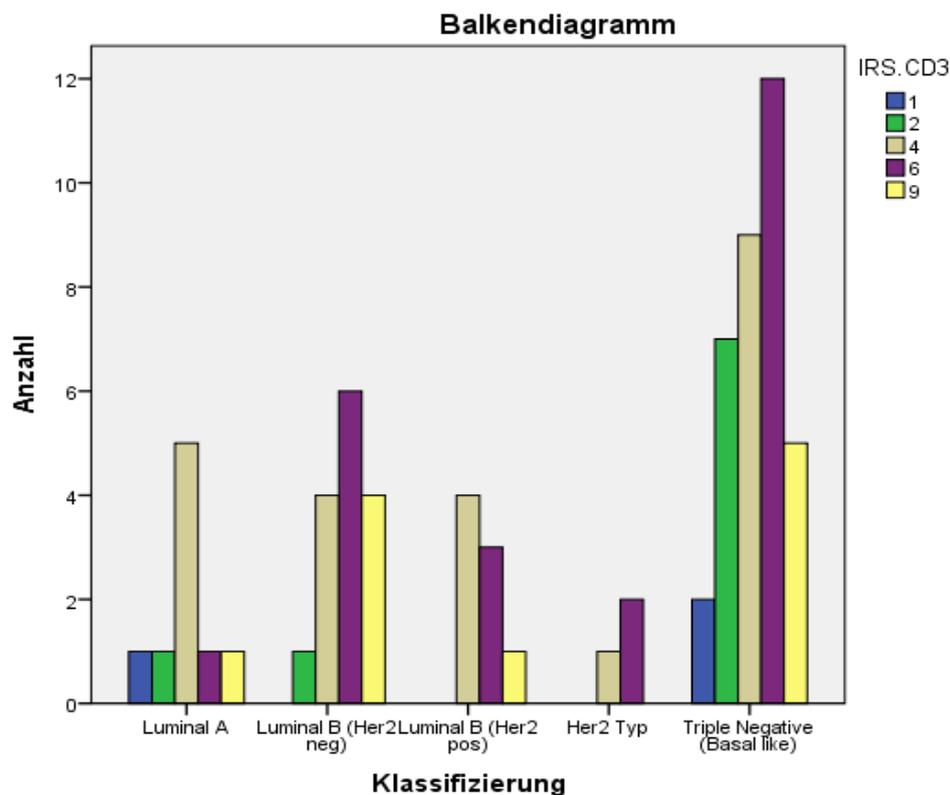


Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung des Immunreaktiven Scores (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression in den Rezeptor-basierten Subgruppen
HER2 = Human epidermal growth factor receptor 2

Die statistische Analyse der 70 Fälle ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem CD3-IRS-Score und der Zugehörigkeit zu den Rezeptor-basierten Subgruppen (Exakter Test nach Fisher: $p=0,764$). Auch laut Cramers-V war die Stärke des Zusammenhangs zwischen den beiden Variablen als gering zu bewerten ($V=0,213$, siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Statistische Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Immunreaktiven Score (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression und der Zugehörigkeit zu den Rezeptor-basierten Subgruppen

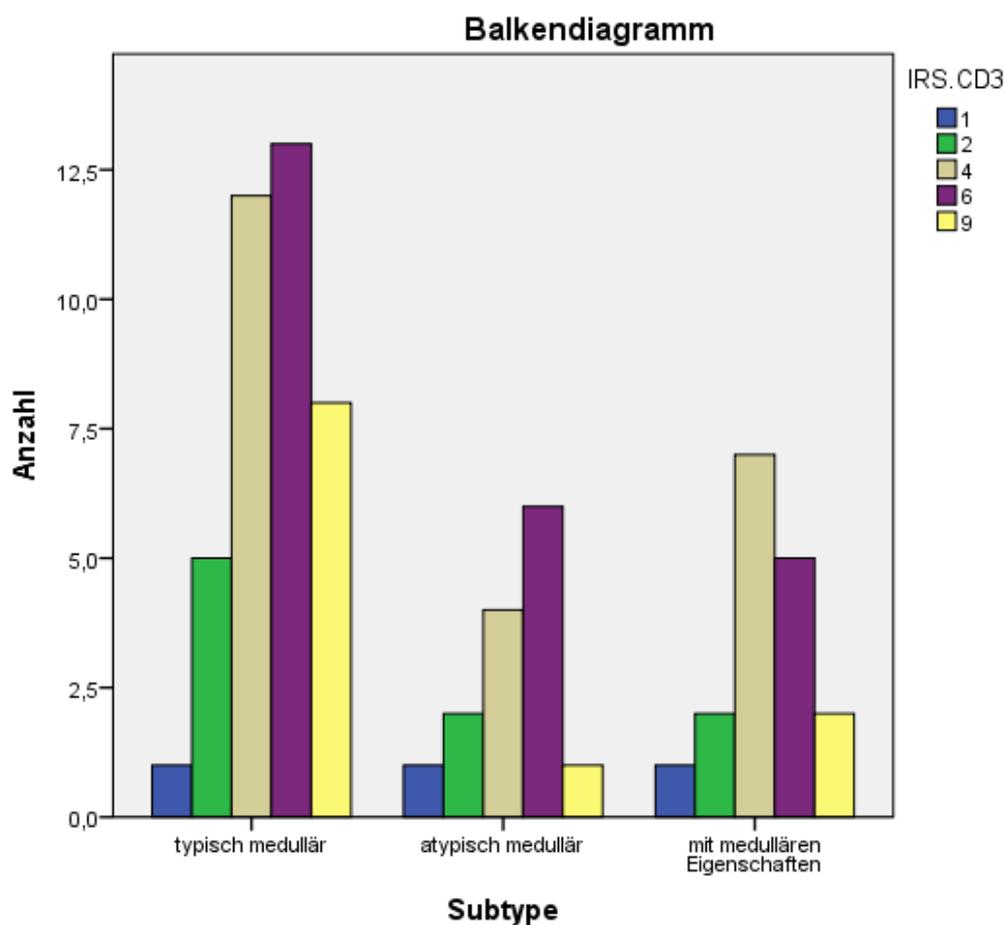
Anzahl gültiger Fälle n=70	Wert	Df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	12,706 ^a	16	,694	,715		
Likelihood-Quotient	15,114	16	,516	,676		
Exakter Test nach Fisher	11,772			,764		
Zusammenhang linear mit-linear	,273 ^b	1	,601	,614	,308	,012
Anzahl gültiger Fälle n=70			Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz	
Nominal- bzgl. Nominalmaß		Phi	,426	,694	,715	
		Cramer-V	,213	,694	,715	
a. 21 Zellen (84,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 0,13.						
b. Die standardisierte Statistik ist -0,523.						

Verteilung des CD3-IRS in den Mammakarzinom-Subtypen

Die meisten der 39 „typisch medullären“ Mammakarzinome erreichten einen CD3-IRS-Score von 6 (n=13) oder 4 (n=12). Acht Tumorproben dieses Subtyps zeigten sogar einen CD3-IRS-Score von 9. In den 17 Tumorproben mit dem Subtyp „Mammakarzinom NST mit medullären Eigenschaften“ waren CD3-IRS-Score-Werte von 4 (n=7) und 6 (n=5) ebenfalls am häufigsten vertreten. Das Gleiche galt für „atypisch medulläre“ Karzinome: IRS-CD3-Score 6 (n=6), IRS-CD3-Score 4 (n=4) (siehe Tabelle 13 und Abbildung 15).

Tabelle 13: Immunreaktiver Score (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression in den Mammakarzinom-Subtypen

Mammakarzinom-Subtyp	CD3-IRS					Gesamt
	1	2	4	6	9	
typisch medullär	1	5	12	13	8	39
atypisch medullär	1	2	4	6	1	14
mit medullären Eigenschaften	1	2	7	5	2	17
Gesamt	3	9	23	24	11	70

**Abbildung 15:** Häufigkeitsverteilung des Immunreaktiven Scores (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression in den Mammakarzinom-Subtypen

Auch hier ergab die statistische Analyse der 70 Fälle keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem CD3-IRS-Score und der Zugehörigkeit zu den Mammakarzinom-Subgruppen (Exakter Test nach Fisher: $p=0,926$). Laut Cramers-V war die Stärke des Zusammenhangs zwischen den beiden Variablen gering ($V=0,146$, siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Statistische Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Immunreaktiven Score (IRS) der Cluster of differentiation 3 (CD3) Expression und der Zugehörigkeit zu den Mammakarzinom-Subtypen

Anzahl gültiger Fälle n=70	Wert	Df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	2,987 ^a	8	,935	,952		
Likelihood-Quotient	3,072	8	,930	,969		
Exakter Test nach Fisher	3,627			,926		
Zusammenhang linear-mit-linear	1,039 ^b	1	,308	,315	,163	,015
Anzahl gültiger Fälle n=70			Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz	
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Phi		,207	,935	,952	
	Cramer-V		,146	,935	,952	
a. 9 Zellen (60,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 0,60.						
b. Die standardisierte Statistik ist -1,019.						

3.5.2 FoxP3

Überlebenszeit

Sowohl bei einem FoxP3-IRS-Score von 1 als auch bei einem FoxP3-IRS-Score von 2 erreichten die Patientinnen mit „typisch medullären“ Mammakarzinomen im Median die maximale Überlebenszeit von 16 Jahren. Das Gleiche galt für Patientinnen mit einem „atypisch medullären“ Mammakarzinom und einem FoxP3-IRS-Score von 2. Patientinnen mit diesem Tumorsubtyp und einem FoxP3-IRS-Score von 3 überlebten im Median dagegen nur 3,5 Jahre. Patientinnen mit Mammakarzinomen „NST mit medullären Eigenschaften“ zeigten variable FoxP3-IRS-Scores. Auch hier erreichten Patientinnen mit einem FoxP3-IRS-Score von 2 die maximale Überlebenszeit von 16 Jahren. Bei abweichenden FoxP3-IRS-Score-Werten war die Überlebenszeit deutlich reduziert (4: 8,5 Jahre, 1: 7,5 Jahre; 3: 7 Jahre, siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Mediane Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Mammakarzinom-Subtyp und vom Immunreaktiven Score (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression

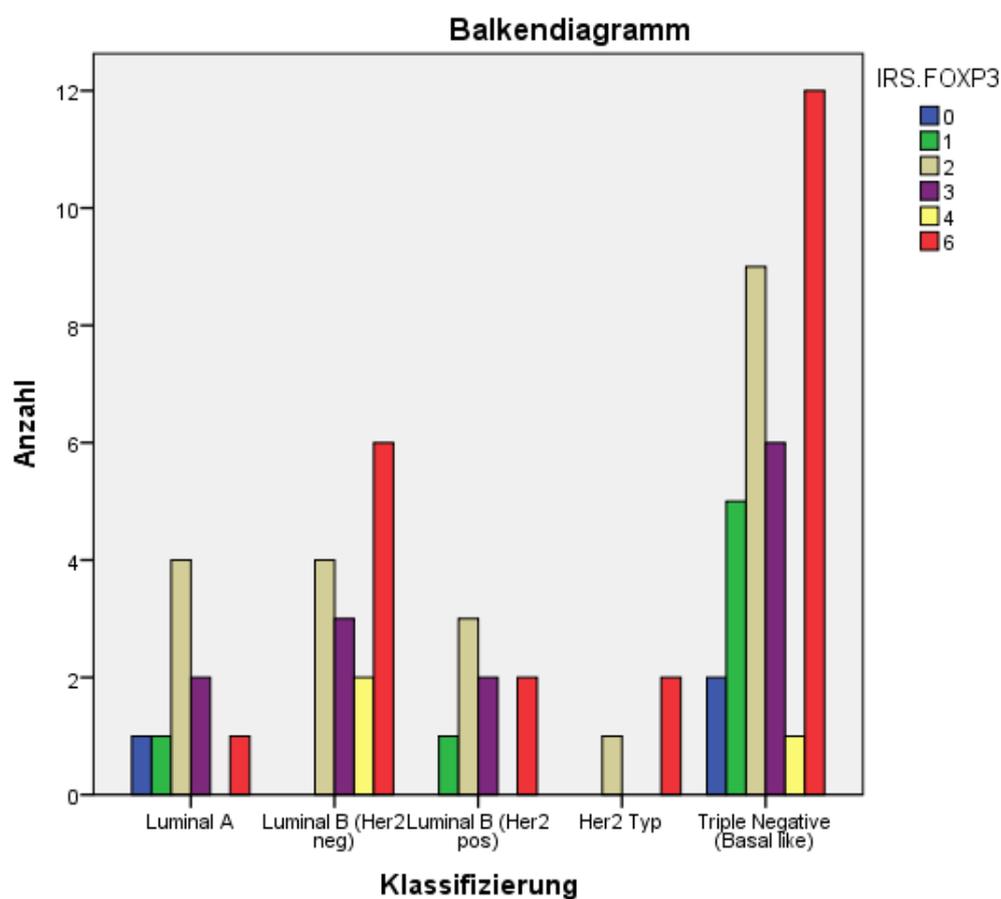
Mammakarzinom-Subtyp	FoxP3-IRS		mediane Überlebenszeit (Jahre)
typisch medullär	FoxP3-IRS	1	16,00
		2	16,00
atypisch medullär	FoxP3-IRS	2	16,00
		3	3,50
mit medullären Eigenschaften	FoxP3-IRS	1	7,50
		2	16,00
		3	7,00
		4	8,50

Verteilung des FoxP3-IRS in den Rezeptor-basierten Subgruppen

Am häufigsten waren Patientinnen mit TNBC vertreten (n=35). Rund ein Drittel dieser Probandinnen (n=12) zeigte einen FoxP3-IRS von 6. Daneben waren in dieser Subgruppe FoxP3-IRS-Werte von 2 (n=9) und 3 (n=6) relativ häufig. Zwei Patientinnen zeigten keine FoxP3-Expression (FoxP3-IRS 0). Unter den 15 Biopsien, die als „Luminal B mit HER2 negativ“ klassifiziert wurden, waren sechs mit einem FoxP3-IRS von 6 und vier mit einem FoxP3-IRS von 2. Bei Patienten mit „Luminal A“ Tumoren (n=9) dominierte ein FoxP3-IRS von 2 (n=4), auch hier gab es eine Patientin mit einem FoxP3-IRS von 0. Bei den Probandinnen mit dem Merkmal „Luminal B HER2 positiv“ (n=8) war ein FoxP3-IRS von 2 (n=3) am häufigsten vertreten. Zwei der drei Frauen mit einem „HER2 Typ“ Mammakarzinom hatten einen FoxP3-IRS von 6 und eine Patientin einen FoxP3-IRS von 2 (siehe Tabelle 16 und Abbildung 16).

Tabelle 16: Immunreaktiver Score (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression in den Rezeptor-basierten Subgruppen

Rezeptor-basierte molekulare Subgruppen	FoxP3-IRS						Gesamt
	0	1	2	3	4	6	
Luminal A	1	1	4	2	0	1	9
Luminal B (HER2 neg)	0	0	4	3	2	6	15
Luminal B (HER2 pos)	0	1	3	2	0	2	8
HER2 Typ	0	0	1	0	0	2	3
Triple Negative (TNBC, Basal like)	2	5	9	6	1	12	35
Gesamt	3	7	21	13	3	23	70

**Abbildung 16:** Häufigkeitsverteilung des Immunreaktiven Scores (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression in den Rezeptor-basierten Subgruppen
HER2 = Human epidermal growth factor receptor 2

Ähnlich wie für CD3 ergab die statistische Analyse der 70 Fälle keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem FoxP3-IRS und der Zugehörigkeit zu den Rezeptor-basierten Subgruppen (Exakter Test nach Fisher: $p=0,891$). Laut Cramers-V war die

Stärke des Zusammenhangs zwischen den beiden Variablen gering ($V=0,218$, siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Statistische Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Immunreaktiven Score (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression und der Zugehörigkeit zu den Rezeptor-basierten Subgruppen

Anzahl gültiger Fälle n=70	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	13,308 ^a	20	,864	,885		
Likelihood-Quotient	16,327	20	,696	,838		
Exakter Test nach Fisher	13,486			,891		
Zusammenhang linear-mit-linear	,119 ^b	1	,730	,746	,374	,014

Anzahl gültiger Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Phi	,436	,864	,885
	Cramer-V	,218	,864	,885

a. 27 Zellen (90,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 0,13.

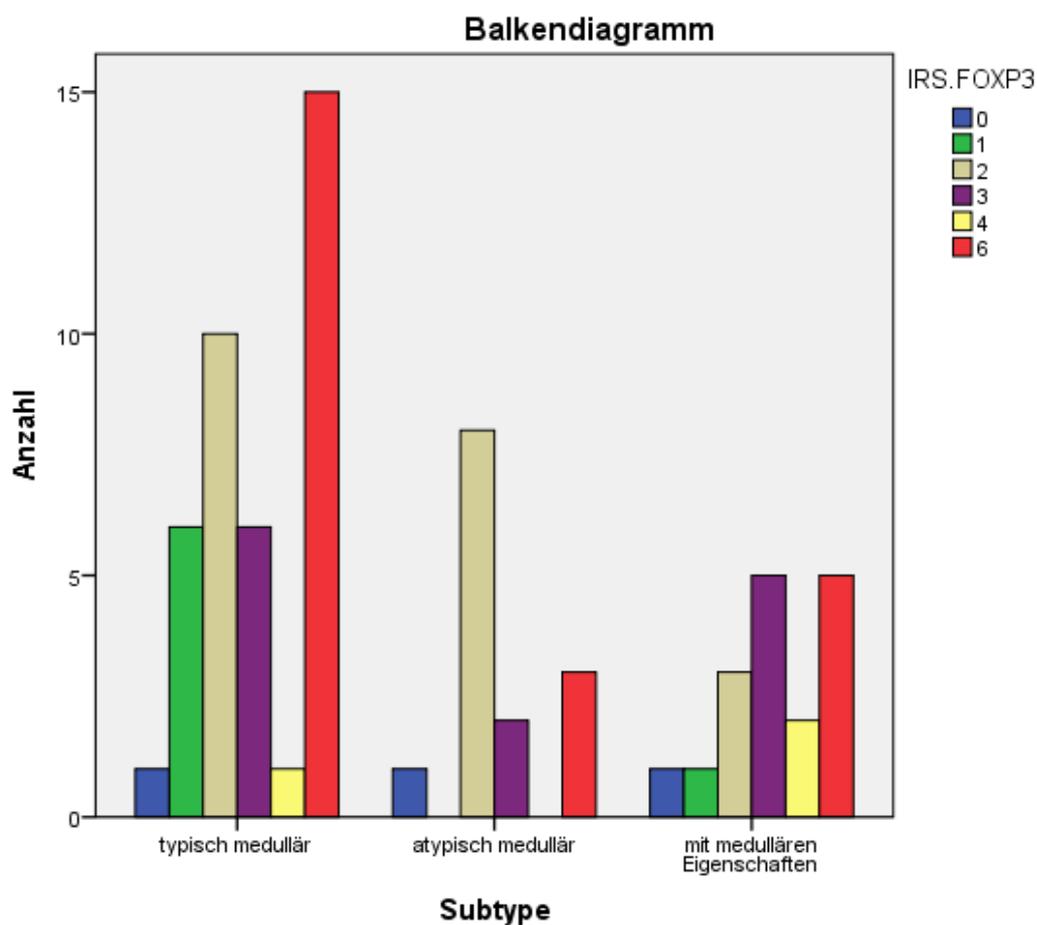
b. Die standardisierte Statistik ist 0,345.

Verteilung des FoxP3-IRS in den Mammakarzinom-Subtypen

Fünfzehn der 39 Probandinnen mit einem „typisch medullären“ Mammakarzinom erreichten einen FoxP3-IRS von 6 und zehn Patientinnen einen FoxP3-IRS von 2. Jeweils sechs Gewebeproben wiesen einen FoxP3-IRS von 1 bzw. 3 auf und jeweils eine einen FoxP3-IRS von 4 bzw. 0. In der zweitgrößten Gruppe der Mammakarzinome „NST mit medullären Eigenschaften“ (n=17) dominierten die FoxP3-IRS-Werte 6 und 3 (jeweils n=5). Auch hier gab es einen Fall mit einem FoxP3-IRS von 0. In der Gruppe der „atypisch medullären“ Mammakarzinome (n=14) war ein FoxP3-IRS von 2 am häufigsten vertreten (n=8). Auch in dieser Gruppe war eine Biopsie FoxP3-negativ (siehe Tabelle 18 und Abbildung 17).

Tabelle 18: Immunreaktiver Score (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression in den Mammakarzinom-Subtypen

Mammakarzinom-Subtyp	FoxP3-IRS						Gesamt
	0	1	2	3	4	6	
typisch medullär	1	6	10	6	1	15	39
atypisch medullär	1	0	8	2	0	3	14
mit medullären Eigenschaften	1	1	3	5	2	5	17
Gesamt	3	7	21	13	3	23	70

**Abbildung 17:** Häufigkeitsverteilung des Immunreaktiven Scores (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression in den Mammakarzinom-Subtypen

Wiederum fehlte bei der statistischen Analyse der 70 Fälle ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem FoxP3-IRS und der Zugehörigkeit zu den Mammakarzinom-Subgruppen (Exakter Test nach Fisher: $p=0,210$). Laut Cramers-V war die Stärke des Zusammenhangs zwischen den beiden Variablen als mittel zu bewerten ($V=0,311$, siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Statistische Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Immunreaktiven Score (IRS) der Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Expression und der Zugehörigkeit zu den Mammakarzinom-Subtypen

Anzahl gültiger Fälle n=70	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	13,513 ^a	10	,196	,189		
Likelihood-Quotient	14,075	10	,170	,260		
Exakter Test nach Fisher	11,940			,210		
Zusammenhang linear-mit-linear	,052 ^b	1	,819	,831	,425	,028
Anzahl gültiger Fälle n=70			Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz	
Nominal- bzgl. Nominalmaß		Phi	,439	,196	,189	
		Cramer-V	,311	,196	,189	
a. 13 Zellen (72,2%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 0,60.						
b. Die standardisierte Statistik ist -0,229.						

3.5.3 PD-L1

Überlebenszeit

PD-L1-negative Probandinnen mit „typisch medullären“ Brusttumoren zeigten im Median eine Überlebenszeit von 16 Jahren, PD-L1+-Patientinnen der gleichen Gruppe nur von 10,5 Jahren. In der Gruppe „atypisch medulläre“ Tumoren überlebten dagegen PD-L1+-Patientinnen mit 16 Jahren deutlich länger als PD-L1-negative Probandinnen (4 Jahre). Auch bei den Mammakarzinomen „NST mit medullären Eigenschaften“ lebten die Frauen mit PD-L1+-Tumoren im Median ein halbes Jahr länger als Patientinnen mit PD-L1-negativen Tumoren (8 Jahre vs. 7,5 Jahre, siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Mediane Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Mammakarzinom-Subtyp und vom Immun Cell Score (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression

Mammakarzinom-Subtyp	PD-L1-IC		mediane Überlebenszeit (Jahre)
typisch medullär	PD-L1-IC	negativ (≤ 1 %)	16,00
		positiv (> 1 %)	10,50
atypisch medullär	PD-L1-IC	negativ (≤ 1 %)	4,00
		positiv (> 1 %)	16,00
mit medullären Eigenschaften	PD-L1-IC	negativ (≤ 1 %)	7,50
		positiv (> 1 %)	8,00

Verteilung des PD-L1-IC in den Rezeptor-basierten Subgruppen

Ein Großteil der untersuchten TNBC-Tumoren ($n=35$) waren PD-L1+ ($n=26$). Auch bei den „Luminal B mit HER2 negativen“ Tumoren ($n=15$) dominierten PD-L1+-Fälle ($n=14$). Das Gleiche galt für „Luminal B mit HER2+“ Karzinome ($n=5$ von $n=8$) und solche vom „HER2 Typ“ ($n=3$ von $n=3$). Bei den „Luminal A“ Tumoren waren hingegen PD-L1-negative Fälle häufiger ($n=6$ von $n=9$, siehe Tabelle 21 und Abbildung 18).

