

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neoadjuvante Chemotherapie beim Mammakarzinom
-
**Bestimmung von Ki-67 und tumorinfiltrierenden
Lymphozyten in intermediären Biopsien**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Sychra

aus Krems an der Donau

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung.....	8
Abstract	9
1. Einleitung	10
1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms	10
1.2. Risikofaktoren des Mammakarzinoms.....	10
1.3. Pathologie des Mammakarzinoms	11
1.4. Diagnostik und Staging des Mammakarzinoms	12
1.5. Therapie des Mammakarzinoms	13
1.6. Prognostische und prädiktive Faktoren des Mammakarzinoms	15
1.7. Tumorinfiltrierende Lymphozyten als neuer histopathologischer Prognosefaktor.....	16
1.7.1. Strategien zur Verbesserung der Auswertung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten	18
1.8. Ki-67 als wichtiger Biomarker für Therapieentscheidungen	22
1.8.1. Vereinfachung und Standardisierung der Ki-67-Auswertung durch eine Software zur Bildanalyse	26
1.9. Prognostische Faktoren des Therapieansprechens nach neoadjuvanter Chemotherapie...29	
1.9.1. Die pathologische Komplettremission als Marker für ein sehr gutes Therapieansprechen.....	29
1.10. Durch den Residual Cancer Burden gelingt eine weitere Stratifizierung der Resterkrankung	29
2. Zielstellung	30
3. Material und Methoden.....	31
3.1. Material	31
3.1.1. Patienten	31
3.1.2. Prätherapeutische und intermediäre Biopsien.....	33
3.1.3. Verwendete Materialien.....	33
3.1.4. Verwendete Geräte	34
3.2. Methoden.....	34
3.2.1. Histopathologische Untersuchung	34
3.2.2. Immunhistologie und Auswertung von Ki-67	35
3.2.3. Auswertung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten	36
3.2.4. Auswertung des Tumorgehalts.....	36
3.3. Statistische Analyse.....	36

4.	Ergebnisse	37
4.1.	Patientencharakteristika	37
4.2.	Tumorzellgehalt in intermediären Biopsien: Therapieansprechen und Überleben	39
4.2.1.	Intermediärer Tumorzellgehalt: Korrelation mit histopathologischen Merkmalen	39
4.2.2.	Intermediärer Tumorzellgehalt: Untersuchung in den Tumorsubgruppen.....	41
4.2.3.	Intermediärer Tumorzellgehalt: Vorhersagekraft für das Therapieansprechen.....	42
4.2.4.	Intermediärer Tumorzellgehalt: Einfluss auf das Überleben	43
4.3.	Pathologische Komplettremission: Einfluss auf das Überleben.....	45
4.4.	Tumorinfiltrierende Lymphozyten: Therapieansprechen und Überleben.....	47
4.4.1.	Tumorinfiltrierende Lymphozyten: deskriptive Statistik in der prätherapeutischen und intermediären Biopsie	47
4.4.2.	Tumorinfiltrierende Lymphozyten: Vorhersagekraft für die pCR	49
4.4.3.	Tumorinfiltrierende Lymphozyten: Veränderung während neoadjuvanter Chemotherapie	50
4.4.4.	TIL-Veränderung: Vorhersagekraft für die pCR	53
4.4.5.	TIL-Veränderung: Einfluss auf das Überleben.....	54
4.5.	Ki-67: Therapieansprechen und Überleben.....	55
4.5.1.	Ki-67: deskriptive Statistik in der prätherapeutischen und intermediären Biopsie	55
4.5.2.	Ki-67: Vorhersagekraft für die pCR.....	58
4.5.3.	Ki-67: Veränderung während neoadjuvanter Chemotherapie.....	59
4.5.4.	Ki-67-Veränderung: Vorhersagekraft für die pCR.....	62
4.5.5.	Ki-67-Veränderung: Einfluss auf das Überleben	63
4.6.	Zusammenhang der Veränderungen des TIL-Wertes und des Ki-67-Index während neoadjuvanter Chemotherapie	64
5.	Diskussion	65
5.1.	Der Nachweis von Tumorzellen in der intermediären Biopsie als negativer Responsemarker	65
5.2.	Tumorinfiltrierende Lymphozyten als prognostischer und prädiktiver Faktor	66
5.3.	Immunstimulation durch Chemotherapie	67
5.4.	Immunotherapie als neue Therapieoption.....	68
5.5.	Ki-67 als positiver Responsemarker und negativer Prognosefaktor	69
5.5.1.	Frühe Veränderungen des Ki-67-Index während Chemotherapie	70
5.5.2.	Veränderungen des Ki-67-Index nach Chemotherapieende.....	72
5.6.	Limitierungen der Arbeit	73
5.7.	Postneoadjuvante Chemotherapie bei Patienten mit einer schlechten Prognose.....	73
5.8.	Translationale Forschungsmöglichkeiten in neoadjuvanen Studien	74
5.8.1.	Intermediäre Biopsien zu Forschungszwecken	75
5.9.	Evaluation des frühen Ansprechens während neoadjuvanter Chemotherapie	76
5.10.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	77
	Literaturverzeichnis	77

Eidesstattliche Versicherung	90
Lebenslauf	91
Publikationsliste.....	93
Danksagung.....	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien	33
Tabelle 2: Verwendete Geräte.....	34
Tabelle 3: Charakteristik des Patientenkollektivs	38
Tabelle 4: Verteilung der immunhistologischen Tumorsubgruppen in den Studien ..	39
Tabelle 5: Verteilung der TIL-Veränderung in den Tumorsubgruppen	50
Tabelle 6: Verteilung der Ki-67-Veränderung in den Tumorsubgruppen	59
Tabelle 7: Das Δ TILs(TB-TA) und Δ Ki-67(TB-TA) im Vergleich.	64
Tabelle 8: Korrelation der Veränderung der Ki-67-Expression mit klinischem oder pathologischem Ansprechen, evaluiert in intermediären Biopsien während neoadjuvanter Chemotherapie.	71

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Empfehlungen zur Auswertung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Mammakarzinom.....	20
Abb. 2: Beispielbilder der ausgewerteten Bereiche für TILs, der im Rahmen dieses Projektes erfolgten Evaluation.....	21
Abb. 3: Empfehlungen zur Ki-67-Auswertung im Mammakarzinom	25
Abb. 4: Beispielbilder der Ki-67-Färbung und die entsprechende Auswertung des KI67 Quantifiers, der im Rahmen dieses Projektes erfolgten Evaluation.	28
Abb. 5: Consortdiagramm der Zusammenstellung des Patientenkollektivs	31
Abb. 6: Prozent und Anzahl von intermediären Biopsien, in denen Tumorzellen nachgewiesen werden konnten je histopathologisches Merkmal.....	40
Abb. 7: Prozent und Anzahl von intermediären Biopsien, in denen Tumorzellen nachgewiesen werden konnten je Tumorsubgruppe	41
Abb. 8: Assoziation von einer Resterkrankung nach neoadjuvanter Chemotherapie mit dem Nachweis von Tumorzellen in der intermediären Biopsie, dargestellt in den Tumorsubgruppen.....	42
Abb. 9: Einfluss der Abwesenheit und des Nachweises von Tumorzellen in der intermediären Biopsien auf das krankheitsfreie Überleben, dargestellt als Kaplan-Meier-Analyse.	44

Abb. 10: Einfluss der pathologischen Komplettremission auf das krankheitsfreie Überleben, dargestellt als Kaplan-Meier-Analyse	46
Abb. 11: Verteilung der Häufigkeit eines TIL-Wertes in der prätherapeutischen Biopsie	48
Abb. 12: Verteilung der Häufigkeit eines TIL-Wertes in der intermediären Biopsie ..	48
Abb. 13: Odds Ratio für die Vorhersagekraft des TIL-Wertes in der prätherapeutischen und in der intermediären Biopsie für pCR in der gesamten Kohorte und aufgeteilt nach Tumorsubgruppen.....	49
Abb. 14: Darstellung der Veränderung des TIL-Wertes für jede Patientin als Wasserfalldiagramm.....	51
Abb. 15: Veränderung des TIL-Wertes jeder Patientin als Streudiagramm	52
Abb. 16: Odds Ratio für die Vorhersagekraft des Δ TILs(TB-TA) für pCR in der gesamten Kohorte und aufgeteilt in Tumorsubgruppen.	53
Abb. 17: Hazard Ratio für Tod oder Rezidiv des Δ TILs(TB-TA) in der gesamten Kohorte und aufgeteilt in Tumorsubgruppen.....	54
Abb. 18: Verteilung der Patientinnen der gesamten Kohorte in den Gruppen des Ki-67-Index in der prätherapeutischen Biopsie	56
Abb. 19: Verteilung der Patientinnen der gesamten Kohorte in Gruppen des Ki-67-Index in der intermediären Biopsie	56
Abb. 20: Gegenüberstellung der Verteilung der Patientinnen in Gruppen des Ki-67-Index in der prätherapeutischen und intermediären Biopsie, aufgeteilt nach Tumorsubgruppen.....	57
Abb. 21: Odds Ratio für die Vorhersagekraft des Ki-67-Index in der prätherapeutischen und in der intermediären Biopsie für pCR in der gesamten Kohorte und aufgeteilt in Tumorsubgruppen.....	58
Abb. 22: Darstellung der Veränderung des Ki-67-Index für jede Patientin als Wasserfalldiagramm.....	60
Abb. 23: Veränderung des Ki-67-Index jeder Patientin als Streudiagramm.....	61
Abb. 24: Odds Ratio für die Vorhersagekraft des Δ Ki-67(TB-TA) für pCR in der gesamten Kohorte und aufgeteilt in den Tumorsubgruppen.	62
Abb. 25: Hazard Ratio für Tod oder Rezidiv des Δ Ki-67(TB-TA) in der gesamten Kohorte und aufgeteilt in Tumorsubgruppen.....	63
Abb. 26: Gegenüberstellung des Δ TILs(TB-TA) und des Δ Ki-67(TB-TA) jeder Patientin.	64