Tabelle 21: Immun Cell Score (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression in den Rezeptor-basierten Subgruppen

Rezeptor-basierte molekulare Subgruppen	PD-L1-IC		Gesamt
	negativ ($\leq 1\%$)	positiv ($> 1\%$)	
Luminal A	6	3	9
Luminal B (HER2 neg)	1	14	15
Luminal B (HER2 pos)	3	5	8
HER2 Typ	0	3	3
Triple Negative (TNBC, Basal like)	9	26	35
Gesamt	19	51	70

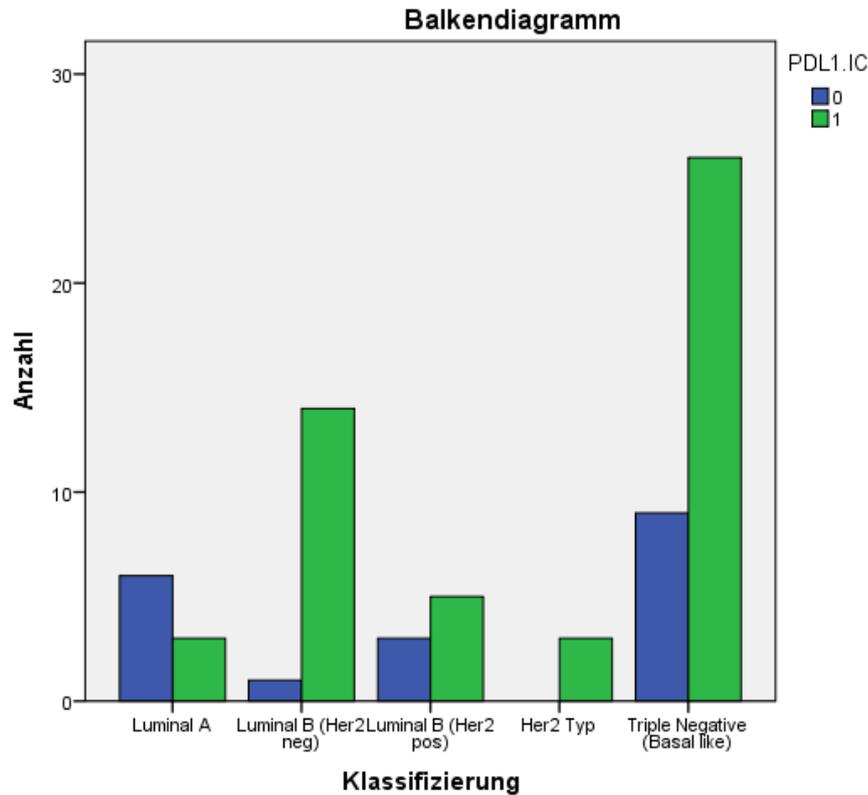


Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung des Immun Cell Scores (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression in den Rezeptor-basierten Subgruppen (0 = PD-L1-negativ, 1 = PD-L1-positiv); HER2 = Human epidermal growth factor receptor 2

Bei der statistischen Analyse der 70 Fälle wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem PD-L1-IC und der Zugehörigkeit zu den Rezeptor-basierten Subgruppen (Exakter Test nach Fisher: $p=0,019$) detektiert. Laut Cramers-V war die Stärke des Zusammenhangs zwischen den beiden Variablen als mittel zu bewerten ($V=0,412$, siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Statistische Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Immun Cell Score (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression und der Zugehörigkeit zu den Rezeptor-basierten Subgruppen

Anzahl gültiger Fälle n=70	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	11,877 ^a	4	,018	,017		
Likelihood-Quotient	12,561	4	,014	,021		
Exakter Test nach Fisher	10,647			,019		
Zusammenhang linear-mit-linear	,999 ^b	1	,318	,350	,181	,041

Anzahl gültiger Fälle n=70	Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Phi	,412	,017
	Cramer-V	,412	,017

a. 5 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 0,81.

b. Die standardisierte Statistik ist 1,000.

Verteilung des PD-L1-IC in den Mammakarzinom-Subtypen

Bei den „typisch medullären Mammakarzinomen“ (n=39) waren 32 PD-L1+. Nur 7 der „typisch medullären“ Tumoren waren PD-L1-negativ. Auch bei den Mammakarzinomen „NST mit medullären Eigenschaften“ (n=10 von n=17) und bei den „atypisch medullären“ Mammakarzinomen (n=9 von n=14) dominierten PD-L1+-Fälle (siehe Tabelle 23 und Abbildung 19).

Tabelle 23: Immun Cell Score (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression in den Mammakarzinom-Subtypen

Mammakarzinom-Subtypen	PD-L1-IC		Gesamt
	negativ (≤ 1 %)	positiv (> 1 %)	
typisch medullär	7	32	39
atypisch medullär	5	9	14
mit medullären Eigenschaften	7	10	17
Gesamt	19	51	70

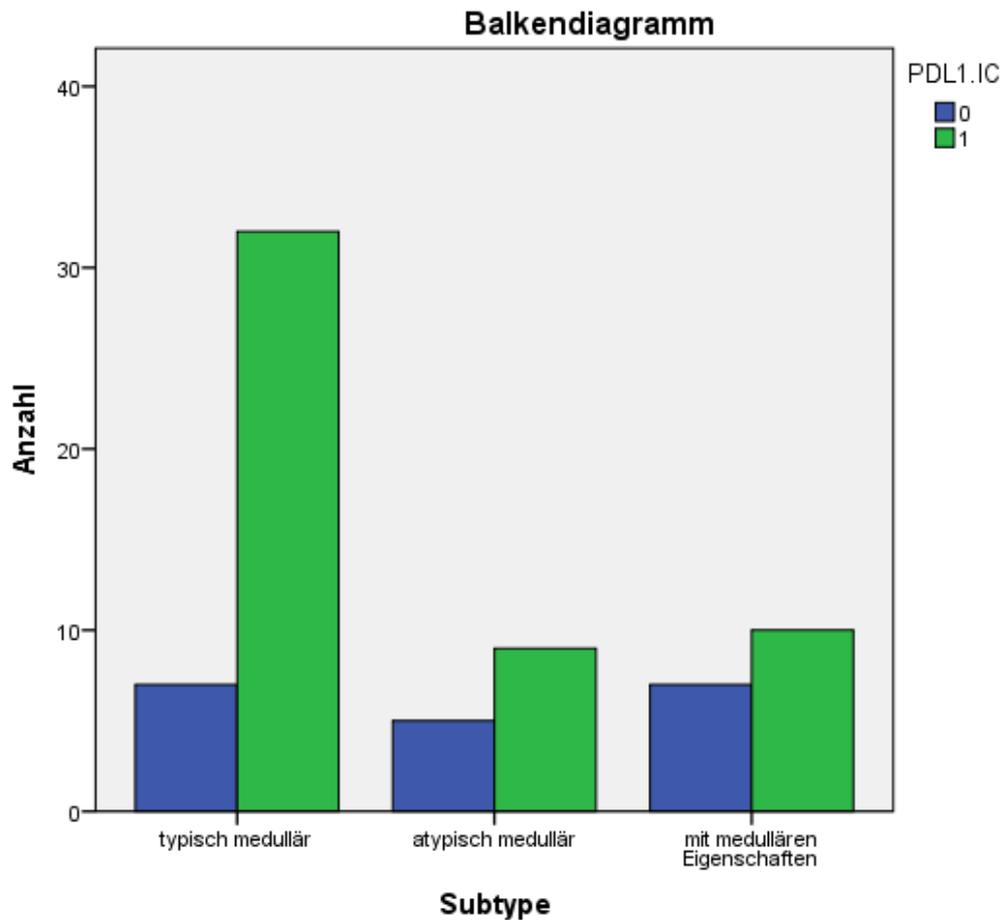


Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung des Immun Cell Scores (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression der Mammakarzinom-Subtypen (0 = PD-L1-negativ, 1 = PD-L1-positiv)

Bei der statistischen Analyse der 70 Fälle wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem PD-L1-IC und der Zugehörigkeit zu den Subtypen (Exakter Test nach Fisher: $p=0,145$) detektiert. Laut Cramers-V war die Stärke des Zusammenhangs zwischen den beiden Variablen als gering zu bewerten ($V=0,235$, siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Statistische Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Immun Cell Score (IC) der Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Expression und der Zugehörigkeit zu den Mammakarzinom-Subtypen

Anzahl gültiger Fälle n=70	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	3,880 ^a	2	,144	,145		
Likelihood-Quotient	3,862	2	,145	,190		
Exakter Test nach Fisher	4,005			,145		
Zusammenhang linear-mit-linear	3,621 ^b	1	,057	,078	,042	,021

Anzahl gültiger Fälle n=70	Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Phi	,235	,145
	Cramer-V	,235	,145
Anzahl der gültigen Fälle	70		

a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,80.

b. Die standardisierte Statistik ist -1,903.

3.6 Korrelationsanalyse – Parameter der Rezeptor-basierten Subgruppen, des Subtyps und der Parameter der Triplex-Färbung

Die Analyse erfolgte mit dem Spearman-Korrelationstest für nicht-parametrische Größen (Tabelle 25). Signifikante Korrelationen ergaben sich natürlicherweise zwischen der Rezeptor-basierten Klassifikation und den darin enthaltenen Parametern HER2, ER, PR und Ki-67 bzw. auch teilweise für diese Parameter untereinander. Weitere signifikante Zusammenhänge bestanden zwischen dem PD-L1-IC-Score und dem FoxP3-IRS (KK=0,317; p=0,007). Ki-67+-Proben zeigten signifikant höhere PD-L1-IC-Scores (KK=0,307; p=0,01) und auch FoxP3-IRS Werte (KK=0,320; p=0,007). Weiter können statistische Trends abgelesen werden (siehe Tabelle 25), die sich bei einer größeren Probandengruppe eventuell als signifikante Unterschiede präsentieren könn-

ten. Dazu zählten die Paare CD3-IRS/FoxP3-IRS ($p=0,060$), PD-L1-IC/Subtyp des Tumors ($p=0,051$), HER2-Expression/Subtyp des Tumors ($p=0,086$) sowie PR-Expression/Subtyp des Tumors ($p=0,092$).

Tabelle 25: Spearman-Korrelationsanalyse – Parameter der Rezeptor-basierten Subgruppen, des histologischen Subtyps und der Triplex-Färbung

Anzahl gültiger Fälle n=70		CD3-IRS	FOXP3-IRS	PD-L1-IC	Rezeptor-basierte Klassifikation	HER2	ER	PR	Subtyp	KI67
CD3-IRS	KK	1,000	,226	,179	-,048	,030	,112	,003	-,121	,072
	Sig. (2-seitig)		,060	,138	,695	,806	,355	,979	,318	,556
FoxP3-IRS	KK	,226	1,000	,317**	,010	-,042	,023	-,029	-,002	,320**
	Sig. (2-seitig)	,060		,007	,936	,731	,848	,810	,987	,007
PD-L1-IC	KK	,179	,317**	1,000	,111	-,127	-,110	,030	-,234	,307**
	Sig. (2-seitig)	,138	,007		,359	,296	,363	,802	,051	,010
Rezeptor-basierte Klassifikation	KK	-,048	,010	,111	1,000	-,386**	-,769**	-,608**	-,170	-,247*
	Sig. (2-seitig)	,695	,936	,359		,001	,000	,000	,159	,039
HER2	KK	,030	-,042	-,127	-,386**	1,000	,337**	,108	,206	,053
	Sig. (2-seitig)	,806	,731	,296	,001		,004	,375	,086	,666
ER	KK	,112	,023	-,110	-,769**	,337**	1,000	,538**	,192	,300*
	Sig. (2-seitig)	,355	,848	,363	,000	,004		,000	,112	,012
PR	KK	,003	-,029	,030	-,608**	,108	,538**	1,000	,203	,298*
	Sig. (2-seitig)	,979	,810	,802	,000	,375	,000		,092	,012
Subtyp	KK	-,121	-,002	-,234	-,170	,206	,192	,203	1,000	-,099
	Sig. (2-seitig)	,318	,987	,051	,159	,086	,112	,092		,413
KI67	KK	,072	,320**	,307**	-,247*	,053	,300*	,298*	-,099	1,00
	Sig. (2-seitig)	,556	,007	,010	,039	,666	,012	,012	,413	

** . Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

* . Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

CD = Cluster of differentiation, ER = Östrogen-Rezeptor, FoxP3 = Forkhead Box Protein 3, HER2 = Human epidermal growth factor receptor 2, KK = Korrelationskoeffizient, PD-L1 = Programmed cell death ligand 1, PR = Progesteron-Rezeptor

3.7 Zusammenhänge zwischen den Parametern der Triplex-Färbung und den Parametern der Rezeptor-basierten Klassifikation

Weiter wurden mögliche Korrelationen zwischen den Parametern der Triplex-Färbung und den Standardrezeptoren untersucht. Dazu wurden der Phi- und der Cramer-V-Wert ermittelt. Bei signifikanten Zusammenhängen wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt.

3.7.1 CD3 versus Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation

Tabelle 26 stellt die CD3-IRS-Werte in Abhängigkeit von der Expression der Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation dar. Es wurden keine Hinweise auf signifikante Zusammenhänge gefunden.

Tabelle 26: Cluster of differentiation (CD3) Immune reactive Score (IRS) Werte in Abhängigkeit von der Expression der Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation – Kreuztabellen und statistische Zusammenhänge

		HER2 negativ	HER2 positiv	Gesamt
CD3-IRS	1	2	1	3
	2	9	0	9
	4	16	7	23
	6	18	6	24
	9	9	2	11
	Gesamt	54	16	70
Anzahl der gültigen-Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl.	Phi	,233	,434	,463
Nominalmaß	Cramer-V	,233	,434	,463
		ER negativ	ER positiv	Gesamt
CD3-IRS	1	3	0	3
	2	7	2	9
	4	12	11	23
	6	15	9	24
	9	6	5	11
	Gesamt	43	27	70
Anzahl der gültigen-Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl.	Phi	,238	,411	,425
Nominalmaß	Cramer-V	,238	,411	,425

		PR negativ	PR positiv	Gesamt
CD3-IRS	1	3	0	3
	2	7	2	9
	4	14	9	23
	6	18	6	24
	9	8	3	11
	Gesamt	50	20	70
Anzahl der gültigen-Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl.	Phi	,200	,593	,639
Nominalmaß	Cramer-V	,200	,593	,639
		KI67 negativ	KI67 positiv	Gesamt
CD3-IRS	1	3	0	3
	2	6	3	9
	4	8	15	23
	6	11	13	24
	9	6	5	11
	Gesamt	34	36	70
Anzahl der gültigen-Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl.	Phi	,301	,175	,181
Nominalmaß	Cramer-V	,301	,175	,181

ER = Östrogen-Rezeptor, HER2 = Human epidermal growth factor receptor 2, PR = Progesteron-Rezeptor

3.7.2 FoxP3 versus Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation

Tabelle 27 stellt die FoxP3-IRS-Werte in Abhängigkeit von der Expression der Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation dar.

Tabelle 27: Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Immune reactive Score (IRS) Werte in Abhängigkeit von der Expression der Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation – Kreuztabellen und statistische Zusammenhänge

		HER2 negativ	HER2 positiv	Gesamt
FoxP3-IRS	0	2	1	3
	1	6	1	7
	2	15	6	21
	3	10	3	13
	4	3	0	3
	6	18	5	23
	Gesamt	54	16	70
Anzahl der gültigen-Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Phi	,159	,880	,911
	Cramer-V	,159	,880	,911
		ER negativ	ER positiv	Gesamt
FoxP3-IRS	0	3	0	3
	1	5	2	7
	2	12	9	21
	3	6	7	13
	4	1	2	3
	6	16	7	23
	Gesamt	43	27	70
Anzahl der gültigen-Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Phi	,274	,384	,398
	Cramer-V	,274	,384	,398
		PR negativ	PR positiv	Gesamt
FoxP3-IRS	0	3	0	3
	1	5	2	7
	2	14	7	21
	3	8	5	13
	4	2	1	3
	6	18	5	23
	Gesamt	50	20	70
Anzahl der gültigen-Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Phi	,193	,759	,806
	Cramer-V	,193	,759	,806

		Ki67 negativ	Ki67 positiv	Gesamt
FoxP3-IRS	0	3	0	3
	1	5	2	7
	2	11	10	21
	3	8	5	13
	4	0	3	3
	6	7	16	23
	Gesamt	34	36	70
Anzahl der gültigen-Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl.	Phi	,405	,042	,031
Nominalmaß	Cramer-V	,405	,042	,031

ER = Östrogen-Rezeptor, HER2 = Human epidermal growth factor receptor 2, PR = Progesteron-Rezeptor

Die Analyse deutete auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem FoxP3-IRS-Wert und dem Ki-67-Wert hin (näherungsweise Signifikanz: Phi und Cramers-V 0,042; statistische Signifikanz: Phi und Cramers-V 0,031). Die asymptotische zweiseitige Signifikanz des Likelihood-Quotienten ergab 0,016 und die zweiseitige exakte Signifikanz dieses Quotienten betrug 0,026. Im exakten Test nach Fisher betrug die exakte zweiseitige Signifikanz 0,040 und der lineare Zusammenhang lag zweiseitig bei 0,007 und einseitig bei 0,004 (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28: Statistische Analyse des potentiellen Zusammenhangs zwischen den Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) Immune reactive Score (IRS) Werten und dem Ki-67-Wert

Anzahl gültiger Fälle n=70	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	11,500 ^a	5	,042	,031		
Likelihood-Quotient	13,953	5	,016	,026		
Exakter Test nach Fisher	10,608			,040		
Zusammenhang linear-mit-linear	7,334 ^b	1	,007	,007	,004	,001

a. 6 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,46.

b. Die standardisierte Statistik ist 2,708.

3.7.3 PD-L1 versus Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation

Tabelle 29 stellt die PD-L1-IC-Werte in Abhängigkeit von der Expression der Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation dar.

Tabelle 29: Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Immun Cell (IC) Score Werte in Abhängigkeit von der Expression der Parameter der Rezeptor-basierten Klassifikation – Kreuztabellen und statistische Zusammenhänge

		HER2 negativ	HER2 positiv	Gesamt
PD-L1-IC	0	13	6	19
	1	41	10	51
	Gesamt	54	16	70
Anzahl der gültigen-Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl.	Phi	-,127	,289	,343
Nominalmaß	Cramer-V	,127	,289	,343
		ER negativ	ER positiv	Gesamt
PD-L1-IC	0	10	9	19
	1	33	18	51
	Gesamt	43	27	70
Anzahl der gültigen-Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl.	Phi	-,110	,356	,414
Nominalmaß	Cramer-V	,110	,356	,414
		PR negativ	PR positiv	Gesamt
PD-L1-IC	0	14	5	19
	1	36	15	51
	Gesamt	50	20	70
Anzahl der gültigen-Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl.	Phi	,030	,799	1,000
Nominalmaß	Cramer-V	,030	,799	1,000
		KI67 negativ	KI67 positiv	Gesamt
PD-L1-IC	0	14	5	19
	1	20	31	51
	Gesamt	34	36	70
Anzahl der gültigen-Fälle n=70		Wert	Näherungsweise Signifikanz	Exakte Signifikanz
Nominal- bzgl.	Phi	,307	,010	,015
Nominalmaß	Cramer-V	,307	,010	,015

ER = Östrogen-Rezeptor, HER2 = Human epidermal growth factor receptor 2, PR = Progesteron-Rezeptor

Die Analyse deutete auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem PD-L1-IC-Wert und dem Ki-67-Wert hin (näherungsweise Signifikanz: Phi und Cramers-V 0,010; statistische Signifikanz: Phi und Cramers-V 0,015). Die asymptotische zweiseitige Signifikanz des Likelihood-Quotienten ergab 0,009 und die zweiseitige exakte Signifikanz dieses Quotienten betrug 0,015. Im exakten Test nach Fisher betrug die exakte zweiseitige Signifikanz 0,011 und der lineare Zusammenhang lag zweiseitig bei 0,015 und einseitig bei 0,010 (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Statistische Analyse des potentiellen Zusammenhangs zwischen den Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Immun Cell (IC) Score Werten und dem Ki-67-Wert

Anzahl gültiger Fälle n=70	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	6,584 ^a	1	,010	,015	,010	
Kontinuitätskorrektur	5,276	1	,022			
Likelihood-Quotient	6,773	1	,009	,015	,010	
Exakter Test nach Fisher				,015	,010	
Zusammenhang linear-mit-linear	6,490 ^c	1	,011	,015	,010	,008

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 9,23.

b. Wird nur für eine 2 x 2-Tabelle berechnet

c. Die standardisierte Statistik ist 2,548.

4 Diskussion

4.1 Fragestellung und experimenteller Kontext

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zur Optimierung der Prognose und damit der therapeutischen Versorgung von Patientinnen mit „IBC-NST mit medullärer Struktur (früher „medulläre Mammakarzinome“ mit den Subgruppen „medulläres Mammakarzinom“, „atypisch medulläres Mammakarzinom“ und „invasives Mammakarzinom NST mit medullären Merkmalen“) leisten. Dazu wurde die Expression dreier immunonkologischer Biomarker (CD3, FoxP3 und PD-L1) mittels einer neuen Triplex-Färbung bestimmt. Mit Hilfe dieser Biomarker lassen sich möglicherweise biologische Eigenschaften des medullären Mammakarzinoms identifizieren und Informationen über die Erkrankungssituation generieren. Potentiell ergeben sich aus den Daten auch Ansatzpunkte für zukünftige Therapien oder prognostische Muster.

Die Messung der drei Biomarker (CD3, FoxP3 und PD-L1) in einer Färbung am selben Gewebeschnitt garantierte eine hohe Präzision, eine intensive Nachbarschaftsanalyse der entsprechenden Biomarker und ermöglichte eine Einteilung medullärer Mammakarzinome über die rein histomorphologische Subtypisierung hinaus.

Medulläre Mammakarzinome wurden von der WHO bis 2019 als eigener histologischer Subtyp mit tendenziell günstiger Prognose eingestuft. Da inzwischen bekannt ist, dass es sich dabei um eine heterogene Gruppe von Karzinomen mit unterschiedlichem Outcome handelt, erfolgte 2019 eine Neueinordnung durch die WHO. Aktuell werden medulläre Mammakarzinome tendenziell eher aggressiv behandelt. Eine verbesserte Subtypisierung und ein daraus resultierendes optimiertes und besser auf die einzelne Patientin und ihren Tumor abgestimmtes adjuvantes Behandlungsregime bzw. eine „targeted therapy“ ermöglichen ein wahrscheinlich nebenwirkungsärmeres Vorgehen, das die aggressiven Ansätze (z. B. Chemotherapien) ersetzen könnte.

In dieser Dissertation wurden mögliche Zielmoleküle solcher innovativer Therapien untersucht [142]. Analysiert werden sollte, ob CD3, FoxP3 und PD-L1 im Tumorgewebe medullärer Mammakarzinome nachweisbar sind und ob diese Biomarker einen prognostischen und somit möglicherweise einen therapeutischen Nutzen haben könnten. Weiter wurde die Expression dieser Biomarker in den Rezeptor-basierten molekularen Subklassen und histologischen Subgruppen des medullären Mammakarzinoms analysiert. Die Untersuchung der Expression der Biomarker lieferte auch neue Erkenntnisse

zur Tumormikroumgebung von medullärem Brustkrebs, die bei der Implementierung einer „targeted therapy“ hilfreich sein könnten.

Für die Analysen wurden die Gewebeproben von 70 Patientinnen, die in der Frauenklinik München und den Kliniken der LMU aufgrund von medullären Mammakarzinomen in Behandlung waren, untersucht. Deren Gewebeproben wurden für die Experimente neu aufgearbeitet, mikroskopisch begutachtet und histologisch in die Subtypen „medulläres Mammakarzinom“, „atypisch medulläres Mammakarzinom“ und „Mammakarzinom NST mit medullären Eigenschaften“ eingeordnet. Weiter nahm man die diagnostisch und therapeutisch wichtige Rezeptor-basierte molekulare Subklassifizierung vor. Die Gewebeschnitte aller Patientinnen wurden einer Triplex-Färbung (CD3, FoxP3 und PD-L1) unterzogen. Alle Gewebeschnitte waren auswertbar und wurden entsprechend der Scoring-Systeme (siehe Kapitel 2) beurteilt.

4.2 Expression der Biomarker im Tumorgewebe

Die vorliegenden Experimente belegen die Existenz der Biomarker (CD3, FoxP3 und PD-L1) im Gewebe von medullären Mammakarzinomen. Zwar waren nicht immer alle Biomarker gleichzeitig in einer Gewebeprobe nachweisbar, dennoch waren sie in medullären Brusttumoren aber grundsätzlich vorhanden. Zwischen 1980–1990 galten Mammakarzinome als immuntherapeutisch „kalte“ Karzinome. Speziell bei den TNBC kam es aber in den vergangenen Jahren zu enormen Fortschritten im Bereich der Immuntherapie. Bei diesen neuen Therapieansätzen spielen häufig die hier untersuchten Biomarker eine Rolle [215, 216].

Koletsa et al. studierten 2020 die stromale und intratumorale Expression von CD3, CD8 und FoxP3 bei nach der Rezeptor-basierten Klassifizierung eingeteilten Mammakarzinom-Patientinnen. Diese für Tumor infiltrierende Lymphozyten (TILs) spezifischen Marker stellen grundsätzlich wertvolle prognostische Faktoren dar. In der Studie war jedoch ihre stromale und intratumorale Expression nicht signifikant verschieden. Die Autoren vermuteten, dass sich die Ergebnisse durch die Implementierung des Ki-67-Index und histologische Subtypisierungen verbessern lassen [217].

In der vorliegenden Dissertation wurden sowohl die Ki-67-Expression als auch die histologischen Subtypen von Mammakarzinomen in die Analyse der Gewebeproben einbezogen und es zeigt sich in den gemachten Experimenten ein statistisch signifikanter

Zusammenhang zwischen Ki-67 Positivität und erhöhten PD-L1 (KK=0,307; p=0,010) bzw. FoxP3 (KK=0,320; p=0,007) Werten (siehe Kapitel 3.6, Tabelle 25).

FoxP3

Der Körper reagiert auf einen Tumor in der Regel mit einer Immunantwort; diese kann aber auch das Tumorstadium fördern, denn wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 1.4.7) beeinflusst FoxP3 durch Expression von diversen Proteinen (Interleukin 2, Interleukin 17, Interferon- γ) die Wirksamkeit von Effektor- und Helfer- T-Zellen negativ und expandiert die Tregs, welche das angeborene und adaptive Immunsystem dämpfen.

Bei Leber- und Ovarialkarzinomen ist ein hoher FoxP3-Wert im Tumorgewebe mit einem schlechteren Überleben assoziiert [218]. Laut Demir et al. und Takenaka et al. ist eine FoxP3-Expression im malignen Gewebe ein negativer prognostischer Marker [219–221]. Ultraviolettes Licht fördert die Ausbildung von potentiell Hautkrebs verursachenden FoxP3+-Zellen in den oberen Hautschichten. Beim Virus-induzierten Zervixkarzinom fördert FoxP3 die Entwicklung maligner Zellen. Damit spielt dieser Biomarker auch eine Rolle bei der Virus-Krebs-Achse [222–224].

Bei Mammakarzinomen scheint ein hoher FoxP3-IRS-Wert ebenfalls einen negativen Effekt auf mögliche Rezidive und das Überleben zu haben. Dies gilt vor allem, wenn FoxP3 im tumorumgebenden Lymphinfiltrat und damit in der Tumormikroumgebung auftritt [218, 225, 226]. FoxP3+-Zellen wurden im Tumor selbst, im umliegenden Stroma und in Tumor-drainierenden Lymphknoten von Mammakarzinomen detektiert [227]. In einer Meta-Analyse mit 14 Mammakarzinom-Studien und insgesamt 10.259 Patienten war eine hohe Infiltrationsrate des Tumors mit FoxP3+-Zellen mit einem tendenziell schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. Ein hoher FoxP3-IRS korrelierte mit einem hohen histologischen Grad, einer ER-/HER2-Negativität und einem kurzen rezidivfreien Überleben [219]. Dagegen zeigte FoxP3 keinen Effekt auf das Überleben bei analen Plattenepithelkarzinomen [218, 228] oder auf die Prognose bei Nierenkrebs [224, 229]. Laut Sun et al. und Kim et al. besitzt FoxP3 auch beim Mammakarzinom keinen prognostischen Wert [219, 230, 231]. Bei follikulären Lymphomen oder Karzinomen im Kopf- und Nackenbereich korreliert ein hoher FoxP3-IRS dagegen positiv mit dem Überleben [218, 232, 233]. Nach Carreras et al. war auch beim follikulären Lymphom die Infiltration FoxP3+-T-Zellen mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert [232].

Bei hämatologischen Malignitäten bedeutet ein hoher FoxP3-Gehalt eine bessere Prognose [232, 234]. In einer chinesischen Meta-Analyse (17 Studien, 3811 Patienten) zu kolorektalen Karzinomen bestand eine positive Korrelation zwischen einem hohen FoxP3-IRS im Infiltrat des Tumors und dem 1-, 3-, 5- und 10-Jahres-Überleben, nicht aber zum krankheitsfreien Überleben [235].

Laut Higgins et al. kann FoxP3 bei Brustkrebs als positiver Biomarker dienen [219, 236], da er Tumorsuppressor-Eigenschaften aufweist. Die Unterdrückung der FoxP3-Expression führt zur Dysregulation von diversen Onkogenen, welche die Progression von Brustkrebs fördern. Weiter spielt FoxP3 bei der Metastasierung von Mammakarzinomen eine Rolle [177, 237–242].

In der hier vorliegenden Dissertation korrelierte statistisch signifikant, wie bereits erwähnt, ein hoher FoxP3 IRS mit hohen PD-L1 IC Werten (KK=0,317; $p=0,007$) und Ki-67 Positivität (KK=0,320; $p=0,007$) (siehe Kapitel 3.6, Tabelle 25). Sowohl eine große Wachstumsfraktion der Tumorzellen als auch hohe PD-L1 Werte werden als negative Prognosemarker angesehen.

CD3

Auch das Vorhandensein von CD3⁺-Zellen im Tumorgewebe hat verschiedene Auswirkungen.

Obwohl CD3 eigentlich eine Aktivierung der endogenen T-Zellen verursacht und die Ausschaltung von CD3⁺ Zellen eine eigene Immunantwort (z. B. bei Organtransplantationen) unterdrückt, scheinen CD3⁺ Zellen dennoch ein negativer Prognosemarker zu sein (siehe Kapitel 1.4.7). Die Anzahl der CD3⁺-T-Zellen in einem Tumorgewebe korreliert nämlich positiv mit der Tumorgröße. Möglicherweise wird mit wachsender Tumorgröße mehr CD3 exprimiert. Mit einem hohen IRS-CD3 steigt die Wahrscheinlichkeit eines Lymphknotenbefalls bei Brustkrebspatientinnen [243].

In der hier vorgelegten Arbeit stellt CD3 den einzigen Biomarker der Triplex-Färbung dar, der keinerlei statistisch signifikante Korrelationen aufweisen konnte.

PD-L1

PD-L1 wurde als ein hoffnungsvoller Biomarker in Mammakarzinomen identifiziert.

Im gesunden Gewebe stellt PD-L1 Positivität einer Zelle nämlich einen Schutz vor autoreaktiven T-Zellen dar und verhindert so die zytotoxische Lyse dieser PD-L1 exprimierenden Zelle. Das kann bei malignen Zellen, die ebenfalls PD-L1+ sind allerdings fatal sein.

Vor allem in TNBC dient PD-L1 als Ansatzpunkt für Immun-Checkpoint-Inhibitor-(ICI)-Therapien. Ursprünglich wurde dieser Biomarker aber bei der Behandlung von Lungenkarzinomen verwendet [244, 245]. Die ICI-Behandlung hat sich vor allem in der NSCLC- und Melanom-Therapie etabliert. Weitere vielversprechende Ansätze zielen auf die Behandlung von Hals- und Kopfkarzinomen, Nierentumoren, gastrischen und ösophagealen Karzinomen, kolorektalen Karzinomen, hepatozellulären Malignitäten, Endometriumkarzinomen und auf TNBC ab [246]. Studien dokumentieren eine häufig hohe PD-L1-Expression in soliden Tumoren (z. B. Lungenkrebs, Melanome, Ovarialkarzinome und Kolonkarzinome) [181, 247].

In PD-L1 überexprimierenden Tumoren zeigt eine PD-L1-AK-Therapie eine deutliche Wirksamkeit [187, 248], da sie die PD-1/PD-L1-vermittelte Immunsuppression während der Tumorgenese hemmt [181, 247]. Eine verstärkte Expression von PD-L1 auf Tumorzellen und des zugehörigen Rezeptors PD-1 in der Tumormikroumgebung fördert über eine verringerte Aktivität der T-Zellen die Tumorprogression. Eine ICI-Therapie mit PD-L1-AK verhindert die Bindung des PD-L1 auf Tumorzellen an PD-1 auf der T-Zellenmembran und stellt so den Antitumoreffekt von T-Zellen wieder her [249–251]. PD-L1 fördert die Apoptose von aktivierten gegen den Tumor gerichteten T-Zellen und unterdrückt somit die körpereigene Anti-Tumor-Immunantwort. Physiologischerweise wird PD-L1 in den meisten Geweben, mit Ausnahme von Makrophagen in den Tonsillen, der Leber und der Lunge, kaum exprimiert. Die Expression in verschiedenen Tumorentitäten schwächt die T-Zellen Antwort [181, 247, 252].

Die Wirksamkeit von PD-L1-ICI nimmt mit der Expression von PD-L1 im Tumor zu. Dies gilt vor allem beim Vorhandensein von Metastasen oder von mehr als 5 % PD-L1+-Zellen im Tumor [253, 254]. Daher ist eine ICI-Therapie insbesondere in fortgeschrittenen Krebsstadien vorteilhaft [249, 255, 256]. Bei der ICI-Therapie besteht aber ein großes Risiko für schwere bzw. fatale Nebenwirkungen, da sie auch auf gesunde Organe wirkt. Weitere Nachteile sind die komplexen Produktionsprozesse, die hohen Produktionskosten und die strengen Lagerrichtlinien der Medikamente. Zudem ist der

ICI-Blockade-Effekt häufig transient, da der Tumor sekundäre Resistenzmechanismen entwickelt [251, 257–263].

Derzeit werden Möglichkeiten untersucht, durch ICI-Kombinationsbehandlungen synergistische Effekte zu erzielen.

Die hochtoxische Chemotherapie bildete lange Zeit das Rückgrat der nicht-operativen Krebsbehandlung insbesondere auch bei TNBC. Eine neue Therapiemöglichkeit ist eine Kombination aus Chemotherapie und ICI, wodurch sich möglicherweise die extreme Toxizität von Chemotherapien verringern lässt [264].

Derzeit sind neun PD-1/PD-L1-Inhibitor-Medikamente auf dem Markt. Dazu zählen sechs PD-1-Inhibitoren (Pembrolizumab, Nivolumab, Cemiplimab, Toripalimab, Sintilimab, Camrelizumab) und drei PD-L1-Inhibitoren (Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab) [265].

Exemplarisch soll hier für eine Anti-PD-L1-Therapie das gut etablierte Atezolizumab besprochen werden. Atezolizumab ist ein humanisierter, monoklonaler, Immunglobulin G1 (IgG1) AK. Er verhindert die Bindung von auf Tumorzellen exprimiertem PD-L1 an PD-1 auf T-Zellen und somit die Repression der Anti-Tumor-T-Zellantwort. Atezolizumab ist gut verträglich und zeigt gute klinische Ergebnisse bei metastasiertem TNBC [266]. Als möglicher Partner einer Kombinationstherapie mit PD-L1-AK kommen Platinbasierte Chemotherapeutika (Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin) in Frage. Diese Medikamente zeigen jedoch zahlreiche Nebenwirkungen (z. B. Myelosuppression, Nephrotoxizität, Neurotoxizität, gastrointestinale Reaktionen, Anaphylaxie und Zytopenie (Leukopenie, Neutropenie, Thrombozytopenie und Anämie)). Außerdem werden zunehmende Therapieresistenzen bei Chemotherapien beobachtet [265, 267, 268].

Auch Platinbasierte Chemotherapien zeigen immunmodulierende Effekte. Sie erhöhen den Immunogenic cell death (ICD) durch die Aktivierung von T-Zellen. Unter Platin-Therapie steigt die Zahl der gegen den Tumor gerichteten zytotoxischen T-Zellen (CTL), während die Anzahl immunsuppressiver T-Zellen sinkt. Diese Effekte erhöhen vermutlich die Sensibilität des Tumors gegenüber PD-1/PD-L1-Inhibitoren. Zu berücksichtigen ist aber auch, dass Platinbasierte Therapien die PD-L1-Expression verstärken, was durch die ICI ausgeglichen werden kann.

Zur Etablierung effektiver und nebenwirkungsarmer Therapieregime ist die Analyse der im Rahmen von Kombinationstherapien auftretenden wechselseitigen Effekte unverzichtbar [265].

Wie bereits erwähnt, gibt es bei der hier vorliegenden Dissertation statistische Signifikanzen von PD-L1 Positivität und einem positiven Ki-67 Wert (KK=0,307; $p=0,010$). Das lässt sich auch deutlich durch die Wirkung von PD-L1 erklären. Dadurch, dass die malignen Zellen, die PD-L1 exprimieren nicht durch autotoxische Zellen vom Körper geklärt werden können, haben sie die Möglichkeit in einer großen Anzahl in die Wachstumsphase zu wechseln.

Ebenso besteht in den hier gemachten Experimenten ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen hohen PD-L1 IC Werten und hohen FoxP3 Scores (KK=0,317; $p=0,007$) (siehe Kapitel 3.6, Tabelle 25). Mit einer erhöhten Expression von FoxP3 und PD-L1 auf den malignen Zellen, versucht der Tumor wahrscheinlich einer Immunantwort optimal zu entkommen, da beide Marker dämpfend auf das eigene Immunsystem einwirken (siehe Kapitel 1.4.7).

4.3 Zusammenhang der Biomarkerexpression mit der Rezeptor-basierten Klassifikation medullärer Mammakarzinome

In dieser Studie wurde auch überprüft, ob zwischen der Expression der Biomarker und der Rezeptor-basierten Einteilung der medullären Mammakarzinome ein Zusammenhang besteht. Die Hälfte (50 %) der Biopsien waren „TNBC“. Dieses Ergebnis spiegelt die molekulare Charakterisierung medullärer Mammakarzinome wider, wonach medulläre Brustkrebsformen grundsätzlich mit einer PR-, ER- und HER2-Negativität assoziiert sind [198].

Im vorliegenden Kollektiv dominierten beim CD3-IRS-Score die Werte 4 und 6. CD3-negative Biopsien kamen nicht vor. Die Höhe des CD3-IRS-Scores korrelierte nicht mit der Zugehörigkeit der Biopsien zu den Rezeptor-basierten Subtypen. Auch der FoxP3-IRS war nicht signifikant mit den Rezeptor-basierten Subtypen assoziiert; am häufigsten zeigten die Biopsien FoxP3-IRS-Werte von 2 und 6. In drei Gewebeproben war kein FoxP3 nachweisbar. Dagegen traten PD-L1+-Tumoren signifikant häufiger in den als „triple negative“ und „Luminal B mit HER2 negativ“ klassifizierten Karzinomen auf ($p=0,019$) (siehe Kapitel 3.5.3, Tabelle 22).

Früher wurden Mammakarzinome vor allem nach histopathologischen Kennzeichen klassifiziert. Inzwischen werden neben histopathologischen insbesondere molekulare Charakteristika berücksichtigt. Medulläre Mammatumoren werden aktuell zu den NST-

Brustkrebsformen gestellt. Ein zusätzliches Klassifizierungsmerkmal ist die hohe Anzahl Tumor-infiltrierender Lymphozyten [269].

TNBC mit einem hohen CD3-IRS-Wert reagieren gut auf eine neoadjuvante Chemotherapie. Eine Bestimmung der CD3-Expression bei TNBC verbessert somit die Prognoseeinschätzung und erleichtert die Therapieplanung [270]. Laut einer weiteren Studie zeigen TNBC bei einer eingeschränkten FoxP3-Expression verstärkte lymphatische und angioinvasive Vorgänge im Tumorgewebe, sowie eine stärkere Metastasierung in den Lymphknoten [271].

TNBC weisen unabhängig von ihrem histologischen Subtyp aufgrund ihres aggressiven Wachstumsverhaltens und wegen fehlender Ansatzpunkte für gängige Immuntherapien (PR, ER und HER2) eine schlechte Prognose auf. PD-1/PD-L1-ICI haben dieses Bild teilweise verändert [272, 273]. Bei (metastasierten) TNBC werden diese ICI im Rahmen von Mono- oder Kombinationstherapien eingesetzt. Durch die toxischen Effekte der Kombinationen mit ICI kann es jedoch auch zu Todesfällen kommen. Eine Kombinationstherapie aus Atezolizumab und Chemotherapeutika zeigt in TNBC nur bei hohen PD-L1-Spiegeln eine bessere Wirksamkeit. Außerdem wirkt diese Therapie auf ER+-Tumoren [253]. In TNBC wird PD-L1 vermutlich stärker exprimiert als in anderen Tumoren, da sie eine größere Stammzellfähigkeit besitzen [248, 274, 275].

Laut Yilmaz et al. ist die Rezeptor-basierte Klassifizierung für die Prognose einer Brustkrebserkrankung wichtiger als die Histologie [276].

4.4 Zusammenhang der Biomarkerexpression mit der histologischen Klassifikation medullärer Mammakarzinome

Zudem wurde in der vorliegenden Studie überprüft, ob zwischen der Expression der Biomarker und der ehemaligen histologischen Einteilung der medullären Mammakarzinome ein Zusammenhang besteht. In diesem Kollektiv waren die typisch medullären Mammakarzinome mit 55,7 % am häufigsten vertreten. Dagegen wird in der Literatur vermutet, dass nur ein Bruchteil der Mammakarzinome, die als medulläre Karzinome diagnostiziert werden, dem typisch medullären Mammakarzinom entsprechen [277]. Bei der hier verwendeten Einteilung von Ridolfi et al. von 1977 gibt es neben den typisch medullären Mammakarzinomen noch zwei weitere Gruppen (atypisch medulläre

Mammakarzinome, Mammakarzinome NST mit medullären Eigenschaften, siehe Kapitel 1.4.1). Diese zusätzliche Unterscheidung wird in der Literatur häufig nicht gemacht [197, 199, 278].

In der vorliegenden Abhandlung traten Mammakarzinome NST mit medullären Eigenschaften etwas häufiger auf als atypisch medulläre Mammakarzinome (24,3 % versus 20 %).

Weiter wichen die Ergebnisse bezüglich des Gesamtüberlebens von publizierten Literaturdaten ab. Beim „atypisch medullären Mammakarzinom“ erreichten die Patientinnen in drei der vier Rezeptor-basierten Kategorien die maximale Überlebenszeit von 16 Jahren. Patientinnen mit „atypisch medullären Mammakarzinomen“ schienen länger zu überleben als Patientinnen mit „typisch medullären Mammakarzinomen“ bzw. „Mammakarzinomen NST mit medullären Eigenschaften“. Dagegen postulierten Qin et al., dass typisch medulläre Karzinome ein besseres Gesamtüberleben besitzen als atypisch medulläre Mammakarzinome [212].

Bei der Bewertung der Befunde ist die hohe „Lost to Follow up“ Rate in der vorliegenden Studie zu berücksichtigen, wodurch es zu Verzerrungen der Überlebensraten gekommen sein kann. Daher wurde auch auf eine Analyse einer potentiellen Assoziation zwischen der CD3-, FoxP3- und PD-L1-Expression und dem Gesamtüberleben verzichtet.

Im hier verwendeten Kollektiv bestand zudem, wie bereits erwähnt, keine signifikante Korrelation zwischen den CD3- bzw. FoxP3-IRS-Werten und der Zugehörigkeit zu einem histologischen Subtyp. In allen Gruppen waren die IRS-Werte beider Biomarker heterogen verteilt. Dagegen war bei den typisch medullären Mammakarzinomen der PD-L1-IC-Score tendenziell höher, dieser Zusammenhang verfehlte mit einem $p=0,051$ nur knapp die statistische Signifikanz. Weiter waren bei den typisch medullären Mammakarzinomen tendenziell häufiger HER2- und PR-negative Tumoren vertreten ($p=0,086$ bzw. $0,092$). Dieser Befund deckt sich mit Literaturergebnissen, wonach viele typisch medulläre Mammakarzinome „TNBC“ und damit auch HER2- und PR-negativ sind [198].

Laut Literatur rückt die histologische Klassifizierung vor allem bei TNBC gegenüber der molekularen Subtypisierung bei der Diagnose- und Prognosestellung in den Hintergrund. Dennoch kann auch die Histologie in diesem Kontext einen wertvollen Beitrag liefern [207].

Medulläre Karzinome haben eine Tendenz zur besseren Prognose als duktale Mammakarzinome (heute invasive Mammakarzinome NST), obwohl sie eine höhere Expression des für Brustkrebs negativen Prognosemarkers FoxP3 aufweisen. Bei medullären Mammakarzinomen scheint weniger die Anzahl intratumoraler FoxP3+-Zellen als die Ratio von CD8+- und FoxP3+-T-Zellen entscheidend zu sein. Im Kapitel 4.5 und dem Resümee wird die Bedeutung dieser Ratio noch einmal aufgeführt [218, 225, 279].

In einer Studie zur PD-L1-Expression in TNBC, exprimierten in der Gruppe der medullären Mammakarzinome 83,3 % diesen Biomarker [280], wobei bei den TNBC insgesamt nur 20 % der Fälle PD-L1+ waren [281]. Weiter bestand eine positive Korrelation bei Brustkrebs allgemein zwischen PD-L1 und dem Proliferationsindex Ki-67 [280]. Dieser Zusammenhang wurde auch in der vorliegenden Arbeit detektiert.

Laut der quantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion-(RT-PCR) - Validierungsstudie mit 526 Patienten von Romero et al. handelt es sich beim medullären Mammakarzinom um eine eigene abgrenzbare Entität. Genetische Kennzeichen sind im Vergleich zu anderen Mammakarzinomen eine Überexpression von 92 Genen und eine verminderte Expression von 154 Genen. Vor allem das pro-apoptotische Gen BCL2L4 wurde im medullären Brustkrebsgewebe verstärkt exprimiert. Zudem wiesen die medullären Karzinome eine höhere Rate an Mutationen im Gen für den Tumorsuppressor p53 auf [282].

Da sich die Prognose und Behandlung von medullären Mammakarzinomen und anderen histologischen Subtypen mit gleichem Grading stark unterscheidet, schlagen Zhang et al. vor, diesen histologischen Subtyp als eigenständige Diagnose zu behalten [283]. Laut Kim et al. weisen medulläre, aber auch metaplastische Karzinome ein abweichendes Verhalten gegenüber anderen Mammakarzinomen, die ebenfalls als NST klassifiziert werden, auf. Obwohl medulläre Mammakarzinome häufig „TNBC“ sind, haben sie generell bessere Überlebenschancen [207].

Laut den genetischen Analysen von Gulbahce et al. gehören medulläre und metaplastische Karzinome in die Gruppe jener Karzinome die „high risk“ Gene exprimieren. Dieser Befund spricht dafür, dass die Histologie doch eine eigene Gruppe an medullären Mammakarzinomen definiert. Die Tatsache, dass sich die Prognosen von medullären und metaplastischen Mammakarzinomen trotz einer vergleichbaren genetischen

Ausstattung stark unterscheiden, wirft die Frage nach den Ursachen für diesen Unterschied auf; darauf wird auch in Kapitel 4.5 und dem Resümee näher eingegangen [284].

Laut einem systematischen Review mit 15 Studien und 6404 Patientinnen profitieren bei Patientinnen mit TNBC vor allem die Fälle mit medullären Mammakarzinomen von einer Chemotherapie, da sie reich an TILs sind und somit eine günstige Tumormikroumgebung aufweisen [212]. Möglicherweise ist dies also der entscheidende Faktor für die tendenziell bessere Prognose der histologischen Gruppe der medullären Mammakarzinome (siehe Kapitel 1.5.4). Eine Lymphozyten-reiche Tumorumgebung und Tumorzusammensetzung stellt bei Ridolfi et al. ein Kriterium (Kriterium 5., siehe Kapitel 1.5.2) für die Klassifizierung eines Tumors als medulläres Mammakarzinom dar [197, 285].

Diese Überlegungen rechtfertigen die Analysen der vorliegenden Dissertation, auch wenn zwischen dem Marker CD3 und der histologischen Einteilung offensichtlich keine Assoziation besteht und es sich nach den WHO-Richtlinien um eine überholte Klassifizierung handelt.

4.5 Tumormikroumgebung und Tumormikrozusammensetzung

Die vorliegende Studie adressierte auch die Frage nach der Tumormikroumgebung medullärer Karzinome, da bei der Auswertung nicht zwischen Tumor- und Stromazellen unterschieden wurde. In den untersuchten Biopsien korrelierte, wie mehrfach erwähnt, die PD-L1- und FoxP3-Expression signifikant ($p=0,007$). Je mehr PD-L1+-Zellen im Gewebe nachgewiesen wurden, umso größer war der FoxP3-IRS. Außerdem bestand eine positive Korrelation zwischen der FoxP3- und Ki-67-Expression ($p=0,007$) sowie der PD-L1- und Ki-67-Expression ($p=0,010$) (siehe Kapitel 3.6, Tabelle 25).

Weitere mögliche Korrelationen zwischen den verschiedenen Parametern verfehlten die statistische Signifikanz möglicherweise aufgrund der geringen Subgruppenbesetzung. Ein tendenziell positiver Zusammenhang bestand zwischen dem CD3- und FoxP3-IRS ($p=0,06$) (siehe Kapitel 3.6, Tabelle 25).

Laut Rosenberg et al. spielt die Tumormikroumgebung eine große Rolle bei der Tumorprogression [286-288]. Nach Lv et al. steigt während der Umwandlung eines DCIS zu invasivem Brustkrebs die Infiltration des Tumors durch CD3+-T-Zellen, woraufhin

dieser seine PD-L1-Expression erhöht, um dem Angriff des Immunsystems zu entgehen [288]. Dieser Zusammenhang könnte die in der vorliegenden Studie detektierte Korrelation zwischen FoxP3 und PD-L1 erklären, weil beide Marker für eine Unterdrückung des Immunsystems stehen.

Die Tumormikroumgebung spielt auch eine große Rolle bei der Progression von TNBC. Daher wäre die Analyse der Verteilungsmuster von CD3+- und FoxP3+-Zellen am Übergang von gesundem Gewebe zu Tumorgewebe und im zentralen Tumorgewebe ein sinnvoller Ansatz. Die T-Zell-basierte Anti-Tumor-Immunantwort des Körpers und die PD-L1-Expression des Tumors weisen große Heterogenitäten auf. Die Heterogenität der Verteilung dieser Biomarker im Gewebe könnte auch die unterschiedliche Wirkung von Immuntherapien erklären [289]. Die Aussagekraft von PD-1/PD-L1-Expressionsanalysen in TNBC hängt vom Zeitpunkt und von dem Ort der Biopsieentnahme ab.