Abkürzungsverzeichnis

DCIS	duktales carcinoma-in-situ
DFS	disease-free survival, krankheitsfreies Überleben
G4	GeparQuattro-Studie
G5	GeparQuinto-Studie
G6	GeparSixto-Studie
GBG	German Breast Group
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Human-epidermal-growth receptor 2
HER2+	HER2-positiver Subtyp
HR	Hazard Ratio
HR+/HER2-	Hormonrezeptor-positiver, HER2-negativer Subtyp
HR-/HER2-	triple-negativer Subtyp
ICC	Intraklassenkorrelationskoeffizient
ILC	invasiv lobuläres Karzinom
iTu-	Abwesenheit von Tumorzellen in der intermediären Biopsie
iTu+	Nachweis von Tumorzellen in der intermediären Biopsie
KI	Konfidenzintervall
NACT	neoadjuvante Chemotherapie
NST	invasives Karzinom vom nicht speziellen Typ
N0	nodal-negativ
N+	nodal-positiv
OR	Odds Ratio
pCR	pathologische Komplettremission
RCB	Residual Cancer Burden
RD	Resterkrankung
TA	prätherapeutische Biopsie
TB	intermediäre Biopsie
TILs	tumorinfiltrierende Lymphozyten, tumor-infiltrating lymphocytes
WHO	World Health Organization

Zusammenfassung:

Einleitung: Tumordinfiltrierende Lymphozyten (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) und Ki-67 fungieren als prognostische Faktoren und besitzen die Fähigkeit ein Ansprechen auf neoadjuvante Chemotherapie (NACT) vorherzusagen. Wir untersuchten in dieser Arbeit die Veränderung in TILs und Ki-67 während NACT in gepaarten seriellen Biopsien (prätherapeutisch und intermediär). Dabei analysierten wir den Einfluss dieser Veränderungen und den Einfluss des Tumorgehalts in intermediären Biopsien auf die pathologische Komplettremission (pCR) und das krankheitsfreie Überleben (DFS).

Material und Methoden: Das Patientenkollektiv (n= 297) wurde retrospektiv aus Patientinnen der Studien GeparQuattro, GeparQuinto und GeparSixto, für die sowohl prätherapeutische (TA) als auch intermediäre Biopsien (TB) verfügbar waren, zusammengestellt. Die Ki-67-Expression wurde immunhistologisch bestimmt. TILs und der Tumorgehalt wurden auf HE-Schnitten ausgewertet.

Ergebnisse: In 71% der Fälle (n=207) waren in der intermediären Biopsie Tumorzellen nachweisbar (iT_u+). iT_u+ korrelierte mit einer Resterkrankung (RD) nach abgeschlossener NACT (Chi-Quadrat-Test: p<0,001). In 29% der Fälle (n=90) waren in der intermediären Biopsie keine Tumorzellen nachweisbar (iT_u-). 50% der Fälle (n=45) aus der iT_u- Gruppe zeigten eine pathologische Komplettremission (pCR). Ein Anstieg in TILs war mit einer erhöhten pCR-Rate assoziiert (Odds Ratio [OR]= 1.035; 95%-Konfidenzintervall [KI]: 1.014 - 1.057; p=0,001). Ein Anstieg in Ki-67 sagte eine verminderte pCR-Rate vorher (OR= 0.957; 95%-KI: 0.928 - 0.986; p=0,004). In der triple-negativen Subgruppe war iT_u- (log-rank-Test: p=0,04) und ein Anstieg in TILs (OR= 0.98; 95%-KI: 0.963 - 0.997; p=0,024) mit einem verbesserten krankheitsfreien Überleben assoziiert. Ein Anstieg in Ki-67 korrelierte in dieser Subgruppe mit einem schlechteren krankheitsfreien Überleben (Hazard Ratio= 1.024; 95%-KI: 1.001 - 1.047; p=0,040).

Schlussfolgerung: Die Auswertung von Tumorgehalt, TILs und Ki-67 in intermediären Biopsien lieferte prognostische und prädiktive Informationen. Ob intermediäre Biopsien zur verbesserten Prognoseeinschätzung oder Evaluation des Therapieansprechens eingesetzt werden sollten, werden weitere Studien zeigen.

Mammakarzinom, Ki-67, TILs, Tumorgehalt, Prognosefaktoren, pCR

Abstract:

Introduction: Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and Ki-67 have a prognostic function and predict response in neoadjuvant chemotherapy (NACT). We examined in this study the changes in TILs and Ki-67 during NACT in paired serial biopsies (pretherapeutical and intermediate). Further we analysed the influence of those changes and the influence of the tumor area in intermediate biopsies on the pathological complete response (pCR) and the disease-free survival (DFS).

Methods: Patients (n= 297) taking part in the GeparQuattro, GeparQuinto and GeparSixto study, for which the pretherapeutical (TA) and intermediate biopsies (TB) were available, were chosen retrospectively. The Ki-67 expression was evaluated by immunohistochemistry. TILs and the tumor area were measured on HE-slides.

Results: In 71% (n=207) of the cohort there were tumorcells detected in the intermediate biopsy (iT_u⁺). iT_u⁺ predicted a residual disease (RD) after NACT (chi-squared test: p<0,001). In 29% (n=90) of the cohort there were no tumor cells detected in the intermediate biopsy (iT_u⁻). 50% (n=45) of iT_u⁻ cases reached pathological complete response (pCR). An increase in TILs was associated with a higher probability of pCR (odds ratio [OR]=1.035; 95% confidence interval [CI]: 1.014 - 1.057; p=0,001). An increase in Ki-67 predicted a reduced pCR rate (OR=0.957; 95%CI: 0.928 - 0.986; p=0,004). In the triple-negative subgroup iT_u⁻ (log-rank-test: p=0,04) and an increase in TILs (OR=0.98; 95%CI: 0.963 - 0.997; p=0,024) correlated with an improved disease-free survival (DFS). An increase in Ki-67 proved to be a prognostic factor for reduced DFS (hazard ratio=1.024; 95%CI: 1.001 - 1.047; p=0,040).

Conclusion: The evaluation of the tumor area, TILs and Ki-67 in intermediate Biopsies is of prognostic and predictive value. Further studies will investigate, whether intermediate biopsies can be used to improve prognostic assessment or evaluate response to NACT.

Breast cancer, Ki-67, TILs, tumor area, prognostic factors, pCR

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste maligne Erkrankung der Frau, gefolgt von dem Bronchial- und Kolorektalkarzinom [1]. Jährlich sind 2,1 Millionen Frauen weltweit von der Erkrankung betroffen [2]. In Deutschland erkranken jährlich 71 640 Frauen an Brustkrebs [3]. Im Schnitt erkrankt jede achte bis zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Laut Schätzungen starben 627 000 Frauen weltweit im Jahre 2018 an Brustkrebs [2]. Bei Frauen im Alter von 20 bis 59 Jahren ist das Mammakarzinom die häufigste Krebstodesursache, insgesamt ist es die zweithäufigste maligne Erkrankung, die bei Frauen zum Versterben führt, nach dem Bronchialkarzinom. Die Stadien-übergreifende 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 90%, auch bei axillärer Lymphknotenmetastasierung beträgt die 5-JÜR noch 85%, erst bei Fernmetastasierung sinkt die 5-JÜR stark ab, auf 27% [1]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei 64 Jahren [4]. Es kann eine große Varianz bezüglich der unterschiedlichen Ethnizitäten der Frauen beobachtet werden, im Allgemeinen sind kaukasische Frauen häufiger betroffen als solche aus Afrika, Asien oder dem lateinamerikanischen Raum [5].

1.2. Risikofaktoren des Mammakarzinoms

Ungefähr zwei Drittel der Mammakarzinome weisen eine verstärkte Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren auf [6]. Viele Risikofaktoren basieren auf der Wirkung des Östrogens. So begünstigt eine frühe Menarche, späte Menopause, wenige Schwangerschaften, späte erste Schwangerschaft und die Einnahme einer Hormonersatztherapie in der Postmenopause die Entstehung des Mammakarzinoms. Der Effekt des Östrogens basiert vor allem auf zwei Wirkungsweisen. Einerseits direkt durch die Bindung an den Östrogen-Rezeptor, wodurch es zur gesteigerten Proliferation kommt und so die Wahrscheinlichkeit für Mutationen steigt. Die zweite Wirkungsweise beruht auf der Verstoffwechslung von Östrogen zu Chinon-Metaboliten, welche einen oxidativen Effekt haben [6]. Eine weitere ätiologische Komponente des Mammakarzinoms ist genetisch bedingt. Eine positive Familienanamnese geht mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einher. Ungefähr 5-10% der Mammakarzinome sind hereditär bedingt und beruhen auf einer Mutation

des BRCA1- oder BRCA2-Gens. Beide diese Gene sind Tumorsuppressorgene, welche unter anderem an der Zellzyklus-Kontrolle und an DNA-Reparatur-Vorgängen beteiligt sind [7]. Das lebenslange Risiko von Mutationsträgerinnen an Brustkrebs zu erkranken, beträgt zwischen 60-85% [8]. Auch der Lebensstil kann Einfluss auf die Tumorentstehung nehmen. So sind Adipositas, Alkohol und Rauchen ebenfalls mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko verbunden [6].

1.3. Pathologie des Mammakarzinoms

Es werden verschiedene Vorstufen des Mammakarzinoms unterschieden, welche ein unterschiedliches Risiko bergen, in ein invasives Karzinom überzugehen. Die atypische duktale Hyperplasie, die atypische lobuläre Hyperplasie und das lobuläre carcinoma-in-situ (LCIS) zählen zu den prämaligen Mammaläsionen. Das duktale carcinoma-in-situ (DCIS) gilt als präinvasive Läsion [9].