Li et al. fanden beispielsweise eine deutlich höhere Anzahl PD-L1+-Zellen in Lymphknotenmetastasen als in Lebermetastasen [290]. Diese Unterschiede sind bei der Entscheidung für oder gegen eine PD-L1-AK-Therapie zu beachten. Sinnvoll wäre ein Score aus Werten von an unterschiedlichen Stellen entnommenen Gewebeproben.

Bei medullären Mammakarzinomen gleicht die TIL-reiche Tumormikroumgebung, wie bereits erwähnt, negative prognostische Faktoren (TNBC, morphologisch aggressives Wachstum, etc.) aus und führt zu einer besseren prognostischen Ausgangslage als bei vergleichbaren Tumoren [291]. Wenn die Tumormikroumgebung die Prognose beeinflusst, gilt es nicht nur die Tumorzellen im Blick zu haben, sondern durch Modulation der Tumormikroumgebung die Bedingungen für die endogene Immunabwehr zu verbessern, beispielsweise über die Generierung einer für die Prognose günstigen CD8+/FoxP3-Ratio.

Es zeigt sich die Tumormikroumgebung auch heterogen und dynamisch bezüglich des Biomarkers FoxP3. Während in manchen Studien die Prognose von Brusttumoren nicht von der FoxP3-Expression im Tumorgewebe abhing [221, 292–294], sahen andere Arbeiten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der FoxP3-Expression und der Prognose [179, 295, 296].

Laut der retrospektiven Kohortenuntersuchung von Zhao et al. waren hohe FoxP3-Level bei Brustkrebs mit einem hohen histologischen Grad, einer HER2-Positivität, einem

positiven Ki-67-Index, axillären Lymphknotenmetastasen und einer schlechteren Prognose assoziiert. Diese Assoziation mit einem hohen FoxP3-Level galt nicht, wenn ein Lymphknotenbefall fehlte und das Gewebe HER2-negativ war [218, 225, 297].

Nach Anz et al. hat die FoxP3-Expression und damit die Bildung von Tregs allein wenig Aussagekraft, sondern nur im Kontext gesehen mit der CD8+-Expression von cytotoxischen T-Zellen. Eine hohe CD8+/FoxP3+-Ratio im Tumorgewebe wirkt sich positiv auf das Gesamtüberleben von TNBC-Patientinnen aus [279]. Dieser Zusammenhang wird auch durch die Studie von Tavares et al. bestätigt [298]. Eine Umkehrung der CD8+/FoxP3+ Ratio aus den Studien von Anz et al. und Tavares et al. ergibt sich aus den Ergebnissen von Fukui et al., denn hier wird die FoxP3+/CD8+ Ratio bestimmt. Sobald diese einen hohen Wert annimmt, sinkt das krankheitsfreie Überleben der Patientinnen mit luminalen Mammakarzinomen.

Außerdem scheint diese Ratio signifikant an die Tumorgröße (>2cm), das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und einen positiven Ki-67 Index gekoppelt zu sein [299].

Auch bei der Entwicklung von Leberkarzinomen sind hohe FoxP3+- und geringe CD8+-T-Zellzahlen mit einer schlechten Prognose assoziiert. Dabei spielt das Vorliegen einer Hepatitis keine Rolle. Ausgehend von hohen CD8+ T-Zellzahlen und niedrigen FoxP3+-Zellzahlen kehrt sich das Verhältnis im Laufe der Tumorgenese um [218].

Das Immunsystem in der Tumormikroumgebung spielt für das Wachstum, die Progression und Eliminierung von Mammakarzinomen eine große Rolle [266]. Vom Immunsystem detektierte Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) können eine Immunantwort hervorrufen, die unter bestimmten Bedingungen den Tumor wirkungsvoll bekämpft. In diesem Kontext haben TILs einen prognostischen Wert. Bei den TILs handelt es sich um ein Gemisch aus verschiedenen Immunzellen (z. B. T- und B-Lymphozyten, Makrophagen). In Abhängigkeit vom dominanten Zelltyp entwickelt sich in der Tumormikroumgebung ein gegen den Tumor gerichtetes oder ein entzündliches, den Tumor förderndes Milieu. Eine hohe Anzahl an TILs ist aber mit einem besseren Gesamtüberleben bei TNBC-Patientinnen assoziiert. Auch zeigen Tumorzellen in der Tumormikroumgebung häufig eine PD-L1-Überexpression [266, 300–303].

Wird der Tumor lediglich operativ entfernt und keine begleitende systemische Therapie durchgeführt, bestimmt die Tumormikroumgebung die Prognose bezüglich des Auftretens von Rezidiven und des Überlebens. Dies gilt auch für Fälle, in denen noch keine

Metastasen nachweisbar sind. Eine hohe Anzahl an TILs aktiviert die endogene Antitumor-Immunantwort, auch ohne eine adjuvante Chemotherapie [207]. An der Antitumor-Immunantwort sind nicht nur T-Zellen sondern auch B-Zellen beteiligt, wie eine Studie an Melanomen zeigt [304].

Daneben verändert sich auch die Kollagenstruktur in der Tumormikroumgebung während der Tumorgenese. Auch bezüglich der Ausprägung der Kollagenfasern bilden medulläre Karzinome mit zwei weiteren Karzinomarten eine eigene Gruppe [305].

Ein Immunprofiling der individuellen Tumormikroumgebung könnte das Verständnis über das Zusammenspiel von Tumorzellen und Immunsystem verbessern. Aktuell werden schon Immuninfiltrationsraten über Biomarker bestimmt, um Patienten für Immuntherapien auszuwählen. Darüber hinaus sollten Untersuchungen durchgeführt werden, welche die Frage klären, warum manche Patienten nicht auf bestimmte Immuntherapien ansprechen oder ein Rezidiv entwickeln. Die vorliegende Dissertation trägt dazu bei, die Komplexität der Tumormikroumgebung bzgl. CD3, FoxP3 und PD-L1 darzustellen.

4.6 Ausblick und Resümee

Mit rund 70 000 Neuerkrankungen pro Jahr ist das Mammakarzinom bei Frauen in Deutschland die derzeit häufigste maligne Tumorerkrankung. Trotz des Rückgangs der brustkrebsbedingten Sterblichkeit seit Ende der 1990er-Jahre stellt das Mammakarzinom mit 17,6 % in Deutschland immer noch die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen dar [14, 306]. Die ehemalige histologische Untergruppe der medullären Mammakarzinome umfasst lediglich 1 % der Neuerkrankungen an Brustkrebs. Dennoch erhalten circa 700 Frauen pro Jahr in Deutschland eine entsprechende Diagnose. Die Rarität medullärer Mammakarzinome erschwert die Datensammlung, die für evidenzbasierte Behandlungspläne unverzichtbar ist. Die geringe Häufigkeit medullärer Mamakarzinome hat auch in dieser Dissertation die Größe des Patientenkollektivs begrenzt.

Werden alle, als NST klassifizierte Mammakarzinome, mit dem gleichen Behandlungsplan therapiert, besteht das Risiko einer Über- oder Untertherapie für einige Subgruppen. Daher sind Untersuchungen von einzelnen Untergruppen dieser NST-Einteilung sinnvoll [307].

Vielfältige Forschungsansätze zielen darauf ab, die in dieser Arbeit untersuchten Biomarker (CD3, FoxP3 und PD-L1) prognostisch und/oder therapeutisch zu implementieren. In der vorliegenden Studie wurde versucht solche Prognosemuster für die medullären Mammakarzinome zu finden.

Die meisten Ansätze befinden sich derzeit aber noch auf einer experimentellen Stufe. Als mögliche Verbesserung der bestehenden Behandlungsregime sollen einige dieser Ansätze im Folgenden vorgestellt werden (Stand Januar 2022).

Eine anti-CD3-Nanobody-Therapie könnte über die Verminderung der Angiogenese im Tumorgewebe, das Tumorwachstum stoppen. Sharif Khatibi et al. haben hierzu ein vielversprechendes Mausmodell mit Brustkrebszellen und einem rekombinanten „anti-CD ϵ nanobody“ kreiert [160].

Weiter ist der CD3 Biomarker ein interessantes Zielmolekül bei einer Herceptin-Resistenz. Herceptin wird als adjuvantes Therapeutikum bei HER2+-Mammakarzinomen eingesetzt. Neben einer in einigen Fällen vorhandenen Primärresistenz entwickeln bis zu 70 % der Patientinnen eine Resistenz im Laufe der Behandlung. Eine zusätzliche Gabe des Anti-CD3-AK M802 erhält in diesen Fällen die Wirksamkeit von Herceptin. Als Folge der Behandlung werden mehr CD3+-Immunzellen rekrutiert und mehr HER2+-Tumorzellen eliminiert [308].

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Wirksamkeit von Immuntherapien ist die Gabe von Reoviren. T-Zell spezifische AK wirken nur dann, wenn der Tumor mit entsprechenden CD3+-Zellen angereichert ist. Groeneveldt et al. konnten durch die Verabreichung onkolytischer Reoviren eine stärkere CD3+-T-Zellen Antwort auslösen. Dadurch erhöht sich die Wirkung neoadjuvanter Immuntherapien auch in vom Primärtumor entfernt gelegenen Metastasen [309].

FoxP3 induziert die Apoptose in Brustkrebs-, Ovarialkrebs- und Kolonkarzinomzellen. Ein Fusionsprotein, das FoxP3 direkt zu den Karzinomzellen leitet, zeigt eine dosisabhängige Anti-Tumor-Wirkung. Im Mausmodell gab es keine Evidenz für erhebliche systemische Nebenwirkungen dieser Therapie [310].

Da FoxP3 in vielen humanen Brustkrebsarten mutiert ist oder fehlt, wäre auch eine Substitution von Wildtyp FoxP3 ein möglicher therapeutischer Ansatz. Weil FoxP3 aber auch gleichzeitig die Anti-Tumor-Wirkung des Immunsystems inhibiert und somit das Gesamtüberleben verringert, wäre die Entfernung der FoxP3+-Zellen ebenfalls eine zielführende Strategie [224, 311]. In diesem Kontext stellt sich die Frage, warum

FoxP3, wie oben beschrieben, trotz seiner Anti-Tumor-Wirkung in vielen Brustkrebstumoren exprimiert wird. Möglicherweise ist für diesen scheinbaren Widerspruch das in Mammakarzinomen überexprimierte Galectin-1 verantwortlich. Eine erhöhte Expression dieses Proteins ist mit einer erhöhten Metastasierungsgefahr bei Tumorerkrankungen sowie mit einer vermehrten Proliferation und Angiogenese im Tumorgewebe assoziiert. Galectin-1 interagiert mit FoxP3 zu einem Komplex, wodurch FoxP3 seine ursprüngliche Anti-Tumor-Funktion verliert [237, 312–314]. Dieser Mechanismus könnte die gegensätzlichen Befunde zur Wirkung von FoxP3+-Zellen bei Tumorerkrankungen erklären. Möglicherweise bestimmt das Ausmaß der Komplexbildung im individuellen Patienten, ob FoxP3 die Prognose bei Mammatumoren verbessert oder verschlechtert.

Ein weiteres aussichtsreiches Zielmolekül zur Optimierung der Mammakarzinom-Behandlung ist die ICI PD-L1 Therapie. ICI-Inhibitoren, wie PD-1/PD-L1-AK, heben die inhibierende Wirkung von PD-L1 auf T-Zellen auf, so dass diese ihre Anti-Tumor-Aktivität wiedergewinnen.

Neuere Ansätze zielen darauf ab, die Wirksamkeit ICI-basierter Therapien durch adjuvante Zusätze zu verbessern. Eine Möglichkeit ist die zusätzliche Inhibition der PD-L1-Expression durch das Ausschalten des Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Diese Methode wurde bereits überwiegend positiv bei hämatologischen Malignitäten wie Lymphomen und myeloproliferativen Neoplasmen untersucht [247, 315–318].

Fang et al. identifizierten den multifunktionalen Wachstumsfaktor Progranulin als einen für die Überexpression von PD-L1 auf Tumorzellen verantwortlichen Parameter. Progranulin ist somit ein weiterer Ansatzpunkt für neue diagnostische und therapeutische Strategien [319].

Auch die „Nanodrug MS NPs“ bestehend aus Metformin (Diabetes-Therapeutikum) und einem als Chemotherapeutikum eingesetzten DNA-Topoisomerase-I-Inhibitor (7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin (SN38) zielt darauf ab, die PD-L1-Expression zu verringern [249]. Metformin verbessert die Prognose und das Überleben von Krebspatienten, indem es PD-L1 glykosyliert und für die Degradierung im endoplasmatischen Retikulum markiert. In ersten Analysen unterdrückte MS NPs bei einer guten Biokompatibilität die Metastasenbildung und tötete Tumorzellen ab [249, 320–323].

MicroRNAs modulieren post-transkriptional die Genexpression. Bei der Expression von PD-L1 spielen zahlreiche microRNAs eine Rolle. Diese microRNAs beeinflussen das Differenzierungs- und Proliferationspotential von Krebsstammzellen und die Therapieresistenz von Brustkrebszellen. Derzeit wird das therapeutische Potential der microRNA-873 bei Brustkrebs analysiert [248, 324–330].

Hyperangiogenese hängt wahrscheinlich eng mit einer ICI-Therapieresistenz zusammen. Neben weiteren Faktoren, wie eine Gewebehypoxie und eine hohe Angiogeneserate, fördert eine hohe Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors A (VEGFA) die Tumorprogression. Bei Melanomen wurde der Zusammenhang zwischen der PD-L1-ICI-Therapieresistenz und der erhöhten VEGFA-Expression bereits vermutet. In 32–82 % der Fälle treten bei Kombinationstherapien mit PD-L1-ICI aber ernste Nebenwirkungen auf. Allerdings ist speziell die Toxizität einer anti-angiogenen Therapie kombiniert mit einer PD-L1-Blockade unbekannt. Die Wirksamkeit einer anti-angiogenen Therapie erfordert zudem eine Hypervaskularisation im Tumorgewebe, was eine vorherige Abklärung voraussetzt [313, 331–338].

Andere Experimente zielen darauf ab, durch Ubiquitylierung, Phosphorylierung und/oder Glykosylierung die Stabilität von PD-L1 auf Tumorzellen zu verringern. Yang et al. entdeckten zufällig, dass durch eine Palmitoylierung die PD-L1-Stabilität abnimmt und Tumorzellen wieder empfänglicher für einen T-Zellen-Angriff macht [187, 339–341].

Der Rezeptor für PD-L1/PD-1 wird post-translational glykosyliert. Die bisher verwendeten AK besitzen nur eine geringe Affinität für das glykosylierte PD-1. In Zukunft sollten AK generiert werden, die besser an glykosyliertes PD-1 binden [342]. Bei der Auswahl von geeigneten Patienten für eine ICI-Therapie ist eine enzymatische Deglykosylierung von PD-1 zur Steigerung der AK-Bindung und damit der Signalintensität möglich. Dieses Verfahren verhindert eine Einstufung von Patienten als ungeeignet (PD-1-negativ) aufgrund unzureichend bindender AK [343].

Die Therapie von TNBC mittels PD-L1 Blockade wird durch zahlreiche starke Nebenwirkungen (z. B. Myokarditis und diffuse Melanosis cutis) begrenzt. Zur Vermeidung systemischer Effekte wäre eine intratumorale Applikation der Medikamente wünschenswert. Yang et al. nutzten mit Adenoviren infizierte mesenchymale Stromazellen, die sich bevorzugt in Metastasen ansiedeln und dort ein bispezifisches Protein sezernieren, das einerseits PD-L1 blockiert und andererseits CD3⁺-T-Zellen aktiviert [344].

Bislang wurden PD-L1-ICI Therapien meist im metastasierten Stadium angewandt. Die Immunsensitivität und Anzahl der TILs in Mammakarzinomen nimmt aber im Laufe der Zeit ab. Möglicherweise ist es daher zielführender, die ICI-Therapie in einem Stadium zu starten, wenn noch viele TILs im Tumor vorhanden sind, bei denen PD-L1/PD-1 sinnvoll blockiert würde. Gegen ein solches Vorgehen sprechen die hohen Kosten einer derartigen Therapie und die ausreichende Effektivität der Standardtherapie bei vielen Patienten [345]. Diese Argumentation ist jedoch ethisch diskutabel, weil eine vorherige Prognose der Wirksamkeit der Standardtherapie kaum möglich ist.

Eine Kombinationstherapie aus dem anti-PD-L1-AK Atezolizumab und Paclitaxel (als Albumin-gebundener Nanopartikel) wurde 2019 von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für PD-L1+ fortgeschrittene und/oder metastasierte TNBC zugelassen [346].

Die komplexe Datenlage wirft die Frage auf, welche Ansatzpunkte für PD-1/PD-L1-ICI-Therapien weiterverfolgt werden sollten. Eine PD-1/PD-L1-ICI-Monotherapie ist aufgrund der geringen Responseraten, wie bereits erwähnt, wenig zielführend [254, 346–351].

Bei der Kombination von PD-1/PD-L1-ICI und Chemotherapeutika muss zwischen metastasierten Mammakarzinomen und Tumorfrühstadien unterschieden werden.

Für metastasierte Krebsstadien werden derzeit drei Kombinationsregimes überprüft:

- Chemotherapeutikum + Atezolizumab (PD-L1-AK)
- Paclitaxel-Nanopartikel + Atezolizumab (zugelassen durch die FDA)
- Chemotherapeutikum (Paclitaxel oder Gemcitabine/Carboplatin) + Pembrolizumab (PD1-AK)

Die Kombination aus einem Chemotherapeutikum und Pembrolizumab wurde in einer randomisierten Phase III Doppelblindstudie (KEYNOTE-355 Studie) überprüft. Die vielversprechenden Ergebnisse deuten auf eine Verbesserung der Behandlung von metastasierten TNBC hin [186, 264, 346, 352–356].

In frühen Stadien des Mammakarzinoms werden andere Ansätze verfolgt. Die Idee dabei ist, ICI bereits in einem Stadium einzusetzen, in dem noch ausreichend Immunzellen vorhanden sind, die durch die PD-L1-Blockade aktiviert werden können (siehe oben).

Der „I-SPY2 Trial“ untersucht eine Kombination von Paclitaxel mit Pembrolizumab (PD-1-AK) und Cyclophosphamid [357]. Diverse Kombinationsmöglichkeiten mit Atezolizumab werden in den Trials „NeoTRIPaPDL1“ und „NSABP B-59/GBG96-GeparDouze“ analysiert [346]. Die randomisierte Phase III Doppelblindstudie „IMpassion031“ deutet an, dass Atezolizumab kombiniert mit einem Chemotherapeutikum auch in frühen TNBC-Stadien ungeachtet des PD-L1-Status bei einem akzeptablen Sicherheitsprofil das Gesamtüberleben verlängert [358].

Die „GB 89-GeparNuevo“ Studie (randomisierte Phase II Untersuchung) mit dem PD-L1 AK Durvalumab befindet sich derzeit in der Follow-Up-Phase [359, 360].

Außerdem scheint eine Kombination aus PD-1/PD-L1-ICI und VEGFA-Inhibitoren erfolgversprechend zu sein (siehe oben). Anti-angiogenetische Therapien fördern die Maturation dendritischer Zellen, wodurch sich die Tumolvaskularisation normalisiert und Hochendothelvenolen bilden. Die Folge dieser Hochendothelvenolen ist eine erhöhte Immunzellinfiltration im Tumor und die Wiederherstellung einer immunsuppressiven Tumormikroumgebung. Die gebildeten tertiären lymphoiden Strukturen ermöglichen dem Körper eine stärkere Anti-Tumor-Immunantwort.

Aus solchen Überlegungen resultieren weitere mögliche Partner für ICI-Kombinationstherapien. In der multizentrischen Phase II „WJOG9917B/NEWBEAT“ Studie zeigte eine Kombination aus Nivolumab (PD-1-AK) und Bevacizumab (VEGFA-AK) [332, 361–367] vielversprechende Ergebnisse für Patientinnen mit HER2-negativen metastasierten Tumoren [368]. In der „TOPACO/KEYNOTE-162“ Studie wurden TNBC mit einem Mix aus ICI und Polyadenosindiphosphateribose-Polymerase-(PARP)-Inhibitoren, die zur Behandlung bei durch BRCA1-Keimbahnmutation hervorgerufenen Tumoren eingesetzt werden, behandelt [369]. Folglich wurden die besten Ergebnisse bei Patientinnen mit BRCA1-Mutation gefunden [367]. Weiter existieren therapeutische Ansätze aus ICI-Kombinationen mit AKT-Inhibitoren, Anti-HER2-Therapien, Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) 4/6 und Dectin-1 Agonisten. Die „SAFIR02“ Studie untersucht die ICI-Wirksamkeit nach Radio- oder Chemotherapie [370–375].

Laut aktueller Datenlage ist der alleinige immunhistochemische Nachweis von PD-L1 in TNBC kein geeigneter Biomarker für das Ansprechen auf eine PD-1/PD-L1-ICI. Die Identifizierung zusätzlicher Biomarker aus der Tumormikroumgebung ist für eine gezielte auf die individuelle Patientin abgestimmte Immuntherapie unverzichtbar [214].

Die vorliegende Dissertation liefert einen Beitrag zur intensiven Nachbarschaftsanalyse der Biomarker CD3, FoxP3 und PD-L1 im malignen Mammagewebe unterschiedlicher medullärer Subtypen und Rezeptor-basierter Gruppen.

Obwohl 13 % der medullären Mammakarzinome BRCA1 assoziiert sind und BRCA1 ein wichtiger Prognosemarker ist (siehe Kapitel 1.3.1. und 1.4.6.), wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine BRCA1 und -2-Analyse, wie bereits erwähnt, verzichtet [148, 276, 376]. Die CD3-, FoxP3- und PD-L1-Expression der Mikrotumorumgebung in Abhängigkeit vom Vorkommen von BRCA1/2-Mutationen könnte in einer weiterführenden Studie berücksichtigt werden.

Ebenso fehlte in der vorliegenden Arbeit eine Analyse des Biomarkers CD8. Laut Anz et al. beeinflusst das Verhältnis von CD8+ zu FoxP3+-Zellen die Überlebensprognose von Brustkrebspatientinnen [279]. Auch hier sollten sich weiterführende Analysen anschließen.

Eine zusätzliche Limitierung ist die geänderte histologische Einteilung der medullären Mammakarzinome durch die WHO im Jahre 2019 während der Experimentphase dieser Dissertation. Wie die Ergebnisse dieser Experimente belegen, ist diese Neueinteilung durchaus zielführend, da die Rezeptor-basierte Klassifizierung von Mammakarzinomen im Hinblick auf die Therapieplanung immer mehr an Bedeutung gewinnt. Die Beibehaltung der histologischen Untergruppe der invasiven Mammakarzinome NST mit medullären Eigenschaften ist aufgrund der besseren Einordnung aber sinnvoll.

Als möglicher weiterer Zukunftsausblick bleibt außerdem die Frage spannend ob, falls die Tumormikroumgebung tatsächlich entscheidend ist bei der körpereigenen Immunreaktion gegen eine Malignität und aufgrund dessen bei medullären Mammakarzinomen eine Tendenz zur besseren Prognose vorhanden ist als bei Tumoren mit gleich aggressivem Wachstum und ähnlicher Gradierung, nicht nur der therapeutische Angriff auf die Tumorzellen selbst eine Überlebensverbesserung bewirken könnte, sondern auch das artifizielle Kreieren einer vergleichbaren Tumormikroumgebung wie sie bei medullären Mammakarzinomen vorhanden ist.

5 Literaturverzeichnis

1. Lakhani, S. R., Ellis, I. O., Schnitt, S. J., Tan, P. H. & Vijver, M. J. v. d. et al. (2012). WHO Classification of Tumours of the Breast. 4 Aufl. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC).
2. Greaves M. Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discov.* 2015 Aug;5(8):806-20. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0439.
3. Millane RC, Kanska J, Duffy DJ, Seoighe C, Cunningham S, Plickert G, Frank U. Induced stem cell neoplasia in a cnidarian by ectopic expression of a POU domain transcription factor. *Development.* 2011 Jun;138(12):2429-39. doi: 10.1242/dev.064931.
4. Domazet-Lošo T, Klimovich A, Anokhin B, Anton-Erxleben F, Hamm MJ, Lange C, Bosch TC. Naturally occurring tumours in the basal metazoan Hydra. *Nat Commun.* 2014 Jun 24;5:4222. doi: 10.1038/ncomms5222.
5. Altmeyer, P. (2020). Hallmarks of Cancer, [online] <https://www.altmeyers.org/de/innere-medizin/hallmarks-of-cancer-111897> [21.08.2020].
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
8. Schwab ED, Pienta KJ. Cancer as a complex adaptive system. *Med Hypotheses.* 1996 Sep;47(3):235-41. doi: 10.1016/s0306-9877(96)90086-9.
9. Kitano H. Biological robustness. *Nat Rev Genet.* 2004 Nov;5(11):826-37. doi: 10.1038/nrg1471.
10. Carlson JM, Doyle J. Complexity and robustness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 19;99 Suppl 1(Suppl 1):2538-45. doi: 10.1073/pnas.012582499.
11. Greaves, M. (2000). *Cancer: The Evolutionary Legacy.* Oxford: Oxford University Press.
12. Eaton SB, Pike MC, Short RV, Lee NC, Trussell J, Hatcher RA, Wood JW, Worthman CM, Jones NG, Konner MJ, et al. Women's reproductive cancers in evolutionary context. *Q Rev Biol.* 1994 Sep;69(3):353-67. doi: 10.1086/418650.
13. Barnes, B., Kraywinkel, K., Nowossadeck, E., Schönfeld, I., Starker, A., Wiencke, A. & Wolf, U. (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin: Robert Koch Institut.

14. Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Waldeyer-Sauerland, M., Waldmann, A., Christ, M., Folkerts, J., Hansmann, J., Klein, S., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Treml, K., Vollmer, G., Weg-Remers, S., Barnes, B., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Franke, M., Gurung-Schönfeld, I., Haberland, J., Kraywinkel, K. & Wienecke, A. (2019). Krebs in Deutschland 2015/2016. 12 Aufl. Berlin: Robert Koch Institut.
15. Gøtzsche PC, Jørgensen KJ. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jun 4;2013(6):CD001877. doi: 10.1002/14651858.CD001877.pub5.
16. Wörmann B, Aebi S et al. DGHO-Leitlinie Mammakarzinom der Frau, 2018 <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@@guideline/html/index.htm>
17. Lakhani, S. R., Ellis, I. O., Schnitt, S. J., Tan, P. H. & Vijver, M. J. v. d. et al. (2020). WHO Breast Tumours. 5 Aufl. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC).
18. Khalid IB, Parvaiz MA, Sarwar A, Shaikh OS, Javed N, Fatima A. A leafy surprise: Case report of male breast malignant phyllodes. *Int J Surg Case Rep.* 2021 Nov;88:106536. doi: 10.1016/j.ijscr.2021.106536.
19. Pedersen JE, Strandberg-Larsen K, Andersson M, Hansen J. Occupational exposure to solar ultraviolet B radiation and risk of subtypes of breast cancer in Danish women. *Occup Environ Med.* 2021 Apr;78(4):286-292. doi: 10.1136/oemed-2020-107125.
20. World Health Organization. (2014). WHO position paper on mammography screening. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/137339>
21. Havrilesky, L., Gierisch, J. M., Moorman, P., McCrory, D., Ghatge, S., Williams, J., Montgomery, R. C., Crowley, M., Kosinski, A., Grimm, L., Davidson, B., Kendrick, A. S., Chobot, M., Gray, R., Sanders, G. & Myers, E. (2014). Systematic Review of Cancer Screening Literature for Updating American Cancer Society Breast Cancer Screening Guidelines, [online] <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/cancer-control/en/reports/complete-systematic-evidence-review-acs-breast-cancer-screening-guideline.pdf> [24.08.2020].
22. U.S. Albert et al. (2008). Stufe-3-Leitlinie Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland, [online] https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/077-001_S3_Brustkrebs-Fruherkennung_lang_02-2008_02-2011.pdf [1.09.2020].
23. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, Wang Y, Marcom PK, Marks JR, Febbo PG, Nevins JR, Potti A, Blackwell KL. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol.* 2008 Jul 10;26(20):3324-30. doi: 10.1200/JCO.2007.14.2471.

24. Bartelink H, Horiot JC, Poortmans PM, Struikmans H, Van den Bogaert W, Fourquet A, Jager JJ, Hoogenraad WJ, Oei SB, Wárlám-Rodenhuis CC, Pierart M, Collette L. Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast-conserving therapy of early breast cancer: 10-year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 trial. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 1;25(22):3259-65. doi: 10.1200/JCO.2007.11.4991.
25. Anders CK, Johnson R, Litton J, Phillips M, Bleyer A. Breast cancer before age 40 years. *Semin Oncol*. 2009 Jun;36(3):237-49. doi: 10.1053/j.seminoncol.2009.03.001.
26. Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman H. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One*. 2009 Nov 11;4(11):e7695. doi: 10.1371/journal.pone.0007695.
27. Bharat A, Aft RL, Gao F, Margenthaler JA. Patient and tumor characteristics associated with increased mortality in young women (< or =40 years) with breast cancer. *J Surg Oncol*. 2009 Sep 1;100(3):248-51. doi: 10.1002/jso.21268. PMID: 19330813.
28. Starker A, Kraywinkel K, Kuhnert R (2017) Früherkennung von Brustkrebs: Inanspruchnahme der Mammografie in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 2(4): 74–80. DOI 10.17886/RKI-GBE-2017-114
29. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.2, 2020 AWMF Registernummer: 032-045OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 02.09.2020)
30. Janni, W. et al. (2017). Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs, [online] https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/_leitlinien/kommission_mamma/2017/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2017.pdf [12.10.2020].
31. Bleyer A, Welch HG. Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence. *N Engl J Med*. 2012 Nov 22;367(21):1998-2005. doi: 10.1056/NEJMoa1206809.
32. Broeders M, Moss S, Nyström L, Njor S, Jonsson H, Paap E, Massat N, Duffy S, Lynge E, Paci E; EUROSCREEN Working Group. The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of observational studies. *J Med Screen*. 2012;19 Suppl 1:14-25. doi: 10.1258/jms.2012.012078.
33. Helvie MA, Chang JT, Hendrick RE, Banerjee M. Reduction in late-stage breast cancer incidence in the mammography era: Implications for overdiagnosis of invasive cancer. *Cancer*. 2014 Sep 1;120(17):2649-56. doi: 10.1002/cncr.28784.
34. Siu AL; U.S. Preventive Services Task Force. Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*. 2016 Feb 16;164(4):279-96. doi: 10.7326/M15-2886.

35. EB (2021). Mammografiescreening: G-BA berät über neue Altersgrenze. Deutsches Ärzteblatt, 118(14), B590.
36. Melnikow J, Fenton JJ, Whitlock EP, Miglioretti DL, Weyrich MS, Thompson JH, Shah K. Supplemental Screening for Breast Cancer in Women With Dense Breasts: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2016 Feb 16;164(4):268-78. doi: 10.7326/M15-1789.
37. Ohuchi N, Suzuki A, Sobue T, Kawai M, Yamamoto S, Zheng YF, Shiono YN, Saito H, Kuriyama S, Tohno E, Endo T, Fukao A, Tsuji I, Yamaguchi T, Ohashi Y, Fukuda M, Ishida T; J-START investigator groups. Sensitivity and specificity of mammography and adjunctive ultrasonography to screen for breast cancer in the Japan Strategic Anti-cancer Randomized Trial (J-START): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2016 Jan 23;387(10016):341-348. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00774-6.
38. Nothacker M, Duda V, Hahn M, Warm M, Degenhardt F, Madjar H, Weinbrenner S, Albert US. Early detection of breast cancer: benefits and risks of supplemental breast ultrasound in asymptomatic women with mammographically dense breast tissue. A systematic review. *BMC Cancer.* 2009 Sep 20;9:335. doi: 10.1186/1471-2407-9-335.
39. Berg WA, Bandos AI, Mendelson EB, Lehrer D, Jong RA, Pisano ED. Ultrasound as the Primary Screening Test for Breast Cancer: Analysis From ACRIN 6666. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Dec 28;108(4):djv367. doi: 10.1093/jnci/djv367.
40. Houssami N, Irwig L, Simpson JM, McKessar M, Blome S, Noakes J. Sydney Breast Imaging Accuracy Study: Comparative sensitivity and specificity of mammography and sonography in young women with symptoms. *AJR Am J Roentgenol.* 2003 Apr;180(4):935-40. doi: 10.2214/ajr.180.4.1800935.
41. Kolb TM, Lichy J, Newhouse JH. Comparison of the performance of screening mammography, physical examination, and breast US and evaluation of factors that influence them: an analysis of 27,825 patient evaluations. *Radiology.* 2002 Oct;225(1):165-75. doi: 10.1148/radiol.2251011667.
42. Schneider, G. et al. (2013). Screening, Früherkennung und Diagnostik nicht palpabler Herde, [online] <http://www.aco-asso.at/publikationen/aco-asso-consensusberichte/consensus-bericht-mammakarzinom/2-screnning-fruherkennung-und-diagnostik-nicht-palpabler-herde/> [11.05.2021].
43. Dahabreh IJ, Wieland LS, Adam GP, Halladay C, Lau J, Trikalinos TA. Core Needle and Open Surgical Biopsy for Diagnosis of Breast Lesions: An Update to the 2009 Report [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2014 Sep. Report No.: 14-EHC040-EF.
44. Bruening W, Fontanarosa J, Tipton K, Treadwell JR, Launderers J, Schoelles K. Systematic review: comparative effectiveness of core-needle and open surgical biopsy to diagnose breast lesions. *Ann Intern Med.* 2010 Feb 16;152(4):238-46. doi: 10.7326/0003-4819-152-1-201001050-00190.

45. Bennani-Baiti B, Bennani-Baiti N, Baltzer PA. Diagnostic Performance of Breast Magnetic Resonance Imaging in Non-Calcified Equivocal Breast Findings: Results from a Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Aug 2;11(8):e0160346. doi: 10.1371/journal.pone.0160346.
46. Fancellu A, Turner RM, Dixon JM, Pinna A, Cottu P, Houssami N. Meta-analysis of the effect of preoperative breast MRI on the surgical management of ductal carcinoma in situ. *Br J Surg*. 2015 Jul;102(8):883-93. doi: 10.1002/bjs.9797.
47. Houssami N, Turner R, Morrow M. Preoperative magnetic resonance imaging in breast cancer: meta-analysis of surgical outcomes. *Ann Surg*. 2013 Feb;257(2):249-55. doi: 10.1097/SLA.0b013e31827a8d17.
48. Plana MN, Carreira C, Muriel A, Chiva M, Abaira V, Emparanza JI, Bonfill X, Zamora J. Magnetic resonance imaging in the preoperative assessment of patients with primary breast cancer: systematic review of diagnostic accuracy and meta-analysis. *Eur Radiol*. 2012 Jan;22(1):26-38. doi: 10.1007/s00330-011-2238-8.
49. Bakker MF, de Lange SV, Pijnappel RM, Mann RM, Peeters PHM, Monninkhof EM, Emaus MJ, Loo CE, Bisschops RHC, Lobbes MBI, de Jong MDF, Duvivier KM, Veltman J, Karssemeijer N, de Koning HJ, van Diest PJ, Mali WPTM, van den Bosch MAAJ, Veldhuis WB, van Gils CH; DENSE Trial Study Group. Supplemental MRI Screening for Women with Extremely Dense Breast Tissue. *N Engl J Med*. 2019 Nov 28;381(22):2091-2102. doi: 10.1056/NEJMoa1903986.
50. Johnson K, Lång K, Ikeda DM, Åkesson A, Andersson I, Zackrisson S. Interval Breast Cancer Rates and Tumor Characteristics in the Prospective Population-based Malmö Breast Tomosynthesis Screening Trial. *Radiology*. 2021 Jun;299(3):559-567. doi: 10.1148/radiol.2021204106.
51. Ciatto S, Houssami N, Bernardi D, Caumo F, Pellegrini M, Brunelli S, Tuttobene P, Bricolo P, Fantò C, Valentini M, Montemezzi S, Macaskill P. Integration of 3D digital mammography with tomosynthesis for population breast-cancer screening (STORM): a prospective comparison study. *Lancet Oncol*. 2013 Jun;14(7):583-9. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70134-7.
52. Zackrisson S, Lång K, Rosso A, Johnson K, Dustler M, Förnvik D, Förnvik H, Sartor H, Timberg P, Tingberg A, Andersson I. One-view breast tomosynthesis versus two-view mammography in the Malmö Breast Tomosynthesis Screening Trial (MBTST): a prospective, population-based, diagnostic accuracy study. *Lancet Oncol*. 2018 Nov;19(11):1493-1503. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30521-7.
53. Mann RM. Tomosynthesis Is Taking Small Steps to Become the Standard for Breast Cancer Screening. *Radiology*. 2021 Jun;299(3):568-570. doi: 10.1148/radiol.2021210153.
54. Gospodarowicz et al. (2016). *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8 Aufl. Philadelphia: Wiley-Blackwell.
55. UICC. (2021). What is the TNM cancer staging system?, [online] <https://www.uicc.org/resources/tnm> [8.11.2021].

56. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10. doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x.
57. BLOOM HJ, RICHARDSON WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957 Sep;11(3):359-77. doi: 10.1038/bjc.1957.43.
58. Fehm, Scharl & Lux. (2017). Tumorbiologie: Charakterisierung des Brusttumors, [online] <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/tumorbiologie.html> [13.07.2021].
59. Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ, Jacobson JS, Hershman D, Neugut AI. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2005 Jun 1;103(11):2241-51. doi: 10.1002/cncr.21030.
60. Rosen PP, Saigo PE, Braun DW Jr, Weathers E, DePalo A. Predictors of recurrence in stage I (T1N0M0) breast carcinoma. *Ann Surg*. 1981 Jan;193(1):15-25. doi: 10.1097/00000658-198101000-00003.
61. Natarajan N, Nemoto T, Mettlin C, Murphy GP. Race-related differences in breast cancer patients. Results of the 1982 national survey of breast cancer by the American College of Surgeons. *Cancer*. 1985 Oct 1;56(7):1704-9. doi: 10.1002/1097-0142(19851001)56:7<1704::aid-cncr2820560740>3.0.co;2-I.
62. Lage A, Rodriguez M, Pascual MR, Diaz JW, Fernandez L. Factors associated with prognosis in human breast cancer. I. Predictors for rate of evolution and relapse. *Neoplasma*. 1983;30(4):475-83.
63. Dayal HH, Power RN, Chiu C. Race and socio-economic status in survival from breast cancer. *J Chronic Dis*. 1982;35(8):675-83. doi: 10.1016/0021-9681(82)90020-0.
64. Cassileth BR, Lusk EJ, Miller DS, Brown LL, Miller C. Psychosocial correlates of survival in advanced malignant disease? *N Engl J Med*. 1985 Jun 13;312(24):1551-5. doi: 10.1056/NEJM198506133122406.
65. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Fernö M, Fuqua SA, Killander D, McGuire WL. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res*. 1990 Jul 15;50(14):4332-7.
66. Harris, J., Lippman, M., Morrow, M. & Osborne, C. (1999). *Diseases of the breast*. 2 Aufl. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
67. Clark GM, McGuire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol*. 1988 Apr;15(2 Suppl 1):20-5.
68. Klintenberg C, Stål O, Nordenskjöld B, Wallgren A, Arvidsson S, Skoog L. Proliferative index, cytosol estrogen receptor and axillary node status as prognostic predictors in human mammary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 1986;7 Suppl:S99-106.

69. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, Syrjänen K. Prognostic factors after 5 years follow-up in female breast cancer. *Oncology*. 1992;49(2):93-8. doi: 10.1159/000227019.
70. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer*. 1994 Jul 1;74(1 Suppl):381-400. doi: 10.1002/cncr.2820741326.
71. Shek LL, Godolphin W, Spinelli JJ. Oestrogen receptors, nodes and stage as predictors of post-recurrence survival in 457 breast cancer patients. *Br J Cancer*. 1987 Dec;56(6):825-9. doi: 10.1038/bjc.1987.298.
72. Robertson JF, Bates K, Pearson D, Blamey RW, Nicholson RI. Comparison of two oestrogen receptor assays in the prediction of the clinical course of patients with advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 1992 May;65(5):727-30. doi: 10.1038/bjc.1992.153.
73. Eskelinen M, Lipponen P, Papinaho S, Aaltomaa S, Kosma VM, Klemi P, Syrjänen K. DNA flow cytometry, nuclear morphometry, mitotic indices and steroid receptors as independent prognostic factors in female breast cancer. *Int J Cancer*. 1992 Jun 19;51(4):555-61. doi: 10.1002/ijc.2910510409.
74. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, McGuire WL, Fabian C, Pugh RP, Carter RD, Rivkin SE, Borst JR, Belt RJ, et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1992 Aug;10(8):1284-91. doi: 10.1200/JCO.1992.10.8.1284.
75. Nagai MA, Marques LA, Torloni H, Brentani MM. Genetic alterations in c-erbB-2 protooncogene as prognostic markers in human primary breast tumors. *Oncology*. 1993 Nov-Dec;50(6):412-7. doi: 10.1159/000227221.
76. Knight WA, Livingston RB, Gregory EJ, McGuire WL. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res*. 1977 Dec;37(12):4669-71.
77. Joslyn SA, West MM. Racial differences in breast carcinoma survival. *Cancer*. 2000 Jan 1;88(1):114-23. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(20000101)88:1<114::aid-cncr16>3.0.co;2-j.
78. Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. & Deutzmann, R. (2008). *Biochemie*. 2 Aufl. Stuttgart: Thieme.
79. Meier, B. (2019). *Expressionsanalyse nukleärer Hormonrezeptoren beim Prostatakarzinom*. Pathologisches Institut München: Dissertationsschrift.
80. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*. 1999 Jun;20(3):358-417. doi: 10.1210/edrv.20.3.0370. Erratum in: *Endocr Rev* 1999 Aug;20(4):459.
81. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):5925-30. doi: 10.1073/pnas.93.12.5925.

82. Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Nov;3(11):950-64. doi: 10.1038/nrd1551.
83. Gustafsson JA. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 2003 Sep;24(9):479-85. doi: 10.1016/S0165-6147(03)00229-3.
84. Scarpin KM, Graham JD, Mote PA, Clarke CL. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl Recept Signal.* 2009 Dec 31;7:e009. doi: 10.1621/nrs.07009.
85. Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 1995 Nov 1;55(21):5063-8.
86. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 1990 May;9(5):1603-14.
87. Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Mar;72(2):163-72. doi: 10.1023/a:1014820500738.
88. Qui WS, Yue L, Ding AP, Sun J, Yao Y, Shen Z, Fan LH. Co-expression of ER-beta and HER2 associated with poorer prognosis in primary breast cancer. *Clin Invest Med.* 2009 Jun 1;32(3):E250-60. doi: 10.25011/cim.v32i3.6114.
89. Bose R, Molina H, Patterson AS, Bitok JK, Periaswamy B, Bader JS, Pandey A, Cole PA. Phosphoproteomic analysis of Her2/neu signaling and inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 27;103(26):9773-8. doi: 10.1073/pnas.0603948103.
90. Li YM, Pan Y, Wei Y, Cheng X, Zhou BP, Tan M, Zhou X, Xia W, Hortobagyi GN, Yu D, Hung MC. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell.* 2004 Nov;6(5):459-69. doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.027.
91. Subbaramaiah K, Howe LR, Port ER, Brogi E, Fishman J, Liu CH, Hla T, Hudis C, Dannenberg AJ. HER-2/neu status is a determinant of mammary aromatase activity in vivo: evidence for a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2006 May 15;66(10):5504-11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4076.
92. Vinatzer U, Dampier B, Streubel B, Pacher M, Seewald MJ, Stratowa C, Kaserer K, Schreiber M. Expression of HER2 and the coamplified genes GRB7 and MLN64 in human breast cancer: quantitative real-time reverse transcription-PCR as a diagnostic alternative to immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res.* 2005 Dec 1;11(23):8348-57. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0841.

93. López-Guerrero JA, Llombart-Cussac A, Noguera R, Navarro S, Pellin A, Almenar S, Vazquez-Alvadalejo C, Llombart-Bosch A. HER2 amplification in recurrent breast cancer following breast-conserving therapy correlates with distant metastasis and poor survival. *Int J Cancer*. 2006 Apr 1;118(7):1743-9. doi: 10.1002/ijc.21497.
94. Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*. 2001;61 Suppl 2:1-13. doi: 10.1159/000055396.
95. Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Dec 30;1198(2-3):165-84. doi: 10.1016/0304-419x(94)90012-4.
96. Sassen A, Rochon J, Wild P, Hartmann A, Hofstaedter F, Schwarz S, Brockhoff G. Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2008;10(1):R2. doi: 10.1186/bcr1843. Epub 2008 Jan 8. PMID: 18182100;
97. Ménard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E. HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol*. 2001;12 Suppl 1:S15-9. doi: 10.1093/annonc/12.suppl_1.s15.
98. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989 May 12;244(4905):707-12. doi: 10.1126/science.2470152.
99. Tovey S, Dunne B, Witton CJ, Forsyth A, Cooke TG, Bartlett JM. Can molecular markers predict when to implement treatment with aromatase inhibitors in invasive breast cancer? *Clin Cancer Res*. 2005 Jul 1;11(13):4835-42. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0196.
100. Kirkegaard T, McGlynn LM, Campbell FM, Müller S, Tovey SM, Dunne B, Nielsen KV, Cooke TG, Bartlett JM. Amplified in breast cancer 1 in human epidermal growth factor receptor - positive tumors of tamoxifen-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007 Mar 1;13(5):1405-11. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1933.
101. Reese DM, Slamon DJ. HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem Cells*. 1997;15(1):1-8. doi: 10.1002/stem.150001.
102. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82. doi: 10.1126/science.3798106.
103. Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S, Gullick WJ. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet*. 1987 Jul 11;2(8550):69-72. doi: 10.1016/s0140-6736(87)92736-x.

104. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Ventura I, Slamon DJ, Fendly BM, Ullrich A. Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. *Int J Cancer*. 1990 Mar 15;45(3):457-61. doi: 10.1002/ijc.2910450314.
105. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 2000 Nov 1;18(21):3651-64. doi: 10.1200/JCO.2000.18.21.3651.
106. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Sep 16;90(18):1361-70. doi: 10.1093/jnci/90.18.1361. PMID: 9747867.
107. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gomez-Galdon M, Veys I, Cardoso F, Sotiriou C, Di Leo A, Piccart MJ, Larsimont D. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res*. 2005 Jun 15;11(12):4393-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2256.
108. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist*. 2003;8(4):307-25. doi: 10.1634/theoncologist.8-4-307.
109. Piccart M, Lohrisch C, Di Leo A, Larsimont D. The predictive value of HER2 in breast cancer. *Oncology*. 2001;61 Suppl 2:73-82. doi: 10.1159/000055405.
110. Leyland-Jones B, Smith I. Role of Herceptin in primary breast cancer: views from North America and Europe. *Oncology*. 2001;61 Suppl 2:83-91. doi: 10.1159/000055406.
111. Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK. Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res*. 2003 Jan;9(1 Pt 2):447S-54S.
112. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res*. 2004 Jan 1;10(1 Pt 2):331S-6S. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-031212.
113. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jun 16;96(12):926-35. doi: 10.1093/jnci/djh166.
114. Rampaul RS, Pinder SE, Gullick WJ, Robertson JF, Ellis IO. HER-2 in breast cancer--methods of detection, clinical significance and future prospects for treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002 Sep;43(3):231-44. doi: 10.1016/s1040-8428(01)00207-4.

115. Massarweh S, Osborne CK, Jiang S, Wakeling AE, Rimawi M, Mohsin SK, Hilsenbeck S, Schiff R. Mechanisms of tumor regression and resistance to estrogen deprivation and fulvestrant in a model of estrogen receptor-positive, HER-2/neu-positive breast cancer. *Cancer Res.* 2006 Aug 15;66(16):8266-73. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4045.
116. Tokunaga E, Kimura Y, Oki E, Ueda N, Futatsugi M, Mashino K, Yamamoto M, Ikebe M, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y. Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. *Int J Cancer.* 2006 Jan 15;118(2):284-9. doi: 10.1002/ijc.21358.
117. Huang HJ, Neven P, Drijkoningen M, Paridaens R, Wildiers H, Van Limbergen E, Berteloot P, Amant F, Vergote I, Christiaens MR. Association between tumour characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer. *J Clin Pathol.* 2005 Jun;58(6):611-6. doi: 10.1136/jcp.2004.022772.
118. Weitsman GE, Li L, Skliris GP, Davie JR, Ung K, Niu Y, Curtis-Snell L, Tomes L, Watson PH, Murphy LC. Estrogen receptor-alpha phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression. *Cancer Res.* 2006 Oct 15;66(20):10162-70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4111.
119. Wang LH, Yang XY, Zhang X, An P, Kim HJ, Huang J, Clarke R, Osborne CK, Inman JK, Appella E, Farrar WL. Disruption of estrogen receptor DNA-binding domain and related intramolecular communication restores tamoxifen sensitivity in resistant breast cancer. *Cancer Cell.* 2006 Dec;10(6):487-99. doi: 10.1016/j.ccr.2006.09.015.
120. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol.* 1999 Sep;17(9):2639-48. doi: 10.1200/JCO.1999.17.9.2639.
121. McKeage K, Perry CM. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs.* 2002;62(1):209-43. doi: 10.2165/00003495-200262010-00008.
122. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.* 1998 Jul 1;58(13):2825-31. Erratum in: *Cancer Res* 1999 Apr 15;59(8):2020.
123. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001 Mar 15;344(11):783-92. doi: 10.1056/NEJM200103153441101.