Das invasive Mammakarzinom kann in unterschiedliche histologische Typen gemäß WHO-Klassifikation eingeteilt werden. Am häufigsten ist das invasive Karzinom vom nicht speziellen Typ (NST; früher: invasiv duktales Karzinom), welches in 40-75% der Fälle vorkommt. Am zweithäufigsten ist das invasiv lobuläre Mammakarzinom mit 5-15% [10].

Zudem wird das Mammakarzinom in verschiedene intrinsische Subtypen eingeteilt, welche durch RNA-Expressionsprofile definiert sind [11]. Unterschieden werden die Gruppen Luminal, HER2-enriched, basal-like und normal-like [12]. Wichtige Therapieentscheidungen werden anhand dieser Subgruppen getroffen. Da es aus praktischen Gründen jedoch nicht möglich ist, bei jedem Patienten eine RNA-Expressionsanalyse zu machen, werden den intrinsischen molekularen Subgruppen bestimmte immunhistologische Phänotypen des Mammakarzinoms zugewiesen. Auch wenn diese nicht vollkommen miteinander übereinstimmen, ist die immunhistologische Charakterisierung dennoch in Therapiefragen entscheidend [13, 14]. Die wichtigsten, klinisch-relevanten Subgruppen sind:

- **Luminale Subgruppe**

Ungefähr zwei Drittel aller Mammakarzinome lassen sich in die beiden luminalen Subgruppen A und B einteilen. Beide Gruppen zeichnen sich in der Immunhistologie durch eine Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren aus. Jedoch weisen Luminal B-Tumoren eine geringere Hormonrezeptor-Expression auf als

Luminal A-Tumoren und sind von einer höheren proliferativen Aktivität, höherem histologischen Grading und schlechterer Prognose geprägt [15]. In der S3-Leitlinie Mammakarzinom wird die Differenzierung zwischen Luminal A und B anhand des Ki-67-Index empfohlen [14]. Die Gruppe der Luminal B-Tumoren kann weiter eingeteilt werden in HER2-positiv und -negativ [13, 15].

- **HER2-enriched**

HER2/neu gehört zu den transmembranären Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche Zellwachstum stimulieren und Apoptose hemmen können [16]. Ungefähr 18-20% der Mammakarzinome weisen eine erhöhte Expression von HER2 auf [17]. Karzinome dieser Gruppe weisen ein aggressives Wachstum auf und haben nach dem triple-negativen Karzinom die schlechteste Prognose [15].

- **Basal-like**

Ungefähr 15-20% der Patienten erkranken an einem Tumor dieser Gruppe. Patientinnen mit einer Mutation des BRCA1-Gens entwickeln häufiger basal-like Karzinome [18]. Die Hauptmerkmale dieser Gruppe sind ein negativer Hormonrezeptorstatus, keine Überexpression von HER2 und die Expression von basalen Zytokeratinen. Zum Großteil gleicht diese Gruppe dem Immunphänotyp des triple-negativen Mammakarzinoms [19]. Oft sind jüngere Patientinnen von einem triple-negativen Tumor betroffen. Tumoren dieser Art sind meist größer und bereits lymphatisch metastasiert bei Diagnosestellung. Karzinome, die in diese Gruppe fallen, weisen das aggressivste Wachstum auf und haben, trotz oft gutem Ansprechen auf neoadjuvante Chemotherapie, die schlechteste Prognose [20]. Eine weitere Untergruppe der basal-like Tumoren ist der Claudin-low-Typ [21].

1.4. Diagnostik und Staging des Mammakarzinoms

Frauen sollte ab dem 30. Lebensjahr jährlich im Rahmen der Krebsfrüherkennung eine klinische Untersuchung der Brust (Inspektion, Palpation der Brust und der Lymphabflusswege) angeboten werden [14]. Zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr wird jede Frau in Deutschland alle zwei Jahre zum Brustkrebs-Früherkennungsprogramm mittels Mammographie eingeladen [22]. Die Befunde der Mammographie werden nach der standardisierten BI-RADS-Klassifikation (Breast Imaging Reporting and Data System) eingeteilt. Bei unklaren

Mammographiebefunden oder sehr dichtem Brustdrüsengewebe kann zusätzlich die Mammasonographie zur weiteren Abklärung erfolgen [23]. Bei einer Einstufung des Mammographiebefunds in BI-RADS 4 (verdächtig, 23% bis 34% Malignomwahrscheinlichkeit) oder BI-RADS 5 (hochverdächtig, 95% Malignomwahrscheinlichkeit) ist eine histologische Abklärung angeraten [24], welche in Form einer sonographisch-gesteuerten Stanzbiopsie oder stereotaktisch-gestützten Vakuumbiopsie erfolgt [14]. An dem bioptisch gewonnenen Material werden unter anderem der histologische Tumortyp, der Differenzierungsgrad, die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, Ki-67 und HER2 ermittelt [13]. Bei klinischem Verdacht auf eine Metastasierung, aggressiver Tumorbilogie (HER2-positiv, triple-negativ), ab einem Tumorstadium von N+ oder >T2 oder vor geplanter systemischer Chemo- oder Antikörpertherapie wird die Durchführung eines Ganzkörperstaging mittels Skelettszintigraphie und CT-Thorax/Abdomen empfohlen [14]. Die Einteilung des Mammakarzinoms erfolgt anhand der TNM-Klassifikation der UICC, welche sich nach Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Metastasierung richtet. Zusammengefasst werden diese Kriterien in die UICC-Stadien, welche von prognostischem Wert sind und nach welchen sich die Therapie richtet [25].

1.5. Therapie des Mammakarzinoms

- **Operative Therapie**

Ein integraler Bestandteil der Therapie des primären Mammakarzinoms ist die Tumorresektion mit tumorfreien Resektionsrändern (R0-Status), wodurch die Rate der Lokalrezidive stark gesenkt werden kann [13, 26]. Diese operative Therapie kann in den meisten Fällen in Form einer brusterhaltenden Therapie durchgeführt werden und ist, bei anschließender Strahlentherapie, der Mastektomie bezüglich des Überlebens gleichwertig [27]. Bei ungünstigem Tumor-Brust-Verhältnis, positiven Schnitträndern auch nach Nachresektion, dem inflammatorischem Mammakarzinom oder Kontraindikationen zur postoperativen Strahlentherapie erfolgt eine Mastektomie [28, 29]. Simultan erfolgt bei sonographisch und klinisch unauffälliger Axilla ein axilläres Staging mit Hilfe der Resektion des Sentinellymphknotens, meist nach Radionuklid-Markierung. Bei Lymphknotenbefall muss je nach T- und N-Stadium eine Axilladisektion oder eine axilläre Bestrahlung erwogen werden [30].

- **Strahlentherapie**

Nach brusterhaltender Therapie erfolgt eine perkutane Radiotherapie, um ein gleichwertiges Ergebnis wie bei Mastektomie bezüglich Lokalrezidiven sicherzustellen [31]. Eine lokale Dosisaufsättigung (Boost-Bestrahlung) senkt das Risiko für Lokalrezidive, hat jedoch kein Effekt auf das Gesamtüberleben, sodass dies laut der aktuellen S3-Leitlinie von 2019 nur bei jungen Frauen (≤ 50 Jahre) oder bei Frauen älter als 51 Jahre bei erhöhtem Rezidivrisiko ($>T1$, G3, HER2-positiv, triple-negativ) empfohlen wird [14, 32]. Je nach Tumorstadium oder Tumorbilogie wird die Bestrahlung der regionalen oder axillären Lymphknoten, der Lymphabflusswege oder die Bestrahlung nach Mastektomie empfohlen [14].

- **Endokrine Therapie**

Eine endokrine Therapie sollten alle Patienten mit einem Östrogenrezeptor- und/oder Progesteronrezeptor-positiven Mammakarzinom erhalten [33]. Bei den meisten prämenopausalen Frauen wird Tamoxifen eingesetzt [14]. Bei postmenopausalen Frauen werden Aromatasehemmer angeraten [34].

- **Chemotherapie**

Patienten mit einem triple-negativen Tumor, HER2-positiven Tumor (ab pT1b oder bei G3 oder ER/PR-negativ oder Ki-67 hoch) oder Luminal B-Tumor mit hohem Rückfallrisiko (G3 oder Ki-67 hoch oder pN+ oder junges Erkrankungsalter) wird eine Chemotherapie empfohlen. Die Verabreichung der Chemotherapie kann sowohl präoperativ (neoadjuvant) als auch postoperativ (adjuvant) erfolgen [14]. Bei lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen Tumoren oder dem inflammatorischen Mammakarzinom ist die neoadjuvante systemische Chemotherapie der Standard. Von Vorteil ist eine Chemotherapie, welche ein Anthrazyklin (z.B. Epirubicin) und ein Taxan (z.B. Paclitaxel oder Docetaxel) enthält [35-38]. Bei triple-negativen Mammakarzinomen kommen zusätzlich Platinsalze (z.B. Carboplatin) zum Einsatz [14].

- **Antikörpertherapien und neue zielgerichtete Therapien**

Bei Mammakarzinomen mit einer Überexpression von HER2 und einer Tumorgroße von über 1 cm wird die Gabe von Trastuzumab (monoklonaler Antikörper gegen HER2), beginnend simultan zur Chemotherapie für ein Jahr, empfohlen [39]. Ab einer

Tumorgröße von über 2 cm oder einem N+-Stadium wird die zusätzliche Gabe von Pertuzumab (monoklonaler Antikörper gegen HER2) als vorteilhaft betrachtet [14]. Bei Fernmetastasen, Rezidiven, Progress oder dem Nichtansprechen unter endokriner oder zytostatischer Therapie stehen weitere Antikörpertherapien und zielgerichtete Therapien zur Verfügung, unter anderem CDK4/6-Inhibitoren, mTor-Inhibitoren, VEGF-Antikörper [14].

1.6. Prognostische und prädiktive Faktoren des Mammakarzinoms

Wichtige und lang etablierte Prognosefaktoren des Mammakarzinoms sind histopathologische Merkmale wie die Tumorgröße, der Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung, der Resektionsrandstatus, die peritumorale Lymphgefäßinvasion gemäß der aktuellen TNM-Klassifikation der UICC, der histologische Typ gemäß der WHO-Klassifikation und das histologische Grading gemäß Elston und Ellis [40]. Das Alter spielt ebenfalls eine wichtige prognostische Rolle, ein Alter unter 50 Jahren ist mit einem besseren Ansprechen auf Chemotherapie assoziiert, ein Alter unter 35 ist jedoch mit einem höheren histologischen Grading und einem schlechteren Gesamtüberleben verbunden [40, 41]. Die verschiedenen intrinsischen Subtypen weisen ebenfalls eine sehr unterschiedliche Prognose auf, die beste Prognose haben Luminal A-Tumoren, gefolgt von Luminal B- und HER2-positiven Tumoren, die schlechteste Prognose zeigt die Gruppe der basal-like Tumoren [42]. Es existieren verschiedene prognostische Multigentests, welche vor allem beim Hormonrezeptor-positiven, HER2-negativen und nodal-negativen Mammakarzinom zum Einsatz kommen, wenn unter Rücksichtnahme der histopathologischen Prognosefaktoren keine eindeutige Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie getroffen werden kann [13, 43-45]. Die am häufigsten in Deutschland eingesetzten Multigentests sind Oncotype DX® (Genomic Health; Redwood City, California, United States of America), EndoPredict® (Myriad Genetics, Inc; Salt Lake City, Utah, United States of America), Prosigna® (Nanostrings technologies; Seattle, Washington, United States of America) und MammaPrint® (Agendia Laboratories, Amsterdam, Niederlande) [14]. Die American Society of Clinical Oncology (ASCO) hat eine Biomarker-Leitlinie zur Entscheidungshilfe für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie publiziert, welche ebenfalls diese vier zuletzt genannten Tests zur Entscheidungsfindung empfiehlt [46]. In Deutschland wurde der Oncotype DX® kürzlich auch in den

Leistungskatalog der gesetzlichen Krankenkassen aufgenommen [47]. Die Multigentests identifizieren Niedrigrisikopatienten, welche von einer adjuvanten Chemotherapie sehr wahrscheinlich nicht profitieren würden. In prospektiv-retrospektiven Studien konnte für EndoPredict®, Oncotype DX® und Prosigna® gezeigt werden, dass diese drei Tests Patientinnen, unabhängig von klinisch-pathologischen Faktoren wie Tumorgröße, Alter, Nodalstatus, erkennen, welche ein Fernmetastasen-Risiko bei rein endokriner Therapie von kleiner als 10% in den nächsten zehn Jahren haben [48-56].

1.7. Tumorinfiltrierende Lymphozyten als neuer histopathologischer Prognosefaktor

Zwischen Wirtsimmunzellen und der malignen Entartung von Zellen bestehen vielfältige Interaktionen, welche die Tumorentstehung unterstützen, Tumorzellen eliminieren oder hemmen können. Diese sehr konträren Funktionen des Immunsystems entstehen, da verschiedene immunologische Zelltypen mit den Tumorzellen interagieren. Verschiedene Arbeitsgruppen haben diesen Prozess des „Immunoediting“ beschrieben. Während dieses Prozesses durchläuft die Tumorzelle verschiedene Stadien: Eliminierung (elimination) – Gleichgewicht (equilibrium) – Entkommen (escape). Das Entkommen der Tumorzelle vor dem Immunsystem ist das Stadium, in dem der Tumor progressiv wachsen und so klinisch erkennbar werden kann [57].

Verschiedenste Marker für das Immunsystem in unterschiedlichen malignen Erkrankungen konnten bereits identifiziert werden. Eine Weise, das Immuninfiltrat in Tumoren zu beschreiben, ist die „immune contexture“. Diese setzt sich aus den verschiedenen Arten der adaptiven Immunzellen, deren Dichte, Lokalisation und funktionelle Ausrichtung zusammen. Die Zusammensetzung dieses Immuninfiltrat nimmt Einfluss auf die Prognose und das Therapieansprechen der Patienten [58, 59]. Ein anderer Marker für das Immunsystem sind stromale tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs), welche vor allem in den vergangenen Jahren in der Mammakarzinom-Forschung an Bedeutung gewonnen haben. Während des Brustkrebs-Wachstums kann ein Zuwachs an Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems beobachtet werden. Vor allem B- und T-Lymphozyten und Makrophagen machen einen Großteil der Population aus [60]. Auch im Mammakarzinom fällt auf, dass Immunzellen, je nach Untergruppe, entweder den

Tumor eliminieren oder hemmen können oder dem Tumor beim Wachstum behilflich sein können. So zeigen CD8+ zytotoxische T-Zellen [61], CD4+ Th1-Zellen [62], M1-Makrophagen, natürliche Killerzellen und DC1-Dendritische Zellen eine negative Wirkung auf den Tumor [63]. M2-Makrophagen, DC2-Dendritische Zellen [63], CD4+ TH2-Zellen [64] und N2-Granulozyten wurden mit einem tumorfördernden Effekt in Zusammenhang gebracht. CD4+ regulatorische T-Zellen [65, 66] und CD4+ Th17 Zellen [67] konnten sowohl mit einem negativen Einfluss auf den Tumor als auch mit einer tumorfördernden Auswirkung in Zusammenhang gebracht werden, wobei deren Zusammenspiel durch die sezernierten Faktoren ebenfalls eine große Rolle spielt. Zellen der myeloiden Zellreihe sind vor allem durch die Faktoren, die diese produzieren, dafür mitverantwortlich, ob ein Mikroklima, welches tumorfördernd ist oder zur Hemmung bzw. Elimination des Tumors beiträgt, entsteht [63].

Trotz dieses multifaktoriellen Zusammenspiels und der teils gegensätzlichen Wirkung der Leukozyten, konnte eine hohe Anzahl von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) in HE-Schnitten, ohne die genaue Zuordnung in Leukozyten-Subgruppen, eine bessere Prognose im Mammakarzinom vorhersagen [68]. Auch in anderen Tumorentitäten, wie zum Beispiel dem Melanom, dem kolorektalen Karzinom und dem Ovarialkarzinom konnte gezeigt werden, dass TILs das Tumor-Wachstum einschränken können und mit einer besseren Prognose korrelieren [69]. In HER2-positiven Tumoren und triple-negativen Tumoren korrelierte eine erhöhte Anzahl an TILs mit einem verbesserten Überleben [70]. Sowohl in adjuvanten als auch in neoadjuvanten Studien konnte gezeigt werden, dass TILs ein besseres Ansprechen auf die Therapie beim Hormonrezeptor-negativen und HER2-positiven Mammakarzinom vorhersagen können [68, 71-73]. Denkert et al. konnte zeigen, dass eine erhöhte Anzahl an TILs ein verbessertes Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie in allen Subtypen voraussagen kann [70]. In neoadjuvanten Studien war zudem eine hohe Anzahl an TILs mit dem Erreichen einer pathologischen Komplettremission nach neoadjuvanter Chemotherapie (OR=2.81; $p < 0.001$) assoziiert, noch deutlicher war der Zusammenhang in der triple-negativen Kohorte (OR=4.67; $p < 0.001$) [68]. Eine hohe Anzahl an TILs kann häufiger in aggressiveren und stark proliferierenden Mammakarzinomen, vor allem den triple-negativen und HER2-positiven Subtypen gefunden werden und korreliert mit einem höheren Grading [72, 74]. Die routinemäßige Bestimmung von TILs wird bereits beim triple-negativen Mammakarzinom in der neuen Leitlinie der St.-Gallen Konsensus-

Konferenz empfohlen, vor allem aufgrund ihrer prognostischen Aussagekraft [75]. Um als eine Entscheidungsgrundlage für oder gegen eine neo-/adjuvante Chemotherapie zu dienen, fehlen noch die entsprechenden Studien [75]. TILs wurden zudem 2019 in die aktuelle 5. Edition der WHO-Klassifikation als histopathologischer Prognosefaktor aufgenommen [76].

1.7.1. Strategien zur Verbesserung der Auswertung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten

In den unterschiedlichen Studien zu tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) wurden verschiedene Methoden verwendet, um TILs zu bestimmen. Zudem waren die Herangehensweisen an die Auswertung der TIL-Daten und die verwendeten Grenzwerte sehr unterschiedlich [68, 77]. Um die Auswertung zu verbessern und zu standardisieren, hat die internationale TILs-Arbeitsgruppe Empfehlungen zur TIL-Auswertung veröffentlicht, welche in Abbildung 1 zusammengefasst sind [77].