124. Burstein HJ, Bunnell CA, Winer EP. New cytotoxic agents and schedules for advanced breast cancer. *Semin Oncol.* 2001 Aug;28(4):344-58. doi: 10.1016/s0093-7754(01)90129-0.
125. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002 Feb 1;20(3):719-26. doi: 10.1200/JCO.2002.20.3.719.
126. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
127. Kanyılmaz G, Yavuz BB, Aktan M, Karaağaç M, Uyar M, Fındık S. Prognostic Importance of Ki-67 in Breast Cancer and Its Relationship with Other Prognostic Factors. *Eur J Breast Health.* 2019 Oct 1;15(4):256-261. doi: 10.5152/ejbh.2019.4778.
128. Roychowdhury, M. (2021). Stains & CD markers: Ki67/MIB1, [online] <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainski67.html> [15.07.2021].
129. Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology.* 2017 Feb;49(2):166-171. doi: 10.1016/j.pathol.2016.11.006.
130. Tan AC, Li BT, Nahar K, Danieletto S, Fong ES, Curren T, Parasyn A, Middleton P, Wong H, Smart D, Rutovitz JJ, McCloud P, Hughes TM, Marx GM. Correlating Ki67 and other prognostic markers with Oncotype DX recurrence score in early estrogen receptor-positive breast cancer. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2018 Apr;14(2):e161-e166. doi: 10.1111/ajco.12779.
131. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep.* 2015 Mar;11(3):1566-72. doi: 10.3892/mmr.2014.2914.
132. Claudio PP, Zamparelli A, Garcia FU, Claudio L, Ammirati G, Farina A, Bovicelli A, Russo G, Giordano GG, McGinnis DE, Giordano A, Cardi G. Expression of cell-cycle-regulated proteins pRb2/p130, p107, p27(kip1), p53, mdm-2, and Ki-67 (MIB-1) in prostatic gland adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2002 Jun;8(6):1808-15.
133. Hu HY, Liu H, Zhang JW, Hu K, Lin Y. Clinical significance of Smac and Ki-67 expression in pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology.* 2012 Nov-Dec;59(120):2640-3. doi: 10.5754/hge12071.
134. McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology.* 1993 Apr;22(4):355-60. doi: 10.1111/j.1365-2559.1993.tb00135.x.
135. Merkel DE, Dressler LG, McGuire WL. Flow cytometry, cellular DNA content, and prognosis in human malignancy. *J Clin Oncol.* 1987 Oct;5(10):1690-703. doi: 10.1200/JCO.1987.5.10.1690.

136. Clark GM, Mathieu MC, Owens MA, Dressler LG, Eudey L, Tormey DC, Osborne CK, Gilchrist KW, Mansour EG, Abeloff MD, et al. Prognostic significance of S-phase fraction in good-risk, node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 1992 Mar;10(3):428-32. doi: 10.1200/JCO.1992.10.3.428.
137. Fernandez EB, Sesterhenn IA, McCarthy WF, Mostofi FK, Moul JW. Proliferating cell nuclear antigen expression to predict occult disease in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors. *J Urol.* 1994 Oct;152(4):1133-8. doi: 10.1016/s0022-5347(17)32522-3.
138. Nagao K, Yamamoto Y, Hara T, Komatsu H, Inoue R, Matsuda K, Matsumoto H, Hara T, Sakano S, Baba Y, Matsuyama H. Ki67 and BUBR1 may discriminate clinically insignificant prostate cancer in the PSA range <4 ng/ml. *Jpn J Clin Oncol.* 2011 Apr;41(4):555-64. doi: 10.1093/jjco/hyq233.
139. Machowska M, Wachowicz K, Sopol M, Rzepecki R. Nuclear location of tumor suppressor protein maspin inhibits proliferation of breast cancer cells without affecting proliferation of normal epithelial cells. *BMC Cancer.* 2014 Feb 28;14:142. doi: 10.1186/1471-2407-14-142.
140. Nielsen PS, Riber-Hansen R, Jensen TO, Schmidt H, Steiniche T. Proliferation indices of phosphohistone H3 and Ki67: strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma. *Mod Pathol.* 2013 Mar;26(3):404-13. doi: 10.1038/modpathol.2012.188.
141. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol.* 2015 Dec 21;8:23-31. doi: 10.4137/CPath.S31563.
142. DKFZ. (2021). Genexpressionstest Oncotype DX bei Brustkrebs künftig Kas- senleistung, [online] [https://www.krebsinformationsdienst.de/aktuel- les/2019/news058-brustkrebstest-ncotype-DX-erstattung.php](https://www.krebsinformationsdienst.de/aktuelles/2019/news058-brustkrebstest-ncotype-DX-erstattung.php) [13.07.2021].
143. Hil. (2020). TK schließt Vertrag zu Genexpressionstests bei Brustkrebs, [online] [https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/108696/TK-schliesst-Vertrag-zu- Genexpressionstests-bei-Brustkrebs](https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/108696/TK-schliesst-Vertrag-zu-Genexpressionstests-bei-Brustkrebs) [3.02.2020].
144. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, Geyer CE Jr, Dees EC, Goetz MP, Olson JA Jr, Lively T, Badve SS, Saphner TJ, Wag- ner LI, Whelan TJ, Ellis MJ, Paik S, Wood WC, Ravdin PM, Keane MM, Gomez Moreno HL, Reddy PS, Goggins TF, Mayer IA, Brufsky AM, Toppmeyer DL, Kaklamani VG, Berenberg JL, Abrams J, Sledge GW Jr. Adjuvant Chemother- apy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Jul 12;379(2):111-121. doi: 10.1056/NEJMoa1804710.
145. Gie. (2017). Brustkrebs: Test erspart Frauen mit sehr geringem Rezidivrisiko unnötige Therapie, [online] <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/76677/Brust- krebs-Test-erspart-Frauen-mit-sehr-geringem-Rezidivrisiko-unnoetige-Thera- pie> [15.06.2021].

146. Esserman LJ, Yau C, Thompson CK, van 't Veer LJ, Borowsky AD, Hoadley KA, Tobin NP, Nordenskjöld B, Fornander T, Stål O, Benz CC, Lindström LS. Use of Molecular Tools to Identify Patients With Indolent Breast Cancers With Ultralow Risk Over 2 Decades. *JAMA Oncol.* 2017 Nov 1;3(11):1503-1510. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.1261.
147. Rme. (2018). Mammakarzinom: Genexpression zeigt, welche Patientinnen auf Chemotherapie verzichten können, [online] <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/95620/Mammakarzinom-Genexpression-zeigt-welche-Patientinnen-auf-Chemotherapie-verzichten-koennen> [11.06.2021].
148. Rechsteiner M, Dedes K, Fink D, Pestalozzi B, Sobottka B, Moch H, Wild P, Varga Z. Somatic BRCA1 mutations in clinically sporadic breast cancer with medullary histological features. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018 May;144(5):865-874. doi: 10.1007/s00432-018-2609-5.
149. Chalasani P, Livingston R. Differential chemotherapeutic sensitivity for breast tumors with "BRCAness": a review. *Oncologist.* 2013;18(8):909-16. doi: 10.1634/theoncologist.2013-0039.
150. Abbas & Lichtmann (2003). *Cellular and Molecular Immunity*. 5 Aufl. Philadelphia: Saunders.
151. Pernick, N. (2013). Stains & CD: markers CD3, [online] <https://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd3.html> [4.10.2021].
152. Kung P, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossman SF. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science.* 1979 Oct 19;206(4416):347-9. doi: 10.1126/science.314668.
153. Gaglia J, Kissler S. Anti-CD3 Antibody for the Prevention of Type 1 Diabetes: A Story of Perseverance. *Biochemistry.* 2019 Oct 8;58(40):4107-4111. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00707.
154. Chen Q, Yuan S, Sun H, Peng L. CD3+CD20+ T cells and their roles in human diseases. *Hum Immunol.* 2019 Mar;80(3):191-194. doi: 10.1016/j.humimm.2019.01.001.
155. Mahmud N, Klipa D, Ahsan N. Antibody immunosuppressive therapy in solid-organ transplant: Part I. *MAbs.* 2010 Mar-Apr;2(2):148-56. doi: 10.4161/mabs.2.2.11159.
156. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, Gitelman SE, Harlan DM, Xu D, Zivin RA, Bluestone JA. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2002 May 30;346(22):1692-8. doi: 10.1056/NEJMoa012864.
157. Herold KC, Gitelman SE, Masharani U, Hagopian W, Bisikirska B, Donaldson D, Rother K, Diamond B, Harlan DM, Bluestone JA. A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005 Jun;54(6):1763-9. doi: 10.2337/diabetes.54.6.1763.

158. Phillips B, Trucco M, Giannoukakis N. Current state of type 1 diabetes immunotherapy: incremental advances, huge leaps, or more of the same? *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:432016. doi: 10.1155/2011/432016.
159. Moreira TG, Matos KTF, De Paula GS, Santana TMM, Da Mata RG, Pansera FC, Cortina AS, Spinola MG, Keppeke GD, Jacob J, Palejwala V, Chen K, Izzy S, Healey BC, Rezende RM, Dedivitis RA, Shailubhai K, Weiner HL. Nasal Administration of Anti-CD3 Monoclonal Antibody (Foralumab) Reduces Lung Inflammation and Blood Inflammatory Biomarkers in Mild to Moderate COVID-19 Patients: A Pilot Study. *Front Immunol.* 2021 Aug 12;12:709861. doi: 10.3389/fimmu.2021.709861.
160. Khatibi AS, Roodbari NH, Majidzade-A K, Yaghmaei P, Farahmand L. In vivo tumor-suppressing and anti-angiogenic activities of a recombinant anti-CD3ε nanobody in breast cancer mice model. *Immunotherapy.* 2019 Dec;11(18):1555-1567. doi: 10.2217/imt-2019-0068.
161. Moradi-Kalbolandi S, Sharifi-K A, Darvishi B, Majidzadeh-A K, Jalili N, Sadeghi S, Mosayebzadeh M, Sanati H, Salehi M, Farahmand L. Evaluation the potential of recombinant anti-CD3 nanobody on immunomodulatory function. *Mol Immunol.* 2020 Feb;118:174-181. doi: 10.1016/j.molimm.2019.12.017.
162. Carlsson P, Mahlapuu M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol.* 2002 Oct 1;250(1):1-23. doi: 10.1006/dbio.2002.0780.
163. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* 2000 Jan 15;14(2):142-6.
164. Tuteja G, Kaestner KH. SnapShot: forkhead transcription factors I. *Cell.* 2007 Sep 21;130(6):1160. doi: 10.1016/j.cell.2007.09.005.
165. Enwere, E. & Thakur, S. (2016). Stains & CD: markers FOXP3, [online] <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsfoxp3.html> [4.10.2021].
166. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul;8(7):523-32. doi: 10.1038/nri2343.
167. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003 Feb 14;299(5609):1057-61. doi: 10.1126/science.1079490.
168. Moes ND, Ruemmele FM, Rings EH. Auto-immune enteropathie bij kinderen [Autoimmune enteropathy in children]. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2011;155:A3246. Dutch.
169. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005 Mar;22(3):329-41. doi: 10.1016/j.immuni.2005.01.016.

170. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 5;102(14):5138-43. doi: 10.1073/pnas.0501675102.
171. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*. 2007 Apr 5;446(7136):685-9. doi: 10.1038/nature05673.
172. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature*. 2008 May 8;453(7192):236-40. doi: 10.1038/nature06878.
173. Du J, Huang C, Zhou B, Ziegler SF. Isoform-specific inhibition of ROR alpha-mediated transcriptional activation by human FOXP3. *J Immunol*. 2008 Apr 1;180(7):4785-92. doi: 10.4049/jimmunol.180.7.4785.
174. Suri-Payer E, Fritzsching B. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol*. 2006 Aug;28(1):3-16. doi: 10.1007/s00281-006-0021-8.
175. Alvarado-Sánchez B, Hernández-Castro B, Portales-Pérez D, Baranda L, Layseca-Espinosa E, Abud-Mendoza C, Cubillas-Tejeda AC, González-Amaro R. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 2006 Sep;27(2):110-8. doi: 10.1016/j.jaut.2006.06.005.
176. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood*. 2006 Aug 1;108(3):804-11. doi: 10.1182/blood-2006-02-002774.
177. Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W, Liu Y, Wang Y, Liu X, Chan MW, Liu JQ, Love R, Liu CG, Godfrey V, Shen R, Huang TH, Yang T, Park BK, Wang CY, Zheng P, Liu Y. FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1275-86. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.034.
178. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grüssel S, Sipos B, Grützmann R, Pilarsky C, Ungefroren H, Saeger HD, Klöppel G, Kabelitz D, Kalthoff H. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res*. 2007 Sep 1;67(17):8344-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3304.
179. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Mènard S, Tagliabue E, Balsari A. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 10;27(11):1746-52. doi: 10.1200/JCO.2008.17.9036.
180. Tozbikian, G. (2021). Stains & CD markers: PDL1 22C3, [online] <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsPDL1.html> [12.09.2021].

181. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002 Aug;8(8):793-800. doi: 10.1038/nm730.
182. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999 Dec;5(12):1365-9. doi: 10.1038/70932.
183. Arand, M. (2017). Bedeutung der PD-L1-Testung. *Deutsches Ärzteblatt*, 114(25), A1250
184. Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N, Overberg P, Rose I, Basu GD, Vranic S, Lynch HT, Von Hoff DD, Hamid O. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Dec;23(12):2965-70. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0654.
185. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, Su X, Wang Y, Gonzalez-Angulo AM, Akcakanat A, Chawla A, Curran M, Hwu P, Sharma P, Litton JK, Molldrem JJ, Alatrash G. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014 Apr;2(4):361-70. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0127.
186. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusof MM, Gallardo C, Lipatov O, Barrios CH, Holgado E, Iwata H, Masuda N, Otero MT, Gokmen E, Loi S, Guo Z, Zhao J, Aktan G, Karantza V, Schmid P; KEYNOTE-355 Investigators. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet.* 2020 Dec 5;396(10265):1817-1828. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32531-9.
187. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthy S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jun 28;366(26):2455-65. doi: 10.1056/NEJMoa1200694.
188. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, Denkert C, Park YH, Hui R, Harbeck N, Takahashi M, Foukakis T, Fasching PA, Cardoso F, Untch M, Jia L, Karantza V, Zhao J, Aktan G, Dent R, O'Shaughnessy J; KEYNOTE-522 Investigators. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2020 Feb 27;382(9):810-821. doi: 10.1056/NEJMoa1910549.
189. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, Iyer AK. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol.* 2017 Aug 23;8:561. doi: 10.3389/fphar.2017.00561.

190. Wu P, Wu D, Li L, Chai Y, Huang J. PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015 Jun 26;10(6):e0131403. doi: 10.1371/journal.pone.0131403.
191. Ribas A, Hu-Lieskovan S. What does PD-L1 positive or negative mean? *J Exp Med*. 2016 Dec 12;213(13):2835-2840. doi: 10.1084/jem.20161462.
192. Zhang, S. et al. (2016). *Progress in Cancer Immunotherapy*. Cham/CH: Springer.
193. Kerr, D. & Johnson, R. (2017). *Immunotherapy for Gastrointestinal Cancer (eBook)*. Cham/CH: Springer.
194. Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. *Immunity*. 2016 May 17;44(5):1069-78. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.023. -
195. Ito A, Kondo S, Tada K, Kitano S. Clinical Development of Immune Checkpoint Inhibitors. *Biomed Res Int*. 2015;2015:605478. doi: 10.1155/2015/605478.
196. Shih K, Arkenau HT, Infante JR. Clinical impact of checkpoint inhibitors as novel cancer therapies. *Drugs*. 2014 Nov;74(17):1993-2013. doi: 10.1007/s40265-014-0305-6.
197. Ridolfi RL, Rosen PP, Port A, Kinne D, Miké V. Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer*. 1977 Oct;40(4):1365-85. doi: 10.1002/1097-0142(197710)40:4<1365::aid-cncr2820400402>3.0.co;2-n.
198. Zangouri V MD, Akrami M MD, Tahmasebi S MD, Talei A MD, Ghaeini Hesarooei A MD. Medullary Breast Carcinoma and Invasive Ductal Carcinoma: A Review Study. *Iran J Med Sci*. 2018 Jul;43(4):365-371.
199. Lee M, Jara-Lazaro AR, Cheek PY, Thike AA. Medullary breast carcinoma: a pathologic review and immunohistochemical study using tissue microarray. *Singapore Med J*. 2021 Apr 16. doi: 10.11622/smedj.2021031.
200. Haylock BJ, Coppin CM, Jackson J, Basco VE, Wilson KS. Locoregional first recurrence after mastectomy: prospective cohort studies with and without immediate chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000 Jan 15;46(2):355-62. doi: 10.1016/s0360-3016(99)00428-9.
201. Rubin, R., Strayer, D. S., Rubin, E., McDonald, J., Michalopoulos, G. K. & Trojanowski, J. (2008). *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine*. 5 Aufl. Philadelphia: Wolters Kluwer.
202. Marginean F, Rakha EA, Ho BC, Ellis IO, Lee AH. Histological features of medullary carcinoma and prognosis in triple-negative basal-like carcinomas of the breast. *Mod Pathol*. 2010 Oct;23(10):1357-63. doi: 10.1038/modpathol.2010.123.
203. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*. 2008 May 20;26(15):2568-81. doi: 10.1200/JCO.2007.13.1748.

204. Podoll, M. B. & Reisenbichler, E. S. (2017). Invasive breast carcinoma of no special type and variants: Medullary, [online] <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignantmedullary.html>. [19.05.2021].
205. Wargotz ES, Silverberg SG. Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with appraisal of current diagnostic criteria. *Hum Pathol.* 1988 Nov;19(11):1340-6. doi: 10.1016/s0046-8177(88)80290-9.
206. Vu-Nishino H, Tavassoli FA, Ahrens WA, Haffty BG. Clinicopathologic features and long-term outcome of patients with medullary breast carcinoma managed with breast-conserving therapy (BCT). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 Jul 15;62(4):1040-7. doi: 10.1016/j.ijrobp.2005.01.008.
207. Kim J, Kim JY, Lee HB, Lee YJ, Seong MK, Paik N, Park WC, Park S, Jung SP, Bae SY; Korean Breast Cancer Society. Characteristics and prognosis of 17 special histologic subtypes of invasive breast cancers according to World Health Organization classification: comparative analysis to invasive carcinoma of no special type. *Breast Cancer Res Treat.* 2020 Nov;184(2):527-542. doi: 10.1007/s10549-020-05861-6.
208. Aksoy A, Odabas H, Kaya S, Bozkurt O, Degirmenci M, Topcu TO, Aytakin A, Arpaci E, Avci N, Pilanci KN, Cinkir HY, Bozkaya Y, Cirak Y, Gumus M. Hormone receptor status and survival of medullary breast cancer patients. A Turkish cohort. *Saudi Med J.* 2017 Feb;38(2):156-162. doi: 10.15537/smj.2017.2.18055. PMID: 28133688; PMCID: PMC5329627.
209. Mateo AM, Pezzi TA, Sundermeyer M, Kelley CA, Klimberg VS, Pezzi CM. Chemotherapy Significantly Improves Survival for Patients with T1c-T2N0M0 Medullary Breast Cancer: 3739 Cases From the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol.* 2017 Apr;24(4):1050-1056. doi: 10.1245/s10434-016-5649-6.
210. Rakha EA, Aleskandarany M, El-Sayed ME, Blamey RW, Elston CW, Ellis IO, Lee AH. The prognostic significance of inflammation and medullary histological type in invasive carcinoma of the breast. *Eur J Cancer.* 2009 Jul;45(10):1780-7. doi: 10.1016/j.ejca.2009.02.014.
211. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, Joensuu H, Dieci MV, Badve S, Demaria S, Gray R, Munzone E, Lemonnier J, Sotiriou C, Piccart MJ, Kellokumpu-Lehtinen PL, Vingiani A, Gray K, Andre F, Denkert C, Salgado R, Michiels S. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol.* 2019 Mar 1;37(7):559-569. doi: 10.1200/JCO.18.01010.
212. Qin W, Qi F, Guo M, Wang L, Zang YS. Hormone Receptor Status May Impact the Survival Benefit Between Medullary Breast Carcinoma and Atypical Medullary Carcinoma of the Breast: A Population-Based Study. *Front Oncol.* 2021 Jul 6;11:677207. doi: 10.3389/fonc.2021.677207.
213. Welsch, U. et al. (2006). *Lehrbuch Histologie.* 2 Aufl. München: Elsevier.
214. Cimino-Mathews A. Novel uses of immunohistochemistry in breast pathology: interpretation and pitfalls. *Mod Pathol.* 2021 Jan;34(Suppl 1):62-77. doi: 10.1038/s41379-020-00697-3.

215. Huang W, Ran R, Shao B, Li H. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Nov;178(1):17-33. doi: 10.1007/s10549-019-05371-0.
216. Stovgaard ES, Dyhl-Polk A, Roslind A, Balslev E, Nielsen D. PD-L1 expression in breast cancer: expression in subtypes and prognostic significance: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Apr;174(3):571-584. doi: 10.1007/s10549-019-05130-1.
217. Koletsa T, Kotoula V, Koliou GA, Manousou K, Chrisafi S, Zagouri F, Sotiropoulou M, Pentheroudakis G, Papoudou-Bai A, Christodoulou C, Xepapadakis G, Zografos G, Petraki K, Pazarli E, Koutras A, Kourea HP, Bafaloukos D, Chatzopoulos K, Iliadis A, Markopoulos C, Venizelos V, Arnogiannaki N, Kalogeras KT, Kostopoulos I, Gogas H, Fountzilias G. Prognostic impact of stromal and intratumoral CD3, CD8 and FOXP3 in adjuvantly treated breast cancer: do they add information over stromal tumor-infiltrating lymphocyte density? *Cancer Immunol Immunother.* 2020 Aug;69(8):1549-1564. doi: 10.1007/s00262-020-02557-0.
218. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Ménétrier-Caux C. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 2009 Mar 1;69(5):2000-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2360.
219. Zhou Y, Shao N, Aierken N, Xie C, Ye R, Qian X, Hu Z, Zhang J, Lin Y. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells in patients with breast cancer: a meta-analysis. *J Cancer.* 2017 Nov 1;8(19):4098-4105. doi: 10.7150/jca.21030.
220. Demir L, Yigit S, Ellidokuz H, Erten C, Somali I, Kucukzeybek Y, Alacacioglu A, Cokmert S, Can A, Akyol M, Dirican A, Bayoglu V, Sari AA, Tarhan MO. Predictive and prognostic factors in locally advanced breast cancer: effect of intratumoral FOXP3+ Tregs. *Clin Exp Metastasis.* 2013 Dec;30(8):1047-62. doi: 10.1007/s10585-013-9602-9.
221. Takenaka M, Seki N, Toh U, Hattori S, Kawahara A, Yamaguchi T, Koura K, Takahashi R, Otsuka H, Takahashi H, Iwakuma N, Nakagawa S, Fujii T, Sasada T, Yamaguchi R, Yano H, Shirouzu K, Kage M. FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis. *Mol Clin Oncol.* 2013 Jul;1(4):625-632. doi: 10.3892/mco.2013.107
222. Beissert S, Loser K. Molecular and cellular mechanisms of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 2008 Jan-Feb;84(1):29-34. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00231.x.
223. Molling JW, de Gruijl TD, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer CJ, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, von Blumberg ME, Bontkes HJ. CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2007 Oct 15;121(8):1749-55. doi: 10.1002/ijc.22894.

224. Curiel TJ. Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin Immunol*. 2008 Apr;20(2):241-6. doi: 10.1016/j.coi.2008.04.008.
225. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 1;24(34):5373-80. doi: 10.1200/JCO.2006.05.9584.
226. Bohling SD, Allison KH. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. *Mod Pathol*. 2008 Dec;21(12):1527-32. doi: 10.1038/modpathol.2008.160.
227. Niakan A, Faghih Z, Talei AR, Ghaderi A. Cytokine profile of CD4+CD25-FoxP3+ T cells in tumor-draining lymph nodes from patients with breast cancer. *Mol Immunol*. 2019 Dec;116:90-97. doi: 10.1016/j.molimm.2019.10.007.
228. Grabenbauer GG, Lahmer G, Distel L, Niedobitek G. Tumor-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3355-60. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2434.
229. Siddiqui SA, Frigola X, Bonne-Annee S, Mercader M, Kuntz SM, Krambeck AE, Sengupta S, Dong H, Chevillat JC, Lohse CM, Krco CJ, Webster WS, Leibovich BC, Blute ML, Knutson KL, Kwon ED. Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 1;13(7):2075-81. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2139.
230. Sun S, Fei X, Mao Y, Wang X, Garfield DH, Huang O, Wang J, Yuan F, Sun L, Yu Q, Jin X, Wang J, Shen K. PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2014 Apr;63(4):395-406. doi: 10.1007/s00262-014-1519-x.
231. Kim S, Lee A, Lim W, Park S, Cho MS, Koo H, Moon BI, Sung SH. Zonal difference and prognostic significance of foxp3 regulatory T cell infiltration in breast cancer. *J Breast Cancer*. 2014 Mar;17(1):8-17. doi: 10.4048/jbc.2014.17.1.8.
232. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, Montserrat E, Campo E, Banham AH. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):2957-64. doi: 10.1182/blood-2006-04-018218.
233. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, Mosseri V, Laccourreye O, Bruneval P, Fridman WH, Brasnu DF, Tartour E. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 15;12(2):465-72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1886.
234. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2008 Feb;93(2):193-200. doi: 10.3324/haematol.11702.