Um die Variabilität zwischen den Forschern zu bestimmen, wurden von der internationalen immuno-onkologischen Biomarker Arbeitsgruppe zwei Ringstudien durchgeführt [78]. 120 prätherapeutische Biopsien aus der GeparSixto-Studie der German Breast Group (GBG) wurden in den Ringstudien ausgewertet. An der ersten Ringstudie nahmen 32 Pathologen von 27 Instituten aus neun Ländern teil. An der zweiten Ringstudie arbeiteten 28 Pathologen mit. Voraussetzung war, dass die Pathologen vor der ersten Ringstudie die in Abbildung 1 genannten Empfehlungen zur TIL-Auswertung lasen und bei deren Auswertung berücksichtigten. In der ersten Ringstudie wurden digitalisierte Schnitte auf eine Webseite hochgeladen und die Pathologen sollten für jeden Schnitt die stromalen TILs semiquantitativ in Prozent angeben. In der ersten Ringstudie konnte eine gewisse Übereinstimmung gezeigt werden, jedoch wurde der festgesetzte Endpunkt nicht erreicht. Es erfolgte eine Fehleranalyse der ersten Ringstudie, wodurch versucht wurde, eine Verbesserung der Standardisierung der zweiten Ringstudie zu erreichen. In der zweiten Ringstudie wurden die digitalisierten Bilder mit Hilfe einer neu entwickelten Software zur Bildpräsentation evaluiert, welche als Basis für den in dieser Arbeit benutzten TILs Quantifier diente. Es wurden dieselben Empfehlungen wie in der ersten Ringstudie eingehalten, zusätzlich wurde festgelegt in welcher Vergrößerung die Schnitte evaluiert werden sollen und dass mindestens drei Areale berücksichtigt werden müssen. Ähnlich wie beim TILs Quantifier, konnte man bei der in der zweiten

Ringstudie verwendeten Software, den TIL-Wert eingeben und zum direkten Vergleich wurde ein Referenzbild mit einem Beispiel der gewählten Lymphozytendichte präsentiert. Die Referenzbilder basierten auf den Tumorproben aus der ersten Ringstudie, welche die höchste Übereinstimmung aufwiesen und so den Konsens einer großen Gruppe von internationalen Pathologen repräsentierten. Mit einem Drehregler konnte der TIL-Wert eingegeben werden, wodurch das entsprechende Referenzbild für den gewählten Wert präsentiert wurde und die Pathologen so die Bilder vergleichen und den Wert anpassen konnten, bis die größte Übereinstimmung zwischen dem zu evaluierenden Bereich und dem Referenzbild gefunden wurde. In der Studie wurde die Interobserver-Variabilität mit Hilfe des Intraklassen-Korrelationskoeffizienten (ICC) berechnet. Ein ICC von $>0,7$ wurde als signifikant erachtet. Das 95%-Konfidenzintervall (KI) sollte oberhalb des ICC von $0,7$ liegen. In der ersten Ringstudie war der ICC $0,70$ (95%-KI: $0,62-0,78$), somit wurde der Endpunkt der Studie nicht erreicht. Nachdem die Auswertung durch die Fehleranalyse aus der ersten Ringstudie verbessert werden konnte, gelang es in der zweiten Ringstudie ein ICC von $0,89$ (95%-KI: $0,85-0,92$) zu erreichen. Ein ICC von $0,89$ bedeutet, dass 89% der Varianz des Lymphozyten-Wertes auf einer tatsächlichen biologischen Varianz zwischen den Tumoren basieren und nur 11% der Varianz auf einem Artefakt aufgrund unterschiedlicher Auswertungen der Pathologen beruht. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Software zum Vergleich mit Referenzbildern für den Prozess der Standardisierung der Auswertung von TILs hilfreich sein kann [78].

Abb. 1: Empfehlungen zur Auswertung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) im Mammakarzinom [77]

- 1) TILs sollten im stromalen Gewebe ausgewertet werden (= % der stromalen TILs). Der Nenner, welcher die Prozente der stromalen TILs bestimmt, ist die Fläche des stromalen Gewebes und nicht die Anzahl der stromalen Zellen.
- 2) TILs sollten nur innerhalb der Tumorgrenzen evaluiert werden.
- 3) TILs außerhalb des Tumors, in der Umgebung von DCIS und normalen Lobuli sollten ausgeschlossen werden.
- 4) TILs in Tumorarealen mit Schnittartefakten, Nekrose, ausgeprägter Fibrose und in der vorhergehenden Biopsiestelle sollten ausgeschlossen werden.
- 5) Alle mononukleären Zellen sollten in die Auswertung einfließen, Granulozyten sollten ausgeschlossen werden.
- 6) Ein Schnitt (4-5µm, Vergrößerung x200-400) pro Patient wird als ausreichend betrachtet.
- 7) Ganze Schnitte sollten wenn möglich gegenüber Biopsien bevorzugt werden. Prätherapeutische Biopsien können vor neoadjuvanter Chemotherapie verwendet werden.
- 8) In die Auswertung sollte der durchschnittliche TIL-Gehalt einfließen. Man sollte sich nicht nur auf Bereiche mit zahlreichen TILs fokussieren.
- 9) TILs sollten als kontinuierliche Variable angegeben werden, da so eine genauere statistische Analyse möglich ist. In der Praxis werden die meisten Pathologen selten einen Wert wie zum Beispiel 13,5% notieren, sondern zu den nächstgelegenen 5-10% aufrunden, in diesem Beispiel 15%. Der Pathologe sollte den TIL-Wert so detailgetreu wie möglich angeben.
- 10) TILs sollten als kontinuierlicher Parameter ausgewertet werden. Das Prozent von stromalen TILs ist ein semiquantitativer Parameter, z.b. ein stromaler TIL-Wert von 80%, heißt, dass 80% der stromalen Fläche dicht mit Lymphozyten bedeckt sind. Für die Auswertung muss jedoch beachtet werden, dass Lymphozyten keine soliden Aggregate bilden. Bei einem TIL-Wert von 100% besteht daher auch leeres stromales Gewebe zwischen den Lymphozyten.

Tumorinfiltrierende Lymphozyten

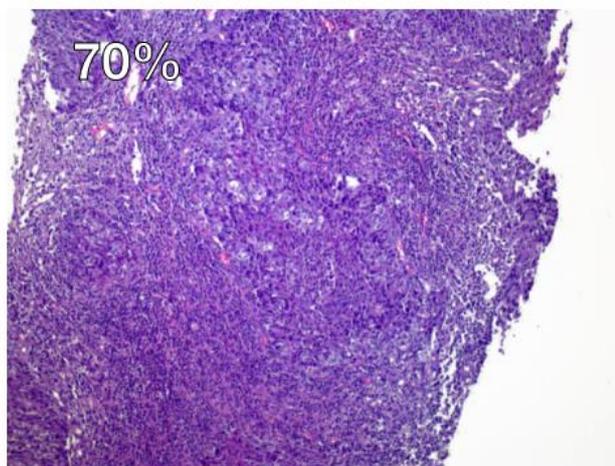
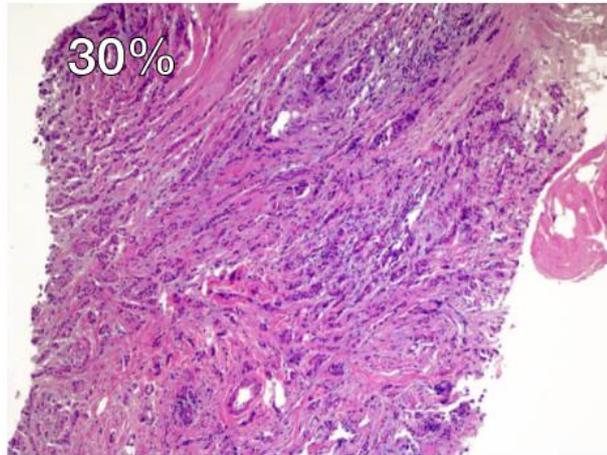
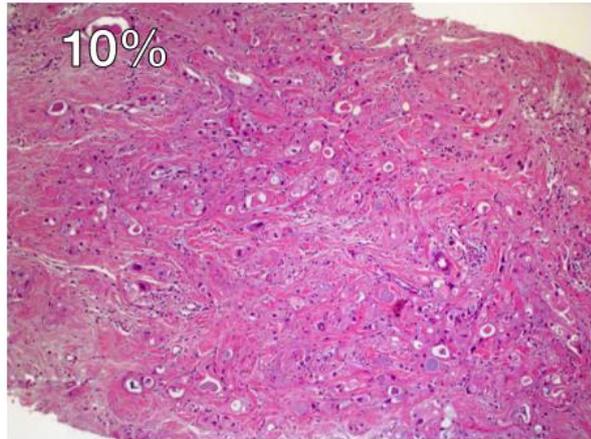


Abb. 2: Beispielbilder der ausgewerteten Bereiche für TILs, der im Rahmen dieses Projektes erfolgten Evaluation. Der entsprechende TIL-Wert ist im Bild in Prozent angegeben.

1.8. Ki-67: wichtiger Biomarker für Therapieentscheidungen

Ki-67 ist ein Biomarker für Proliferation, ein nukleares Antigen, welches in sich teilenden Zellen exprimiert wird, in ruhenden Zellen jedoch nicht nachgewiesen werden kann. Es wurde von Gerdes et al. im Jahre 1983 an einer Hodgkin-Lymphom-Zelllinie entdeckt. Der Name setzt sich zusammen aus Ki als Abkürzung für die Universität Kiel, an welcher es entdeckt wurde und der Nummer 67 für die Klon-Nummer des monoklonalen Maus-Antikörpers auf der 96-well-plate, welcher das Antigen detektiert hatte [79]. Das Gen, welches Ki-67 kodiert, liegt auf Chromosom zehn (10q25-ter) und besteht aus 15 Exons, sowie 14 Introns und insgesamt 29 965 Basenpaaren [80]. Zwei Isoformen des Antigens mit einem molekularen Gewicht von jeweils 345 und 395 kDa sind bekannt [80]. Der Nutzen des Antigens Ki-67 erklärt sich durch die unterschiedliche Expression während des Zellzyklus. Zellen exprimieren das Antigen in der G1-, S-, G2- und M-Phase, jedoch nicht in der Ruhephase G0. Es kann ein Anstieg der Expression beobachtet werden, in der G1 und S-Phase ist die Expression niedrig, am höchsten ist die Expression während der Mitose, wo das Protein mit den kondensierten Chromosomen verbunden ist [81]. Während der Interphase ist das Protein in den dichten Fibrillen des Zellkerns verpackt. Studien haben gezeigt, dass Ki-67 eine Rolle in der Polymerase-I abhängigen ribosomalen RNA-Synthese spielt. Rahmzadeh et al. konnte zeigen, dass bei Inaktivierung von Ki-67 die Polymerase-I abhängige ribosomale RNA-Synthese inhibiert wird [82, 83]. Obwohl dadurch anzunehmen ist, dass Ki-67 eine wichtige Rolle in der Zellteilung spielt, ist die exakte Funktion des Antigens jedoch noch weitgehend unerforscht.

In der Routinediagnostik wird die Expression von Ki-67 mittels Immunhistologie evaluiert. Verschiedene Antikörper wurden getestet und stehen zur Verfügung, wie MIB-1, MM-1, Ki-S5 und SP6. Der meistverwendete Antikörper-Klon zurzeit ist MIB-1 [84]. Immunhistologisch kann mit der Färbung mittels eines Ki-67-Antikörpers eine Zellkern-Färbung beobachtet werden, jegliche Intensität der Färbung wird als positive Zelle gewertet. Die internationale „Ki-67 in breast cancer working group“ hat Richtlinien zur optimierten Ki-67-Auswertung veröffentlicht [85]. Diese Empfehlungen sind in Abbildung 3 zusammengefasst.

Bis dato konnte Ki-67 in allen sich teilenden Zellen nachgewiesen werden und es ist keine Zelllinie bekannt, die Ki-67 nicht bei der Zellteilung exprimiert [86]. Die Expression von Ki-67 ist in verschiedenen Tumorarten mit einer schlechten

Prognose vergesellschaftet. Eine erhöhte prätherapeutische Ki-67-Expression konnte unter anderem im Urothel-, Prostata- und Zervixkarzinom ein schlechteres Gesamtüberleben und kürzeres krankheitsfreies Überleben vorhersagen [87-89]. Jedoch ist Ki-67 in keiner anderen Tumorentität bezüglich des prognostischen und prädiktiven Werts so gut erforscht wie beim Mammakarzinom. Eine hohe prätherapeutische Ki-67-Expression im Mammakarzinom hat einen negativen prognostischen Wert. Mehrere Meta-Analysen konnten bestätigen, dass ein hoher prätherapeutischer Ki-67-Index ein unabhängiger prognostischer Faktor für ein schlechteres Überleben ist [85, 90-92]. Betrachtet man die prädiktive Rolle des Markers im neoadjuvanten Setting, so geht der Effekt in die entgegengesetzte Richtung. In neoadjuvanten klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass ein hoher prätherapeutischer Ki-67-Index eine pathologische Komplettremission vorhersagt, welche mit einer besseren Prognose verbunden ist [93, 94]. In adjuvanten Studien ist die Vorhersagekraft von Ki-67 für ein Therapieansprechen jedoch nicht so eindeutig. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass ein hoher Ki-67-Index den Nutzen von zytotoxischer Therapie im Hormonrezeptor-positiven, HER2-negativen Mammakarzinom vorhersagte [95-98]. In anderen Studien, konnte die prädiktive Funktion für Ki-67 nicht bestätigt werden [99, 100]. In der neoadjuvanten GeparTrio-Studie konnte die Analyse des prognostischen Effekts des Ki-67-Index der Subtypen interessante Ergebnisse liefern. Patienten mit Hormonrezeptor-positiven Tumoren hatten bei einer hohen Ki-67-Expression eine schlechte Prognose, Patienten mit Hormonrezeptor-negativen Tumoren hatten jedoch bei hoher Ki-67-Expression eine bessere Prognose. Verknüpft mit den Ergebnissen von Metaanalysen, dass die pCR-Rate im Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinom mit einer besseren Prognose verbunden ist, jedoch nicht im Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom, entwickelte Denkert et al. durch diese Beobachtung eine Einteilung der Mammakarzinome in drei verschiedene Gruppen: 1) Gering proliferierende Tumore, mit einer niedrigen Ki-67-Expression, die nicht auf eine Chemotherapie ansprechen, jedoch trotzdem eine gute Prognose aufweisen. 2) Hoch proliferative Tumore, mit einer hohen Ki-67-Expression, die ein gutes Ansprechen auf Chemotherapie zeigen und eine gute Prognose haben. 3) Hoch proliferative Tumore, mit einer hohen Ki-67-Expression, die nicht auf Chemotherapie ansprechen und mit einer schlechten Prognose assoziiert sind [101]. Da das Patientenkollektiv von adjuvanten Studien stets aus verschiedenen dieser Typen

besteht, ist dies eine Erklärung für die nicht eindeutige prädiktive Rolle von Ki-67 im adjuvanten Setting [101].

Über lange Zeit war die schlechte Reproduzierbarkeit zwischen den Kliniken ein Problem für die Etablierung von Ki-67 als zuverlässigen Biomarker in der klinisch-diagnostischen Praxis [46]. Diesem Problem hat sich die internationale „Ki-67 in breast cancer working group“ angenommen und Empfehlungen zur Auswertung veröffentlicht (siehe Abb. 3) [85]. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass nach Implementierung der Empfehlungen und entsprechender Einarbeitung in die Auswertung, der Intraklassen-Korrelationskoeffizient von 0,71 (95%-Konfidenzintervall [KI]: 0,47–0,78) auf 0,92 (95%-KI: 0,88–0,96) gesteigert werden konnte [85]. Die Reproduzierbarkeit der Ki-67-Auswertung ist in den Tumoren mit einem niedrigen (<10%) und hohen (>25%) Ki-67-Index gut, die größten Abweichungen zeigen sich vor allem im mittleren Bereich (10-25%) [102, 103]. In diesem mittleren Bereich kann vor allem die Auswertung von vier bis fünf zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern die Reproduzierbarkeit des Index verbessern [104, 105]. Ein Kritikpunkt, den Petrelli et al. in seiner Meta-Analyse aufführt, ist die Verwendung von sehr unterschiedlichen Grenzwerten in den verschiedenen Studien [90]. Petrelli et al. konnte in einer Metaanalyse zeigen, dass das Gesamtüberleben bei einem Ki-67-Index $\geq 25\%$ signifikant schlechter war, als bei einem Ki-67-Index $< 25\%$ (Hazard Ratio [HR]=2,05; 95%-KI: 1,66-2,53, $p < 0,00001$) [90]. Diese Daten werden in der deutschen S3-Leitlinie Mammakarzinom als Teil der Grundlage für die Empfehlung genannt, dass bei einem Ki-67-Index von $\geq 25\%$ von einem erhöhten Risiko ausgegangen werden kann. In der mittleren Gruppe von 10-25% ist die Verwendung von Ki-67 für Therapieentscheidungen laut der S3-Leitlinien-Gruppe nicht sicher [14]. Ein Ki-67-Index von <10% wird beim Hormonrezeptor-positiven, HER2-negativen Mammakarzinom als niedrig eingestuft [14].

Abb. 3: Empfehlungen zur Ki-67-Auswertung im Mammakarzinom [85]

Präanalytik

- Sowohl Schnitte von Biopsien als auch von OP-Präparaten sind akzeptable Proben; wenn Indices verglichen werden sollen, soll vorzugsweise für die zu vergleichenden Fälle dasselbe Material verwendet werden.
- TMAs (tissue microarrays) können im Rahmen von klinischen oder epidemiologischen Studien verwendet werden.
- Die Fixierung in neutral gepuffertem Formalin sollte nach den gleichen Empfehlungen wie für Steroid-Rezeptoren erfolgen.
- Nach der Vorbereitung der Schnitte sollten diese nicht länger als 14 Tage bei Raumtemperatur gelagert werden. Färbungen, welche nach einer längeren Lagerperiode erfolgen, sollten mit Vorsicht betrachtet werden.

Analytik

- Jede Färbe-Runde sollte Positiv- und Negativ-Kontrollen enthalten; positive Zellkerne von gutartigen Zellen mit Mitosefiguren dienen als Qualitätsmerkmal für die Färbung.
- Eine Antigen-Demaskierung ist für die Färbung notwendig; nach Datenlage ist die wärme-induzierte Demaskierung meistens mit Hilfe von Mikrowellen als Methode vorzuziehen.
- Der Antikörper-Klon MIB-1 ist zurzeit zu befürworten.

Auswertung

- In ganzen Schnitten sollten drei HPFs (high-power fields; 40x Objektiv) zur Auswertung ausgewählt werden, welche das Spektrum der Färbung von der Übersicht der ganzen Sektion repräsentieren.
- Um eine prognostische Aussage treffen zu können, soll die Invasionsfront des Tumors in die Auswertung eingeschlossen werden.
- Falls pharmakodynamische Vergleiche zwischen Biopsien und OP-Präparaten gemacht werden, soll der Ki-67-Index am OP-Präparat auf einem Querschnitt des ganzen Tumors ausgewertet werden.
- Falls Zellherde mit starker und zahlreicher Ki-67-Färbung vorhanden sind, sollten diese in den Wert des Ki-67-Index der Sektion miteinfließen.
- Nur eine Zellkern-Färbung gilt als positiv, die Intensität der Färbung ist nicht relevant.
- Bei der Auswertung sollen mindestens 500 Zellen ausgewertet werden (vorzugsweise mindestens 1000 Zellen), außer ein Studienprotokoll gibt Gründe an, wieso weniger Zellen akzeptabel sind.
- Automatisierte Methoden der Bildanalyse zur Ki-67-Auswertung müssen noch in der klinischen Anwendung erprobt werden.

Datenverarbeitung

- Der Ki-67-Index soll in Prozent der positiv gefärbten Zellen von der Gesamtzellzahl angegeben werden.
- Die statistische Auswertung soll die logarithmische Normalverteilung, welche dem Ki-67-Wert unterliegt, berücksichtigen.
- In Studien, welche die Therapiewirksamkeit vergleichen, ist der beste Endpunkt die prozentuale Suppression von Ki-67-positiven Zellen.
- Der beste Endpunkt, um in Studien das verbleibende Rezidiv-Risiko anzugeben, ist der Anteil von Ki-67-positiven Zellen während der Therapie.
- Grenzwerte für Prognose, Prädiktion und Überwachung sollten nur angewendet werden, wenn die Ergebnisse des Labors gegenüber den Ergebnissen von Studien, welche den entsprechenden Grenzwert ermittelt haben, validiert wurden.