235. Hu G, Li Z, Wang S. Tumor-infiltrating FoxP3+ Tregs predict favorable outcome in colorectal cancer patients: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Jun 7;8(43):75361-75371. doi: 10.18632/oncotarget.17722.
236. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ*. 2003 Sep 6;327(7414):557-60. doi: 10.1136/bmj.327.7414.557.
237. Gao Y, Li X, Shu Z, Zhang K, Xue X, Li W, Hao Q, Wang Z, Zhang W, Wang S, Zeng C, Fan D, Zhang W, Zhang Y, Zhao H, Li M, Zhang C. Nuclear galectin-1-FOXP3 interaction dampens the tumor-suppressive properties of FOXP3 in breast cancer. *Cell Death Dis*. 2018 Apr 1;9(4):416. doi: 10.1038/s41419-018-0448-6.
238. Zuo T, Liu R, Zhang H, Chang X, Liu Y, Wang L, Zheng P, Liu Y. FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene SKP2. *J Clin Invest*. 2007 Dec;117(12):3765-73. doi: 10.1172/JCI32538.
239. Liu R, Wang L, Chen G, Katoh H, Chen C, Liu Y, Zheng P. FOXP3 up-regulates p21 expression by site-specific inhibition of histone deacetylase 2/histone deacetylase 4 association to the locus. *Cancer Res*. 2009 Mar 15;69(6):2252-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3717.
240. Li W, Wang L, Katoh H, Liu R, Zheng P, Liu Y. Identification of a tumor suppressor relay between the FOXP3 and the Hippo pathways in breast and prostate cancers. *Cancer Res*. 2011 Mar 15;71(6):2162-71. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3268.
241. McInnes N, Sadlon TJ, Brown CY, Pederson S, Beyer M, Schultze JL, McColl S, Goodall GJ, Barry SC. FOXP3 and FOXP3-regulated microRNAs suppress SATB1 in breast cancer cells. *Oncogene*. 2012 Feb 23;31(8):1045-54. doi: 10.1038/onc.2011.293.
242. Douglass S, Meeson AP, Overbeck-Zubrzycka D, Brain JG, Bennett MR, Lamb CA, Lennard TW, Browell D, Ali S, Kirby JA. Breast cancer metastasis: demonstration that FOXP3 regulates CXCR4 expression and the response to CXCL12. *J Pathol*. 2014 Sep;234(1):74-85. doi: 10.1002/path.4381.
243. Rezaeifard S, Talei A, Shariat M, Erfani N. Tumor infiltrating NK cell (TINK) subsets and functional molecules in patients with breast cancer. *Mol Immunol*. 2021 Aug;136:161-167. doi: 10.1016/j.molimm.2021.03.003.
244. Vranic S, Cyprian FS, Gatalica Z, Palazzo J. PD-L1 status in breast cancer: Current view and perspectives. *Semin Cancer Biol*. 2021 Jul;72:146-154. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.12.003.
245. Srivastava S, Furlan SN, Jaeger-Ruckstuhl CA, Sarvothama M, Berger C, Smythe KS, Garrison SM, Specht JM, Lee SM, Amezcua RA, Voillet V, Muhunthan V, Yechan-Gunja S, Pillai SPS, Rader C, Houghton AM, Pierce RH, Gottardo R, Maloney DG, Riddell SR. Immunogenic Chemotherapy Enhances Recruitment of CAR-T Cells to Lung Tumors and Improves Antitumor Efficacy when Combined with Checkpoint Blockade. *Cancer Cell*. 2021 Feb 8;39(2):193-208.e10. doi: 10.1016/j.ccell.2020.11.005.

246. Paver EC, Cooper WA, Colebatch AJ, Ferguson PM, Hill SK, Lum T, Shin JS, O'Toole S, Anderson L, Scolyer RA, Gupta R. Programmed death ligand-1 (PD-L1) as a predictive marker for immunotherapy in solid tumours: a guide to immunohistochemistry implementation and interpretation. *Pathology*. 2021 Feb;53(2):141-156. doi: 10.1016/j.pathol.2020.10.007.
247. Gao W, Wen H, Liang L, Dong X, Du R, Zhou W, Zhang X, Zhang C, Xiang R, Li N. IL20RA signaling enhances stemness and promotes the formation of an immunosuppressive microenvironment in breast cancer. *Theranostics*. 2021 Jan 1;11(6):2564-2580. doi: 10.7150/thno.45280.
248. Gao L, Guo Q, Li X, Yang X, Ni H, Wang T, Zhao Q, Liu H, Xing Y, Xi T, Zheng L. MiR-873/PD-L1 axis regulates the stemness of breast cancer cells. *EBioMedicine*. 2019 Mar;41:395-407. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.02.034.
249. Cai S, Chen Z, Wang Y, Wang M, Wu J, Tong Y, Chen L, Lu C, Yang H. Reducing PD-L1 expression with a self-assembled nanodrug: an alternative to PD-L1 antibody for enhanced chemo-immunotherapy. *Theranostics*. 2021 Jan 1;11(4):1970-1981. doi: 10.7150/thno.45777.
250. Tian Y, Wang X, Zhao S, Liao X, Younis MR, Wang S, Zhang C, Lu G. JQ1-Loaded Polydopamine Nanoplatfrom Inhibits c-MYC/Programmed Cell Death Ligand 1 to Enhance Photothermal Therapy for Triple-Negative Breast Cancer. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 Dec 18;11(50):46626-46636. doi: 10.1021/acsami.9b18730.
251. Wang H, Yao H, Li C, Shi H, Lan J, Li Z, Zhang Y, Liang L, Fang JY, Xu J. HIP1R targets PD-L1 to lysosomal degradation to alter T cell-mediated cytotoxicity. *Nat Chem Biol*. 2019 Jan;15(1):42-50. doi: 10.1038/s41589-018-0161-x.
252. Flies DB, Chen L. The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity. *J Immunother*. 2007 Apr;30(3):251-60. doi: 10.1097/CJI.0b013e31802e085a.
253. Terranova-Barberio M, Pawlowska N, Dhawan M, Moasser M, Chien AJ, Melisko ME, Rugo H, Rahimi R, Deal T, Daud A, Rosenblum MD, Thomas S, Munster PN. Exhausted T cell signature predicts immunotherapy response in ER-positive breast cancer. *Nat Commun*. 2020 Jul 17;11(1):3584. doi: 10.1038/s41467-020-17414-y.
254. Adams S, Loi S, Toppmeyer D, Cescon DW, De Laurentiis M, Nanda R, Winer EP, Mukai H, Tamura K, Armstrong A, Liu MC, Iwata H, Ryvo L, Wimberger P, Rugo HS, Tan AR, Jia L, Ding Y, Karantza V, Schmid P. Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*. 2019 Mar 1;30(3):405-411. doi: 10.1093/annonc/mdy518.
255. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest*. 2015 Sep;125(9):3384-91. doi: 10.1172/JCI80011.
256. Atkins MB, Clark JI, Quinn DI. Immune checkpoint inhibitors in advanced renal cell carcinoma: experience to date and future directions. *Ann Oncol*. 2017 Jul 1;28(7):1484-1494. doi: 10.1093/annonc/mdx151.

257. Moslehi JJ, Salem JE, Sosman JA, Lebrun-Vignes B, Johnson DB. Increased reporting of fatal immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis. *Lancet*. 2018 Mar 10;391(10124):933. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30533-6.
258. Kwon S, Velasquez FC, Rasmussen JC, Greives MR, Turner KD, Morrow JR, Hwu WJ, Ross RF, Zhang S, Sevick-Muraca EM. Nanotopography-based lymphatic delivery for improved anti-tumor responses to checkpoint blockade immunotherapy. *Theranostics*. 2019 Oct 22;9(26):8332-8343. doi: 10.7150/thno.35280.
259. Zhang Z, Wang Q, Liu Q, Zheng Y, Zheng C, Yi K, Zhao Y, Gu Y, Wang Y, Wang C, Zhao X, Shi L, Kang C, Liu Y. Dual-Locking Nanoparticles Disrupt the PD-1/PD-L1 Pathway for Efficient Cancer Immunotherapy. *Adv Mater*. 2019 Dec;31(51):e1905751. doi: 10.1002/adma.201905751.
260. Song W, Shen L, Wang Y, Liu Q, Goodwin TJ, Li J, Dorosheva O, Liu T, Liu R, Huang L. Synergistic and low adverse effect cancer immunotherapy by immunogenic chemotherapy and locally expressed PD-L1 trap. *Nat Commun*. 2018 Jun 8;9(1):2237. doi: 10.1038/s41467-018-04605-x.
261. Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol*. 2009 May;157(2):220-33. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x.
262. Yao H, Lan J, Li C, Shi H, Brosseau JP, Wang H, Lu H, Fang C, Zhang Y, Liang L, Zhou X, Wang C, Xue Y, Cui Y, Xu J. Inhibiting PD-L1 palmitoylation enhances T-cell immune responses against tumours. *Nat Biomed Eng*. 2019 Apr;3(4):306-317. doi: 10.1038/s41551-019-0375-6.
263. Li L, Li Y, Yang CH, Radford DC, Wang J, Janát-Amsbury M, Kopeček J, Yang J. Inhibition of Immunosuppressive Tumors by Polymer-Assisted Inductions of Immunogenic Cell Death and Multivalent PD-L1 Crosslinking. *Adv Funct Mater*. 2020 Mar 17;30(12):1908961. doi: 10.1002/adfm.201908961.
264. Lyons TG. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2019 Nov 21;20(11):82. doi: 10.1007/s11864-019-0682-x.
265. Xue Y, Gao S, Gou J, Yin T, He H, Wang Y, Zhang Y, Tang X, Wu R. Platinum-based chemotherapy in combination with PD-1/PD-L1 inhibitors: preclinical and clinical studies and mechanism of action. *Expert Opin Drug Deliv*. 2021 Feb;18(2):187-203. doi: 10.1080/17425247.2021.1825376.
266. Heimes AS, Schmidt M. Atezolizumab for the treatment of triple-negative breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2019 Jan;28(1):1-5. doi: 10.1080/13543784.2019.1552255.
267. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans*. 2018 May 15;47(19):6645-6653. doi: 10.1039/c8dt00838h.

268. Xing S, Qu Y, Li C, Huang A, Tong S, Wu C, Fan K. Deregulation of lncRNA-AC078883.3 and microRNA-19a is involved in the development of chemoresistance to cisplatin via modulating signaling pathway of PTEN/AKT. *J Cell Physiol.* 2019 Dec;234(12):22657-22665. doi: 10.1002/jcp.28832.
269. Shea EKH, Koh VCY, Tan PH. Invasive breast cancer: Current perspectives and emerging views. *Pathol Int.* 2020 May;70(5):242-252. doi: 10.1111/pin.12910.
270. Gomez-Macias GS, Molinar-Flores G, Lopez-Garcia CA, Santuario-Facio S, Decanini-Arcaute H, Valero-Elizondo J, Treviño-Alvarado V, Ortiz-Lopez R, Dono A, Esteban-Zubero E, Alatorre-Jimenez MA, Garza CV, Peña-Curiel O, Cardona-Huerta S. Immunotyping of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer and genetic characterization. *Oncol Lett.* 2020 Nov;20(5):140. doi: 10.3892/ol.2020.12000.
271. Sahin Ozkan H, Ugurlu MU, Yumuk PF, Kaya H. Prognostic Role of Immune Markers in Triple Negative Breast Carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2020 Oct;26(4):2733-2745. doi: 10.1007/s12253-020-00874-4.
272. Lotfinejad P, Kazemi T, Mokhtarzadeh A, Shanehbandi D, Jadidi Niaragh F, Sa-faei S, Asadi M, Baradaran B. PD-1/PD-L1 axis importance and tumor microenvironment immune cells. *Life Sci.* 2020 Oct 15;259:118297. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118297.
273. Setordzi P, Chang X, Liu Z, Wu Y, Zuo D. The recent advances of PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for breast cancer immunotherapy. *Eur J Pharmacol.* 2021 Mar 15;895:173867. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.173867
274. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, Elkum N, Alshabanah M, Bin Amer S, Tulbah A, Ajarim D, Al-Tweigeri T, Dermime S. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia.* 2006 Mar;8(3):190-8. doi: 10.1593/neo.05733.
275. Soliman H, Khalil F, Antonia S. PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. *PLoS One.* 2014 Feb 14;9(2):e88557. doi: 10.1371/journal.pone.0088557.
276. Yılmaz TU, Trabzonlu L, Güler SA, Baran MA, Pösteki G, Erçin C, Utkan Z. Characteristics of Special Type Breast Tumors in Our Center. *Eur J Breast Health.* 2018 Jan 1;14(1):17-22. doi: 10.5152/ejbh.2017.3219.
277. Rapin V, Contesso G, Mouriesse H, Bertin F, Lacombe MJ, Piekarski JD, Travagli JP, Gadenne C, Friedman S. Medullary breast carcinoma. A reevaluation of 95 cases of breast cancer with inflammatory stroma. *Cancer.* 1988 Jun 15;61(12):2503-10. doi: 10.1002/1097-0142(19880615)61:12<2503::aid-cncr2820611219>3.0.co;2-3.
278. Elimimian EB, Samuel TA, Liang H, Elson L, Bilani N, Nahleh ZA. Clinical and Demographic Factors, Treatment Patterns, and Overall Survival Associated With Rare Triple-Negative Breast Carcinomas in the US. *JAMA Netw Open.* 2021 Apr 1;4(4):e214123. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.4123.

279. Anz D, Eiber S, Scholz C, Endres S, Kirchner T, Bourquin C, Mayr D. In breast cancer, a high ratio of tumour-infiltrating intraepithelial CD8+ to FoxP3+ cells is characteristic for the medullary subtype. *Histopathology*. 2011 Nov;59(5):965-74. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04040.x.
280. Doğukan R, Uçak R, Doğukan FM, Tanık C, Çitgez B, Kabukcuoğlu F. Correlation between the Expression of PD-L1 and Clinicopathological Parameters in Triple Negative Breast Cancer Patients. *Eur J Breast Health*. 2019 Oct 1;15(4):235-241. doi: 10.5152/ejbh.2019.4912.
281. Dill EA, Gru AA, Atkins KA, Friedman LA, Moore ME, Bullock TN, Cross JV, Dillon PM, Mills AM. PD-L1 Expression and Intratumoral Heterogeneity Across Breast Cancer Subtypes and Stages: An Assessment of 245 Primary and 40 Metastatic Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2017 Mar;41(3):334-342. doi: 10.1097/PAS.0000000000000780.
282. Romero P, Benhamo V, Denizaut G, Fuhrmann L, Berger F, Manié E, Bhalshankar J, Vacher S, Laurent C, Marangoni E, Gruel N, MacGrogan G, Rouzier R, Delattre O, Popova T, Reyal F, Stern MH, Stoppa-Lyonnet D, Marchiò C, Bièche I, Vincent-Salomon A. Medullary Breast Carcinoma, a Triple-Negative Breast Cancer Associated with BCLG Overexpression. *Am J Pathol*. 2018 Oct;188(10):2378-2391. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.06.021.
283. Zhang S, Huang S, Zhang H, Li D, Li X, Cheng Y, Liu Q, Xu L, Wang Y, Liu Y, Li T. Histo- and clinico-pathological analysis of a large series of triple-negative breast cancer in a single center in China: Evidences on necessity of histological subtyping and grading. *Chin J Cancer Res*. 2020 Oct 31;32(5):580-595. doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2020.05.03.
284. Gulbahce HE, Downs-Kelly E, Herget KA, Stoddard GJ. The 21-Gene Recurrence Score in Special Histologic Subtypes of Breast Cancer: A Population-Based Study. *Arch Pathol Lab Med*. 2021 Aug 3. doi: 10.5858/arpa.2020-0837-OA.
285. Trapani D, Giugliano F, Uliano J, Zia VAA, Marra A, Viale G, Ferraro E, Esposito A, Criscitiello C, D'amico P, Curigliano G. Benefit of adjuvant chemotherapy in patients with special histology subtypes of triple-negative breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat*. 2021 Jun;187(2):323-337. doi: 10.1007/s10549-021-06259-8.
286. Qian XL, Xu P, Zhang YQ, Song YM, Li YQ, Li WD, Jiang CY, Shen BB, Zhang XM, Zhang LN, Fu L, Guo XJ. Increased number of intratumoral IL-17+ cells, a harbinger of the adverse prognosis of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2020 Apr;180(2):311-319. doi: 10.1007/s10549-020-05540-6.
287. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*. 1986 Sep 19;233(4770):1318-21. doi: 10.1126/science.3489291.

288. Lv S, Wang S, Qiao G, Wang X, Zhou X, Yan F, Li Y, Wang S, Morse MA, Hobeika A, Ren J, Lyerly HK. Functional CD3+CD8+PD1- T Cell Accumulation and PD-L1 Expression Increases During Tumor Invasion in DCIS of the Breast. *Clin Breast Cancer*. 2019 Oct;19(5):e617-e623. doi: 10.1016/j.clbc.2019.04.001.
289. Mi H, Gong C, Sulam J, Fertig EJ, Szalay AS, Jaffee EM, Stearns V, Emens LA, Cimino-Mathews AM, Popel AS. Digital Pathology Analysis Quantifies Spatial Heterogeneity of CD3, CD4, CD8, CD20, and FoxP3 Immune Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Physiol*. 2020 Oct 19;11:583333. doi: 10.3389/fphys.2020.583333.
290. Li Y, Vennapusa B, Chang CW, Tran D, Nakamura R, Sumiyoshi T, Hegde P, Molinero L. Prevalence Study of PD-L1 SP142 Assay in Metastatic Triple-negative Breast Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2021 Apr 1;29(4):258-264. doi: 10.1097/PAI.0000000000000857.
291. Lyndin M, Hyriavenko N, Sikora V, Lyndina Y, Soroka Y, Romaniuk A. Invasive Breast Carcinoma of No Special Type with Medullary Pattern: Morphological and Immunohistochemical Features. *Turk Patoloji Derg*. 2021 Oct 12. English. doi: 10.5146/tjpath.2021.01559.
292. Shash LS, M Kamal KA, Abd Raboh NM. Exploring the role CD163-labeled TAMs and FOXP3-labeled Tregs in different types of breast cancer: Reflections and putative benefits. *Indian J Pathol Microbiol*. 2021 Jan-Mar;64(1):28-37. doi: 10.4103/IJPM.IJPM_210_20.
293. Ladoire S, Arnould L, Mignot G, Coudert B, Rébé C, Chalmin F, Vincent J, Bruchard M, Chauffert B, Martin F, Fumoleau P, Ghiringhelli F. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jan;125(1):65-72. doi: 10.1007/s10549-010-0831-1.
294. Lopes LF, Guembarovski RL, Guembarovski AL, Kishima MO, Campos CZ, Oda JM, Ariza CB, de Oliveira KB, Borelli SD, Watanabe MA. FOXP3 transcription factor: a candidate marker for susceptibility and prognosis in triple negative breast cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:341654. doi: 10.1155/2014/341654.
295. Triulzi T, Tagliabue E, Balsari A, Casalini P. FOXP3 expression in tumor cells and implications for cancer progression. *J Cell Physiol*. 2013 Jan;228(1):30-5. doi: 10.1002/jcp.24125.
296. Kim MH, Koo JS, Lee S. FOXP3 expression is related to high Ki-67 index and poor prognosis in lymph node-positive breast cancer patients. *Oncology*. 2013;85(2):128-36. doi: 10.1159/000351473.
297. Zhao X, Li Y, Wang X, Wu J, Yuan Y, Lv S, Ren J. Synergistic association of FOXP3+ tumor infiltrating lymphocytes with CCL20 expressions with poor prognosis of primary breast cancer: A retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Dec;98(50):e18403. doi: 10.1097/MD.00000000000018403.

298. Tavares MC, Sampaio CD, Lima GE, Andrade VP, Gonçalves DG, Macedo MP, Cordeiro de Lima VC. A high CD8 to FOXP3 ratio in the tumor stroma and expression of PTEN in tumor cells are associated with improved survival in non-metastatic triple-negative breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2021 Aug 6;21(1):901. doi: 10.1186/s12885-021-08636-4.
299. Fukui R, Fujimoto Y, Watanabe T, Inoue N, Bun A, Higuchi T, Imamura M, Morimoto K, Hirota S, Miyoshi Y. Association Between FOXP3/CD8 Lymphocyte Ratios and Tumor Infiltrating Lymphocyte Levels in Different Breast Cancer Subtypes. *Anticancer Res*. 2020 Apr;40(4):2141-2150. doi: 10.21873/anticancer-res.14173.
300. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, Budczies J, Huober J, Klauschen F, Furlanetto J, Schmitt WD, Blohmer JU, Karn T, Pfitzner BM, Kümmel S, Engels K, Schneeweiss A, Hartmann A, Noske A, Fasching PA, Jackisch C, van Mackelenbergh M, Sinn P, Schem C, Hanusch C, Untch M, Loibl S. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018 Jan;19(1):40-50. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30904-X.
301. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2016 Oct 18;4:59. doi: 10.1186/s40425-016-0165-6.
302. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, Rouas G, Francis P, Crown JP, Hitre E, de Azambuja E, Quinaux E, Di Leo A, Michiels S, Piccart MJ, Sotiriou C. 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 Mar 1;31(7):860-7. doi: 10.1200/JCO.2011.41.0902.
303. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, Martino S, Wang M, Jones VE, Saphner TJ, Wolff AC, Wood WC, Davidson NE, Sledge GW, Sparano JA, Badve SS. 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 Sep 20;32(27):2959-66. doi: 10.1200/JCO.2013.55.0491.
304. Kotlan B, Horvath S, Eles K, Plotar VK, Naszados G, Czirbesz K, Blank M, Farkas E, Toth L, Tovari J, Szekacs A, Shoenfeld Y, Godeny M, Kasler M, Liskay G. Tumor-Associated Disialylated Glycosphingolipid Antigen-Revealing Antibodies Found in Melanoma Patients' Immunoglobulin Repertoire Suggest a Two-Direction Regulation Mechanism Between Immune B Cells and the Tumor. *Front Immunol*. 2019 Apr 5;10:650. doi: 10.3389/fimmu.2019.00650.
305. Natal RA, Paiva GR, Pelegati VB, Marengo L, Alvarenga CA, Vargas RF, Derchain SF, Sarian LO, Franchet C, Cesar CL, Schmitt FC, Weigelt B, Vassallo J. Exploring Collagen Parameters in Pure Special Types of Invasive Breast Cancer. *Sci Rep*. 2019 May 22;9(1):7715. doi: 10.1038/s41598-019-44156-9.

306. Kääh-Sanyal, V. (2021). Mammografie-Screening: Detektion von relevanten Brustkrebsformen. *Deutsches Ärzteblatt*, 118(43)
307. Moorman AM, Vink R, Rutgers EJT, Kouwenhoven EA. Incidence, clinical features, and outcomes of special types in breast cancer in a single institution population. *Breast J.* 2020 Nov;26(11):2163-2169. doi: 10.1111/tbjc.14069.
308. Yu S, Zhang J, Yan Y, Yao X, Fang L, Xiong H, Liu Y, Chu Q, Zhou P, Wu K. A novel asymmetrical anti-HER2/CD3 bispecific antibody exhibits potent cytotoxicity for HER2-positive tumor cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Aug 14;38(1):355. doi: 10.1186/s13046-019-1354-1.
309. Groeneveldt C, Kinderman P, van den Wollenberg DJM, van den Oever RL, Middelburg J, Mustafa DAM, Hoeben RC, van der Burg SH, van Hall T, van Montfoort N. Preconditioning of the tumor microenvironment with oncolytic reovirus converts CD3-bispecific antibody treatment into effective immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2020 Oct;8(2):e001191. doi: 10.1136/jitc-2020-001191.
310. Heinze E, Baldwin S, Chan G, Hansen J, Song J, Clements D, Aragon R, Nishimura R, Reeves M, Weisbart R. Antibody-mediated FOXP3 protein therapy induces apoptosis in cancer cells in vitro and inhibits metastasis in vivo. *Int J Oncol.* 2009 Jul;35(1):167-73. doi: 10.3892/ijo_00000325.
311. Curiel TJ. Regulatory T-cell development: is Foxp3 the decider? *Nat Med.* 2007 Mar;13(3):250-3. doi: 10.1038/nm0307-250.
312. Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, Martinez-Allo VC, Dergan-Dylon S, Méndez-Huergo SP, Stupirski JC, Mazal D, Osinaga E, Toscano MA, Sundblad V, Rabinovich GA, Salatino M. Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer Res.* 2013 Feb 1;73(3):1107-17. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2418.
313. Kreunin P, Yoo C, Urquidi V, Lubman DM, Goodison S. Proteomic profiling identifies breast tumor metastasis-associated factors in an isogenic model. *Proteomics.* 2007 Jan;7(2):299-312. doi: 10.1002/pmic.200600272.
314. Cousin JM, Cloninger MJ. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep 16;17(9):1566. doi: 10.3390/ijms17091566.
315. Wang Q, Gao J, Di W, Wu X. Anti-angiogenesis therapy overcomes the innate resistance to PD-1/PD-L1 blockade in VEGFA-overexpressed mouse tumor models. *Cancer Immunol Immunother.* 2020 Sep;69(9):1781-1799. doi: 10.1007/s00262-020-02576-x.
316. Wolchok JD, Chan TA. Cancer: Antitumour immunity gets a boost. *Nature.* 2014 Nov 27;515(7528):496-8. doi: 10.1038/515496a.

317. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2443-54. doi: 10.1056/NEJMoa1200690.
318. Song TL, Nairismägi ML, Laurensia Y, Lim JQ, Tan J, Li ZM, Pang WL, Kizhakeyil A, Wijaya GC, Huang DC, Nagarajan S, Chia BK, Cheah D, Liu YH, Zhang F, Rao HL, Tang T, Wong EK, Bei JX, Iqbal J, Grigoropoulos NF, Ng SB, Chng WJ, Teh BT, Tan SY, Verma NK, Fan H, Lim ST, Ong CK. Oncogenic activation of the STAT3 pathway drives PD-L1 expression in natural killer/T-cell lymphoma. *Blood*. 2018 Sep 13;132(11):1146-1158. doi: 10.1182/blood-2018-01-829424.
319. Fang W, Zhou T, Shi H, Yao M, Zhang D, Qian H, Zeng Q, Wang Y, Jin F, Chai C, Chen T. Progranulin induces immune escape in breast cancer via up-regulating PD-L1 expression on tumor-associated macrophages (TAMs) and promoting CD8+ T cell exclusion. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021 Jan 4;40(1):4. doi: 10.1186/s13046-020-01786-6.
320. Vancura A, Bu P, Bhagwat M, Zeng J, Vancurova I. Metformin as an Anticancer Agent. *Trends Pharmacol Sci*. 2018 Oct;39(10):867-878. doi: 10.1016/j.tips.2018.07.006.
321. Garcia A, Tisman G. Metformin, B(12), and enhanced breast cancer response to chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 10;28(2):e19; author reply e20. doi: 10.1200/JCO.2009.25.7857.
322. Pierotti MA, Berrino F, Gariboldi M, Melani C, Mogavero A, Negri T, Pasanisi P, Pilotti S. Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects. *Oncogene*. 2013 Mar 21;32(12):1475-87. doi: 10.1038/onc.2012.181.
323. Cha JH, Yang WH, Xia W, Wei Y, Chan LC, Lim SO, Li CW, Kim T, Chang SS, Lee HH, Hsu JL, Wang HL, Kuo CW, Chang WC, Hadad S, Purdie CA, McCoy AM, Cai S, Tu Y, Litton JK, Mittendorf EA, Moulder SL, Symmans WF, Thompson AM, Piwnica-Worms H, Chen CH, Khoo KH, Hung MC. Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Mol Cell*. 2018 Aug 16;71(4):606-620.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.030.
324. Felekis K, Touvana E, Stefanou Ch, Deltas C. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*. 2010 Oct;14(4):236-40.
325. Wang X, Li J, Dong K, Lin F, Long M, Ouyang Y, Wei J, Chen X, Weng Y, He T, Zhang H. Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell Signal*. 2015 Mar;27(3):443-52. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.12.003.

326. Xu S, Tao Z, Hai B, Liang H, Shi Y, Wang T, Song W, Chen Y, OuYang J, Chen J, Kong F, Dong Y, Jiang SW, Li W, Wang P, Yuan Z, Wan X, Wang C, Li W, Zhang X, Chen K. miR-424(322) reverses chemoresistance via T-cell immune response activation by blocking the PD-L1 immune checkpoint. *Nat Commun.* 2016 May 5;7:11406. doi: 10.1038/ncomms11406.
327. Zhao L, Yu H, Yi S, Peng X, Su P, Xiao Z, Liu R, Tang A, Li X, Liu F, Shen S. The tumor suppressor miR-138-5p targets PD-L1 in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016 Jul 19;7(29):45370-45384. doi: 10.18632/oncotarget.9659
328. Park EY, Chang E, Lee EJ, Lee HW, Kang HG, Chun KH, Woo YM, Kong HK, Ko JY, Suzuki H, Song E, Park JH. Targeting of miR34a-NOTCH1 axis reduced breast cancer stemness and chemoresistance. *Cancer Res.* 2014 Dec 15;74(24):7573-82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1140
329. Zhu Y, Yu F, Jiao Y, Feng J, Tang W, Yao H, Gong C, Chen J, Su F, Zhang Y, Song E. Reduced miR-128 in breast tumor-initiating cells induces chemotherapeutic resistance via Bmi-1 and ABCC5. *Clin Cancer Res.* 2011 Nov 15;17(22):7105-15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0071.
330. Celià-Terrassa T, Liu DD, Choudhury A, Hang X, Wei Y, Zamalloa J, Alfaro-Aco R, Chakrabarti R, Jiang YZ, Koh BI, Smith HA, DeCoste C, Li JJ, Shao ZM, Kang Y. Normal and cancerous mammary stem cells evade interferon-induced constraint through the miR-199a-LCOR axis. *Nat Cell Biol.* 2017 Jun;19(6):711-723. doi: 10.1038/ncb3533.
331. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, Berent-Maoz B, Pang J, Chmielowski B, Cherry G, Seja E, Lomeli S, Kong X, Kelley MC, Sosman JA, Johnson DB, Ribas A, Lo RS. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell.* 2016 Mar 24;165(1):35-44. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.065. Epub 2016 Mar 17. Erratum in: *Cell.* 2017 Jan 26;168(3):542.
332. Chen PL, Roh W, Reuben A, Cooper ZA, Spencer CN, Prieto PA, Miller JP, Bassett RL, Gopalakrishnan V, Wani K, De Macedo MP, Austin-Breneman JL, Jiang H, Chang Q, Reddy SM, Chen WS, Tetzlaff MT, Broaddus RJ, Davies MA, Gershenwald JE, Haydu L, Lazar AJ, Patel SP, Hwu P, Hwu WJ, Diab A, Glitza IC, Woodman SE, Vence LM, Wistuba II, Amaria RN, Kwong LN, Prieto V, Davis RE, Ma W, Overwijk WW, Sharpe AH, Hu J, Futreal PA, Blando J, Sharma P, Allison JP, Chin L, Wargo JA. Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov.* 2016 Aug;6(8):827-37. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1545
333. McDermott DF, Huseni MA, Atkins MB, Motzer RJ, Rini BI, Escudier B, Fong L, Joseph RW, Pal SK, Reeves JA, Sznol M, Hainsworth J, Rathmell WK, Stadler WM, Hutson T, Gore ME, Ravaud A, Bracarda S, Suárez C, Danielli R, Gruenewald V, Choueiri TK, Nickles D, Jhunjhunwala S, Piault-Louis E, Thobhani A, Qiu J, Chen DS, Hegde PS, Schiff C, Fine GD, Powles T. Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma. *Nat Med.* 2018 Jun;24(6):749-757. doi: 10.1038/s41591-018-0053-3.

334. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, Venugopal B, Kollmannsberger C, Negrier S, Uemura M, Lee JL, Vasiliev A, Miller WH Jr, Gurney H, Schmidinger M, Larkin J, Atkins MB, Bedke J, Alekseev B, Wang J, Mariani M, Robbins PB, Chudnovsky A, Fowst C, Hariharan S, Huang B, di Pietro A, Choueiri TK. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2019 Mar 21;380(12):1103-1115. doi: 10.1056/NEJMoa1816047.
335. Rini BI, Powles T, Atkins MB, Escudier B, McDermott DF, Suarez C, Bracarda S, Stadler WM, Donskov F, Lee JL, Hawkins R, Ravaud A, Alekseev B, Staehler M, Uemura M, De Giorgi U, Mellado B, Porta C, Melichar B, Gurney H, Bedke J, Choueiri TK, Parnis F, Khaznadar T, Thobhani A, Li S, Piau-Louis E, Frantz G, Huseni M, Schiff C, Green MC, Motzer RJ; IMmotion151 Study Group. Atezolizumab plus bevacizumab versus sunitinib in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma (IMmotion151): a multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet.* 2019 Jun 15;393(10189):2404-2415. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30723-8.
336. Amin A, Plimack ER, Ernstoff MS, Lewis LD, Bauer TM, McDermott DF, Carducci M, Kollmannsberger C, Rini BI, Heng DY, Knox J, Voss MH, Spratlin J, Berghorn E, Yang L, Hammers HJ. Safety and efficacy of nivolumab in combination with sunitinib or pazopanib in advanced or metastatic renal cell carcinoma: the CheckMate 016 study. *J Immunother Cancer.* 2018 Oct 22;6(1):109. doi: 10.1186/s40425-018-0420-0.
337. Makker V, Rasco D, Vogelzang NJ, Brose MS, Cohn AL, Mier J, Di Simone C, Hyman DM, Stepan DE, Dutcus CE, Schmidt EV, Guo M, Sachdev P, Shumaker R, Aghajanian C, Taylor M. Lenvatinib plus pembrolizumab in patients with advanced endometrial cancer: an interim analysis of a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2019 May;20(5):711-718. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30020-8.
338. Arkenau HT, Martin-Liberal J, Calvo E, Penel N, Krebs MG, Herbst RS, Walgren RA, Widau RC, Mi G, Jin J, Ferry D, Chau I. Ramucirumab Plus Pembrolizumab in Patients with Previously Treated Advanced or Metastatic Biliary Tract Cancer: Nonrandomized, Open-Label, Phase I Trial (JVDF). *Oncologist.* 2018 Dec;23(12):1407-e136. doi: 10.1634/theoncologist.2018-0044.
339. Yang Y, Hsu JM, Sun L, Chan LC, Li CW, Hsu JL, Wei Y, Xia W, Hou J, Qiu Y, Hung MC. Palmitoylation stabilizes PD-L1 to promote breast tumor growth. *Cell Res.* 2019 Jan;29(1):83-86. doi: 10.1038/s41422-018-0124-5.
340. Zhang J, Bu X, Wang H, Zhu Y, Geng Y, Nihira NT, Tan Y, Ci Y, Wu F, Dai X, Guo J, Huang YH, Fan C, Ren S, Sun Y, Freeman GJ, Sicinski P, Wei W. Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance. *Nature.* 2018 Jan 4;553(7686):91-95. doi: 10.1038/nature25015.
341. Li CW, Lim SO, Xia W, Lee HH, Chan LC, Kuo CW, Khoo KH, Chang SS, Cha JH, Kim T, Hsu JL, Wu Y, Hsu JM, Yamaguchi H, Ding Q, Wang Y, Yao J, Lee CC, Wu HJ, Sahin AA, Allison JP, Yu D, Hortobagyi GN, Hung MC. Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat Commun.* 2016 Aug 30;7:12632. doi: 10.1038/ncomms12632.

342. Sun L, Li CW, Chung EM, Yang R, Kim YS, Park AH, Lai YJ, Yang Y, Wang YH, Liu J, Qiu Y, Khoo KH, Yao J, Hsu JL, Cha JH, Chan LC, Hsu JM, Lee HH, Yoo SS, Hung MC. Targeting Glycosylated PD-1 Induces Potent Antitumor Immunity. *Cancer Res.* 2020 Jun 1;80(11):2298-2310. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3133.
343. Lee HH, Wang YN, Xia W, Chen CH, Rau KM, Ye L, Wei Y, Chou CK, Wang SC, Yan M, Tu CY, Hsia TC, Chiang SF, Chao KSC, Wistuba II, Hsu JL, Hortobagyi GN, Hung MC. Removal of N-Linked Glycosylation Enhances PD-L1 Detection and Predicts Anti-PD-1/PD-L1 Therapeutic Efficacy. *Cancer Cell.* 2019 Aug 12;36(2):168-178.e4. doi: 10.1016/j.ccell.2019.06.008.
344. Yang Y, Zhang X, Lin F, Xiong M, Fan D, Yuan X, Lu Y, Song Y, Zhang Y, Hao M, Ye Z, Zhang Y, Wang J, Xiong D. Bispecific CD3-HAC carried by E1A-engineered mesenchymal stromal cells against metastatic breast cancer by blocking PD-L1 and activating T cells. *J Hematol Oncol.* 2019 Apr 25;12(1):46. doi: 10.1186/s13045-019-0723-8.
345. Franzoi MA, Romano E, Piccart M. Immunotherapy for early breast cancer: too soon, too superficial, or just right? *Ann Oncol.* 2021 Mar;32(3):323-336. doi: 10.1016/j.annonc.2020.11.022.
346. Noguchi E, Shien T, Iwata H. Current status of PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2021 Mar 3;51(3):321-332. doi: 10.1093/jjco/hyaa230.
347. Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, Pusztai L, Pathiraja K, Aktan G, Cheng JD, Karantza V, Buisseret L. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol.* 2016 Jul 20;34(21):2460-7. doi: 10.1200/JCO.2015.64.8931.
348. Rugo HS, Delord JP, Im SA, Ott PA, Piha-Paul SA, Bedard PL, Sachdev J, Le Tourneau C, van Brummelen EMJ, Varga A, Salgado R, Loi S, Saraf S, Pietrangelo D, Karantza V, Tan AR. Safety and Antitumor Activity of Pembrolizumab in Patients with Estrogen Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2018 Jun 15;24(12):2804-2811. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3452.
349. Adams S, Schmid P, Rugo HS, Winer EP, Loirat D, Awada A, Cescon DW, Iwata H, Campone M, Nanda R, Hui R, Curigliano G, Toppmeyer D, O'Shaughnessy J, Loi S, Paluch-Shimon S, Tan AR, Card D, Zhao J, Karantza V, Cortés J. Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol.* 2019 Mar 1;30(3):397-404. doi: 10.1093/annonc/mdy517.
350. Emens LA, Cruz C, Eder JP, Braiteh F, Chung C, Tolaney SM, Kuter I, Nanda R, Cassier PA, Delord JP, Gordon MS, ElGabry E, Chang CW, Sarkar I, Grossman W, O'Hear C, Fassò M, Molinero L, Schmid P. Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. *JAMA Oncol.* 2019 Jan 1;5(1):74-82. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4224.

351. Dirix LY, Takacs I, Jerusalem G, Nikolinakos P, Arkenau HT, Forero-Torres A, Boccia R, Lippman ME, Somer R, Smakal M, Emens LA, Hrinchenko B, Edenfield W, Gurtler J, von Heydebreck A, Grote HJ, Chin K, Hamilton EP. Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Feb;167(3):671-686. doi: 10.1007/s10549-017-4537-5.
352. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013 Jul 25;39(1):1-10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
353. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity.* 2013 Jul 25;39(1):74-88. doi: 10.1016/j.immuni.2013.06.014.
354. Schmid P, Rugo HS, Adams S, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Henschel V, Molinero L, Chui SY, Maiya V, Husain A, Winer EP, Loi S, Emens LA; IMpassion130 Investigators. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020 Jan;21(1):44-59. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30689-8.
355. Abstract P5-15-02: Phase 1b/2 study to evaluate eribulin mesylate in combination with pembrolizumab in patients with metastatic triple-negative breast cancer, S Tolaney, C Savulsky, G Aktan, D Xing, A Almonte, V Karantza and S Diab, *Cancer Res February 15 2017 (77) (4 Supplement) P5-15-02*; DOI: 10.1158/1538-7445.SABCS16-P5-15-02
356. *Annals of Oncology (2021) 32 (suppl_5): S1283-S1346.* 10.1016/annonc/annonc741
357. Nanda R, Liu MC, Yau C, Shatsky R, Pusztai L, Wallace A, Chien AJ, Forero-Torres A, Ellis E, Han H, Clark A, Albain K, Boughey JC, Jaskowiak NT, Elias A, Isaacs C, Kemmer K, Helsten T, Majure M, Stringer-Reasor E, Parker C, Lee MC, Haddad T, Cohen RN, Asare S, Wilson A, Hirst GL, Singhrao R, Steeg K, Asare A, Matthews JB, Berry S, Sanil A, Schwab R, Symmans WF, van 't Veer L, Yee D, DeMichele A, Hylton NM, Melisko M, Perlmutter J, Rugo HS, Berry DA, Esserman LJ. Effect of Pembrolizumab Plus Neoadjuvant Chemotherapy on Pathologic Complete Response in Women With Early-Stage Breast Cancer: An Analysis of the Ongoing Phase 2 Adaptively Randomized I-SPY2 Trial. *JAMA Oncol.* 2020 May 1;6(5):676-684. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.6650.
358. *Annals of Oncology (2020) 31 (suppl_4): S1142-S1215.* 10.1016/annonc/annonc325

359. Loibl S, Untch M, Burchardi N, Huober J, Sinn BV, Blohmer JU, Grischke EM, Furlanetto J, Tesch H, Hanusch C, Engels K, Rezai M, Jackisch C, Schmitt WD, von Minckwitz G, Thomalla J, Kümmel S, Rautenberg B, Fasching PA, Weber K, Rhiem K, Denkert C, Schneeweiss A. A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study. *Ann Oncol*. 2019 Aug 1;30(8):1279-1288. doi: 10.1093/annonc/mdz158.
360. GBG. (2019). GeparNuevo (GBG 89), [online] <https://www.gbg.de/en/trials/geparnuevo.php> [15.12.2021].
361. Hegde PS, Wallin JJ, Mancao C. Predictive markers of anti-VEGF and emerging role of angiogenesis inhibitors as immunotherapeutics. *Semin Cancer Biol*. 2018 Oct;52(Pt 2):117-124. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.12.002.
362. Roland CL, Dineen SP, Lynn KD, Sullivan LA, Dellinger MT, Sadegh L, Sullivan JP, Shames DS, Brekken RA. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces angiogenesis and modulates immune cell infiltration of orthotopic breast cancer xenografts. *Mol Cancer Ther*. 2009 Jul;8(7):1761-71. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0280.
363. Roland CL, Lynn KD, Toombs JE, Dineen SP, Udugamasooriya DG, Brekken RA. Cytokine levels correlate with immune cell infiltration after anti-VEGF therapy in preclinical mouse models of breast cancer. *PLoS One*. 2009 Nov 3;4(11):e7669. doi: 10.1371/journal.pone.0007669.
364. Ager A. High Endothelial Venules and Other Blood Vessels: Critical Regulators of Lymphoid Organ Development and Function. *Front Immunol*. 2017 Feb 3;8:45. doi: 10.3389/fimmu.2017.00045.
365. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, Rodríguez-Abreu D, Moro-Sibilot D, Thomas CA, Barlesi F, Finley G, Kelsch C, Lee A, Coleman S, Deng Y, Shen Y, Kowanetz M, Lopez-Chavez A, Sandler A, Reck M; IMpower150 Study Group. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med*. 2018 Jun 14;378(24):2288-2301. doi: 10.1056/NEJMoa1716948.
366. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, Pouliot F, Alekseev B, Soulières D, Melichar B, Vynnychenko I, Kryzhanivska A, Bondarenko I, Azevedo SJ, Borchiellini D, Szczylik C, Markus M, McDermott RS, Bedke J, Tartas S, Chang YH, Tamada S, Shou Q, Perini RF, Chen M, Atkins MB, Powles T; KEYNOTE-426 Investigators. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019 Mar 21;380(12):1116-1127. doi: 10.1056/NEJMoa1816714.
367. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim TY, Kudo M, Breder V, Merle P, Kaseb AO, Li D, Verret W, Xu DZ, Hernandez S, Liu J, Huang C, Mulla S, Wang Y, Lim HY, Zhu AX, Cheng AL; IMbrave150 Investigators. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2020 May 14;382(20):1894-1905. doi: 10.1056/NEJMoa1915745.

368. Abstract PD1-03: A multicenter phase II study evaluating the efficacy of nivolumab plus paclitaxel plus bevacizumab triple-combination therapy as a first-line treatment in patients with HER2-negative metastatic breast cancer: WJOG9917B NEWBEAT trial, Yukinori Ozaki, Toru Mukohara, Junji Tsurutani, Masato Takahashi, Koji Matsumoto, Manabu Futamura, Norikazu Masuda, Shigehisa Kitano, Kenichi Yoshimura, Hironobu Minami and Toshimi Takano, *Cancer Res* February 15 2020 (80) (4 Supplement) PD1-03; DOI: 10.1158/1538-7445.SABCS19-PD1-03
369. Vinayak S, Tolane SM, Schwartzberg L, Mita M, McCann G, Tan AR, Wahner-Hendrickson AE, Forero A, Anders C, Wulf GM, Dillon P, Lynce F, Zarwan C, Erban JK, Zhou Y, Buerstatte N, Graham JR, Arora S, Dezube BJ, Telli ML. Open-label Clinical Trial of Niraparib Combined With Pembrolizumab for Treatment of Advanced or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 2019 Aug 1;5(8):1132-1140. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.1029.
370. Abstract CT049: Phase Ib study evaluating a triplet combination of ipatasertib (IPAT), atezolizumab (atezo), and paclitaxel (PAC) or nab-PAC as first-line (1L) therapy for locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer (TNBC), Peter Schmid, Delphine Loirat, Peter Savas, Enrique Espinosa, Valentina Boni, Antoine Italiano, Shane White, Stina M. Singel, Nimali Withana, Aruna Mani, Suwen Li, Adam Harris, Matthew Wongchenko and Marie Sablin, *Cancer Res* July 1 2019 (79) (13 Supplement) CT049; DOI: 10.1158/1538-7445.AM2019-CT049
371. Loi S, Giobbie-Hurder A, Gombos A, Bachelot T, Hui R, Curigliano G, Campone M, Biganzoli L, Bonnefoi H, Jerusalem G, Bartsch R, Rabaglio-Poretti M, Kammler R, Maibach R, Smyth MJ, Di Leo A, Colleoni M, Viale G, Regan MM, André F; International Breast Cancer Study Group and the Breast International Group. Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b-2 trial. *Lancet Oncol.* 2019 Mar;20(3):371-382. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30812-X.
372. *Annals of Oncology* (2019) 30 (suppl_5): v104-v142. 10.1093/annonc/mdz242
373. A phase Ib study of abemaciclib in combination with pembrolizumab for patients with hormone receptor positive (HR+), human epidermal growth factor receptor 2 negative (HER2-) locally advanced or metastatic breast cancer (MBC) (NCT02779751): Interim results., Hope S. Rugo, Peter Kabos, Joseph Thaddeus Beck, Michael Jon Chisamore, Anwar Hossain, Yanyun Chen, and Sara M. Tolane, *Journal of Clinical Oncology* 2020 38:15_suppl, 1051–1051
374. Abstract PD1-02: Response and clinical benefit assessment of the combination of the dectin-1 agonist imprime PGG and anti-PD-1 pembrolizumab in chemotherapy-resistant metastatic triple negative breast cancer (TNBC), Mark T Uhlik, Nandita Bose, Joanna Cox, Paulette Mattson, Michele Gargano, Stephen O'Day, Virginia Borges, Bartosz Chmielowski, Ruta Rao, Maysa Abu-Khalaf, Alison Stopeck, Michael Chisamore, Bruno Osterwalder and Jeremy Graff, *Cancer Res* February 15 2020 (80) (4 Supplement) PD1-02; DOI: 10.1158/1538-7445.SABCS19-PD1-02

375. Abstract GS3-02: Durvalumab compared to maintenance chemotherapy in patients with metastatic breast cancer: Results from phase II randomized trial SAFIRO2-IMMUNO
Florence Dalenc, Ingrid Garberis, Thomas Filleron, Amélie Lusque, Thomas Bachelot, Monica Arnedos, Mario Campone, Marie-Paule Sablin, Hervé Bonnefoi, Marta Jimenez, Jacquet Alexandra and Fabrice Andre
Cancer Res February 15 2020 (80) (4 Supplement) GS3-02; DOI: 10.1158/1538-7445.SABCS19-GS3-02
376. Lakhani SR, Gusterson BA, Jacquemier J, Sloane JP, Anderson TJ, van de Vijver MJ, Venter D, Freeman A, Antoniou A, McGuffog L, Smyth E, Steel CM, Haites N, Scott RJ, Goldgar D, Neuhausen S, Daly PA, Ormiston W, McManus R, Scherneck S, Ponder BA, Futreal PA, Peto J, Stoppa-Lyonnet D, Bignon YJ, Stratton MR. The pathology of familial breast cancer: histological features of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2. Clin Cancer Res. 2000 Mar;6(3):782-9.

6 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. med. Doris Mayr für die Überlassung des Themas und für ihre fachlich kompetente und menschlich wunderbare und geduldige Unterstützung bei der Umsetzung dieser Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Harald Hessel für die Hilfe während der Anfangsphase und bei den beiden tollen Damen aus dem Labor Andrea Sendelhofert und Anja Heier für ihre Einweisung in die Immunhistochemie und ihre Mitwirkung am Erfolg der Versuchsreihen.

Ich bedanke mich vielmals bei Julia und Ole, die mir statistische Nachhilfe erteilt haben.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei:

Annette und Reiner, Petra, Hnans (†) und Nelly

Thorsten

Samuel, Christiane, Mikael und Katharina

Guilia

Betty und Horst (†)

Aaron und Johannes

Christina

bei allen meinen Freunden im In- und Ausland für die emotionale Unterstützung während der nicht immer einfachen Promotionsphase

und auch bei allen Frauen

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Svenja Elisabeth Fritsch, erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Experimentelle Etablierung einer Triplex-Färbung der Biomarker CD3, FoxP3 und PD-L1 zur Charakterisierung histologischer und molekularer Subtypen medullärer Mammakarzinome“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren

Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz

oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach

ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen

habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in

gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung

eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Svenja Elisabeth Fritsch

Bern, den 18.04.2023

Fritsch

Name Doktorandin

Ort, Datum

Unterschrift