1.8.1. Vereinfachung und Standardisierung der Ki-67-Auswertung durch eine Software zur Bildanalyse

Die in dieser Arbeit verwendete Bildanalyse-Software beruht auf einem von Wienert et al. entwickelten Modell zur Detektion und Segmentierung von Zellkernen aus digitalisierten Schnitten zur automatisierten Bildanalyse [106]. Das Programm evaluiert die Schnitte basierend auf einer Zell-Nukleus-Segmentierungs-Methode. Zuerst werden alle geschlossenen Konturen erkannt, indem die Software das gewählte Areal scannt und maximale Unterschiede zwischen den Intensitäts-Stufen der Färbung feststellt. Dieser Schritt führt meist zu mehreren überlappenden Konturen. In einem zweiten Schritt werden die Konturen durch einen „Konturen-Wert“ evaluiert, dieser berechnet sich aus der relativen „Wichtigkeit“ der Objekte und einer Variable, die für die Passgenauigkeit der Konturen steht. In einem dritten Schritt wird ein Bild aus nicht-überlappenden Segmenten erstellt. Um einzelne Zellkerne zu erkennen, welche sich in Verbänden befinden, werden konkave Grenzen der Konturen identifiziert und die Objekte an Grenzen von zwei Konkavitäten getrennt [106]. Zellkerne werden als solche durch das zellkernspezifische Hämatoxylin innerhalb der Kontur erfasst. Um die Leistung der Methode zu testen, wurde ein Datenset aus verschiedenen Bildern vorbereitet, deren Zellen von einem Pathologen definiert wurden.

Von Klauschen et al. wurde die Methode zur automatisierten Ki-67-Index-Auswertung weiterentwickelt [107]. Dieses Programm diente als Basis zur Entwicklung des in dieser Arbeit verwendeten KI67 Quantifier. In dem Programm wurde die Erkennung von Brustkrebszellen verbessert, indem die Skala der Zellkerngrößen in einer Präsegmentierung geschätzt wurde. Die ursprüngliche Methode der Lokalisation der Zellnuklei basierte auf dem Konzept, dass die Objekte in einem Schnitt in zwei Intensitätsstufen eingeteilt werden können. Diese Methode wurde durch eine Methode ersetzt, welche alle Objekte mit einer minimal positiven Hämatoxylin-Intensität und einem positiven Intensitätsgradienten registriert. Basierend auf diesen Intensitätsgradienten wird ein Histogramm erstellt, welche Objekte in den Vordergrund und welche Objekte in den Hintergrund gehören. Um Ki-67-positive und Ki-67-negative Zellen zu erkennen, kommt eine Farb-Dekonvolution, welche die immunhistologische Färbung von der Gegenfärbung trennt, zum Einsatz [107]. Ein Schwellenwert um Ki-67-positive Zellen zu ermitteln, wird automatisch berechnet. Liegt der Wert für einen Zellkern 5% über dem Schwellenwert, wird dieser als positiv

erachtet. Zwischen Tumorzellen und Stromalen Zellen wird anhand einer Skala der typischen Zellkerngröße der Tumorzellen unterschieden. Abschließend können Areale, welche von dem Programm nicht richtig eingestuft wurden, manuell von einem Pathologen exkludiert werden. Das Ziel der Studie von Klauschen et al. war die Methode zur automatisierten Bildanalyse zur Ermittlung des Ki-67-Index, durch die oben beschriebene Software, gegenüber einem manuell von Pathologen ermittelten Ki-67-Index zu validieren. Der Intraklassen-Korrelationskoeffizient (ICC) zwischen den automatisch und manuell ermittelten Indices betrug 0,93, somit konnte eine starke Übereinstimmung zwischen der automatisierten und manuellen Methode bewiesen werden [107]. Der Vorteil dieser Software zur Bildanalyse gegenüber den meisten anderen Methoden ist, dass keine manuelle Kalibrierung durch den Nutzer oder ein Lernprozess der Software zum richtigen Erkennen der Zellkerne notwendig ist. Ein Vorteil der Software zur Bildanalyse gegenüber der manuellen Methode ist eine große Zeitersparnis. Die manuelle Auszählung des Ki-67-Index benötigt meistens sechs bis zehn Minuten pro Schnitt, wohingegen die beschriebene Methode 30 bis 40 Sekunden zum Berechnen eines Ki-67-Index benötigt [107]. Obwohl in der Studie von Klauschen et al. eine große Übereinstimmung in den Gesamtergebnissen zwischen dem automatisiert und manuell ermitteltem Ki-67-Index gezeigt werden konnte, wurde vor allem im mittleren Bereich des Ki-67-Index eine hohe Interobserver- und Intraobserver-Variabilität beschrieben [102].

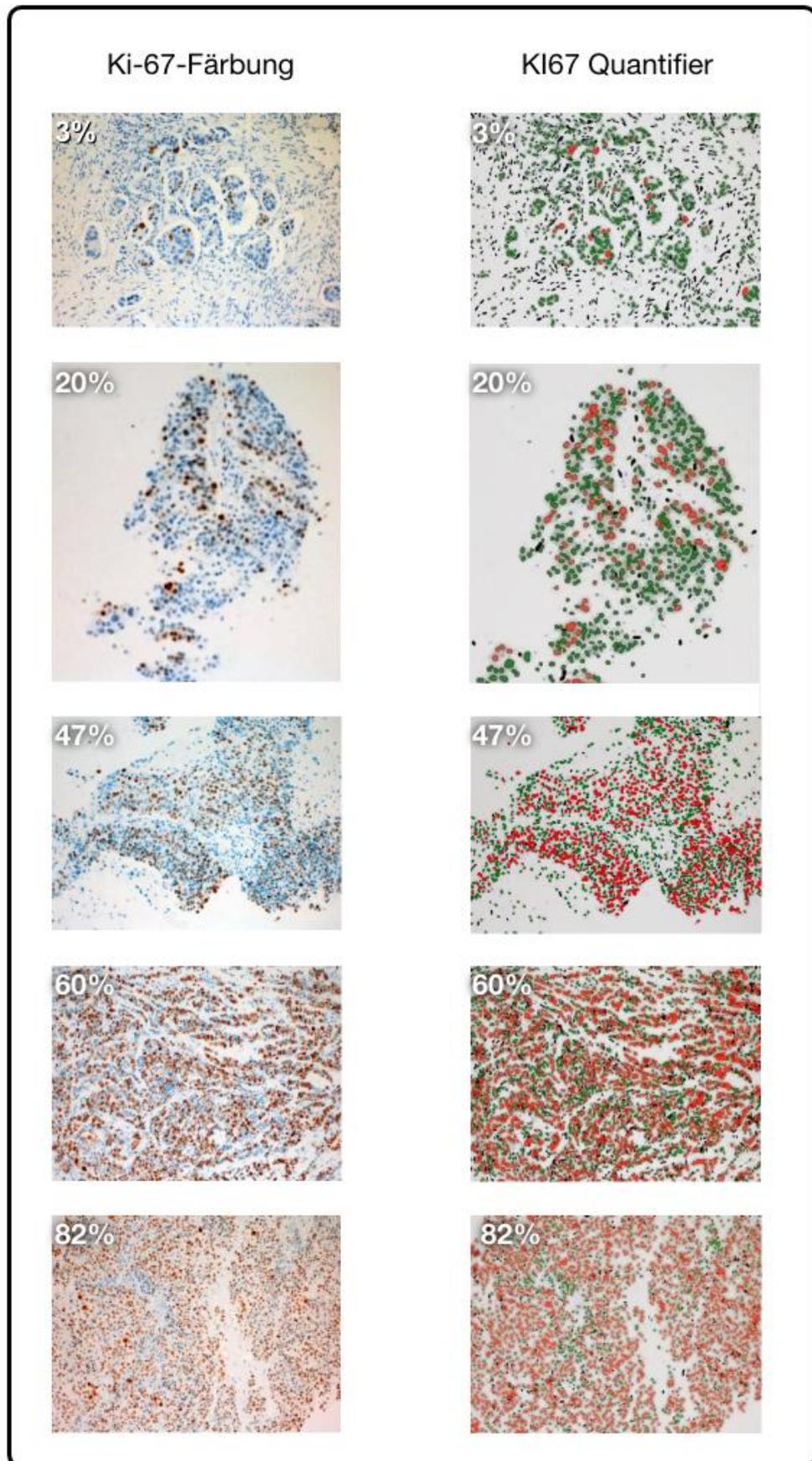


Abb. 4: Beispielbilder der Ki-67-Färbung und die entsprechende Auswertung des KI67 Quantifiers, der im Rahmen dieses Projektes erfolgten Evaluation. Der entsprechende Ki-67-Index ist im Bild angegeben.

1.9. Prognostische Faktoren des Therapieansprechens nach neoadjuvanter Chemotherapie

1.9.1. Die pathologische Komplettremission als Marker für ein sehr gutes Therapieansprechen

Die pathologische Komplettremission (pCR= pathological complete response) ist eine Abwesenheit von invasiven Tumorzellen im OP-Präparat nach neoadjuvanter Chemotherapie und gibt wichtige Hinweise auf die Prognose der Erkrankung. In der Vergangenheit wurden verschiedene Definitionen von pCR verwendet, welche die Lymphknoten miteinschlossen oder nicht. In einer Metaanalyse von zwölf Studien mit insgesamt 11 955 Patienten konnte gezeigt werden, dass pCR, definiert als das Fehlen von invasiven Tumorzellen in Mamma und Lymphknoten, ein Prognosefaktor für ein verbessertes Gesamtüberleben (ypT0 ypN0: Hazard Ratio [HR]= 0,36; 95%-KI: 0,30-0,44; ypT0/is ypN0: HR=0,36; 95%-KI: 0,31-0,42) und ereignisfreies Überleben ist (ypT0 ypN0: HR=0,44, 95%-KI: 0,39-0,51; ypT0/is ypN0: HR=0,48; 95%-KI: 0,43-0,54) [108]. Diese Studie beschäftigte sich auch mit der Frage, ob pCR ein neuer Surrogatmarker für den Therapieerfolg beim Mammakarzinom sein könnte, sodass neue Chemotherapien schneller von Behörden bewilligt werden könnten. Wurden die Daten auf Versuchsebene in Abhängigkeit der verschiedenen Behandlungsgruppen analysiert, konnte eine erhöhte Rate an pCR in einer Behandlungsgruppe, kein verlängertes Überleben in dieser Gruppe vorhersagen [108]. Es bestehen jedoch Unterschiede in den Subtypen beim Zusammenhang von pCR mit dem klinischen Verlauf. Im triple-negativen und HER2-positiven Mammakarzinom ist die pCR als Surrogatmarker für die Wirksamkeit einer Chemotherapie bzw. Anti-HER2-Therapie anerkannt [109]. Dies sind auch die Subtypen, welche die höchsten pCR-Raten aufweisen [110, 111].

1.10. Mit dem Residual Cancer Burden (RCB) gelingt eine weitere Stratifizierung der Resterkrankung

Abhängig von dem Ausmaß der Resterkrankung in Brust und/oder Lymphknoten variiert die Prognose der Patienten. Um das pathologische Ansprechen besser zu kategorisieren, haben Symmans et al. den Residual Cancer Burden Index entwickelt [112]. In diesen Index fließen der zweidimensionale Durchmesser des primären Tumorbetts, der relative Anteil von invasivem Karzinom des primären Tumorbetts, die

Anzahl von metastasierten Lymphknoten und der Durchmesser der größten Lymphknotenmetastase ein. Der Index unterteilt die Patienten in vier verschiedene Kategorien: RCB-0 (pCR), RCB-I (minimale Resterkrankung), RCB-II (moderate Resterkrankung), RCB-III (ausgeprägte Resterkrankung). In der Studie von Symmans et al. hatten Patienten mit RCB-I eine ähnliche Prognose wie Patienten, die eine pCR aufwiesen. Der Index zeigte sich als ein prognostischer Faktor unabhängig von anderen klinisch-pathologischen Merkmalen [112].

2. Zielstellung

Das Mammakarzinom wird heutzutage nicht mehr als eine homogene Entität gesehen, sondern in mehrere Subgruppen eingeteilt, die unterschiedlich therapiert werden. Um die Individualisierung der Brustkrebstherapie weiter fortzuentwickeln, kann es sehr hilfreich sein, die Adaptation der Tumorzellen und die Veränderung der Interaktion mit dem Immunsystem durch die Chemotherapie besser zu verstehen. Wir untersuchten in dieser Arbeit tumorinfiltrierende Lymphozyten und den Ki-67-Index in prätherapeutischen Biopsien und in intermediären Biopsien, welche während der neoadjuvanten Chemotherapie (NACT) entnommen wurden und verglichen diese miteinander. Zusätzlich untersuchten wir den Tumorgehalt in intermediären Biopsien (TB). Folgende Fragen sollten mit dieser Arbeit beantwortet werden:

- 1) Wie verändern sich TILs und Ki-67 während der Chemotherapie im Vergleich von prätherapeutischer und intermediärer Biopsie?
- 2) Korrelieren die Veränderungen in TILs, Ki-67 und der Tumorgehalt (iT_u-/iT_u+) in der intermediären Biopsie mit den immunhistologischen Subtypen?
- 3) Können Veränderungen in den Parametern oder eine Abwesenheit von Tumorzellen in der intermediären Biopsie (iT_u-) eine pathologische Komplettremission (pCR) vorhersagen?
- 4) Haben Veränderungen in TILs und Ki-67 oder iT_u- Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Patienten

Patientinnen aus GBG-Studien, in welchen Biopsien vor und während der Chemotherapie entnommen wurden, wurden für das Patientenkollektiv in Betracht gezogen. Folgende Studien wurden daher in Erwägung gezogen: GeparQuattro-Studie, GeparQuinto-Studie und GeparSixto-Studie. Im Nachfolgenden werden diese Studien genauer beschrieben. Anschließend wurde die Verfügbarkeit der Biopsien in der Tumorbank geprüft. War geeignetes Gewebe in der Tumorbank vorhanden, so wurde die Patientin in die Studie eingeschlossen (Stichtag: 24.09.2015). Insgesamt wurden 297 Patientinnen retrospektiv in die Studie eingeschlossen. Die schriftliche Einverständniserklärung zur Nutzung der Gewebeproben für wissenschaftliche Zwecke lag für alle Patientinnen vor, ebenso die entsprechenden Bewilligungen der Ethikkommission.

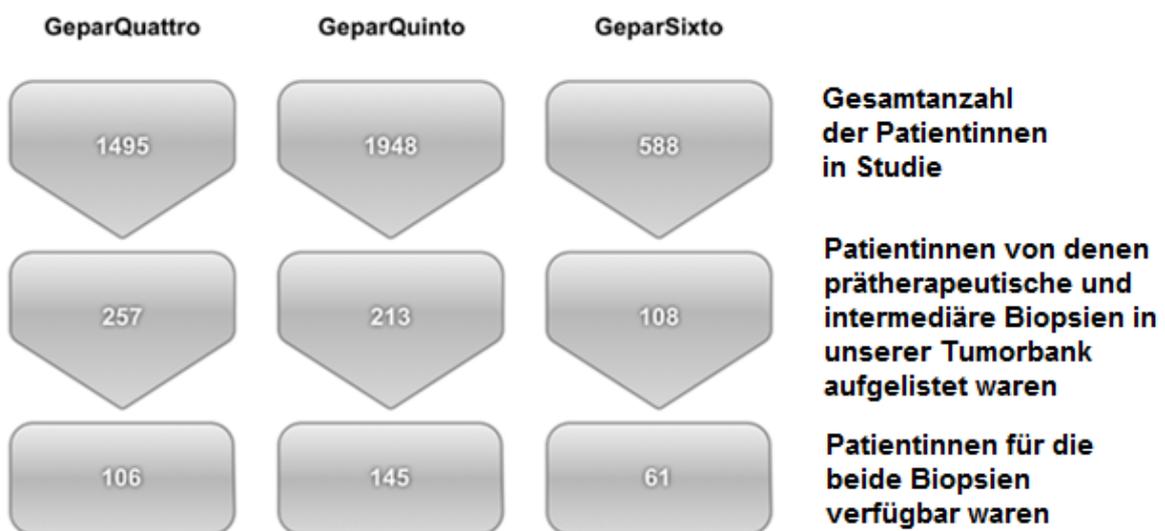


Abb. 5: Konsortdiagramm der Zusammenstellung des Patientenkollektivs

GeparQuattro-Studie

Die GeparQuattro-Studie (G4, NCT 00288002) war eine prospektive randomisierte neoadjuvante multizentrische Phase-III-Studie, welche das Hinzufügen von Capecitabin zur Chemotherapie mit Epirubicin, Cyclophosphamid und Docetaxel

(EC-T) untersuchte. Zwischen August 2005 und Dezember 2006 wurden 1495 Frauen mit Mammakarzinom rekrutiert [113]. Alle eingeschlossenen Patientinnen mussten einen Tumor aufweisen, dessen Tastbefund ≥ 2 cm war oder eine sonographische Tumorgröße von ≥ 1 cm hatte. Patientinnen mit folgenden klinisch-pathologischen Merkmalen konnten in die Studie eingeschlossen werden: entweder lokal fortgeschrittene Karzinome mit Tumorstadium cT3 oder cT4; Tumoren mit negativem Hormonrezeptorstatus, oder Tumoren, welche entweder Östrogenrezeptor-positiv oder Progesteronrezeptor-positiv waren mit Tumorstadium cN+ (bei cT2) oder bei positiver Sentinel-Lymphknotenbiopsie (bei cT1). Alle Patientinnen erhielten vier Zyklen EC. Anschließend erhielten die Patientinnen randomisiert entweder nur vier Zyklen Docetaxel, oder vier Zyklen Docetaxel und vier Zyklen Capecitabin gleichzeitig, oder vier Zyklen Docetaxel und anschließend vier Zyklen Capecitabin. Alle Patientinnen mit einem HER2-positiven Tumor bekamen Trastuzumab [113].

GeparQuinto-Studie

Die GeparQuinto-Studie (G5, NCT 00567554) war eine prospektive randomisierte neoadjuvante multizentrische Phase-III-Studie, welche 1948 Frauen zwischen November 2007 und Juni 2010 rekrutierte. Alle eingeschlossenen Patientinnen mussten einen Tumor aufweisen, dessen Tastbefund ≥ 2 cm war oder eine sonographische Tumorgröße von ≥ 1 cm hatte. Patientinnen mit folgenden klinisch-pathologischen Merkmalen konnten in die Studie eingeschlossen werden: entweder lokal fortgeschrittene Karzinome mit Tumorstadium cT3 oder cT4; oder Tumoren mit negativem Hormonrezeptor-Status, oder Tumoren, welche entweder Östrogenrezeptor-positiv oder Progesteronrezeptor-positiv waren mit Tumorstadium cN+ (bei cT2) oder bei positiver Sentinel-Lymphknotenbiopsie (bei cT1). Alle Patientinnen bekamen vier Zyklen EC. Alle Patientinnen mit einem HER2-negativen Tumor wurden anschließend randomisiert, um zusätzlich Bevacizumab zu erhalten oder keine zusätzliche Therapie zu erhalten. Patientinnen, aus dieser HER2-negativen Gruppe, bei welchen nach vier Zyklen EC \pm Bevacizumab kein Therapieansprechen im Ultraschall oder in der klinischen Untersuchung beobachtet werden konnte, wurde die Chemotherapie umgestellt. Patientinnen wurden randomisiert, Paclitaxel mit oder ohne Everolimus zu erhalten[114]. Patientinnen mit

einem HER2-positiven Tumor wurden randomisiert, Trastuzumab oder Lapatinib zu erhalten.

GeparSixto- Studie

Die GeparSixto-Studie (G6, NCT 01426880) war eine prospektive randomisierte neoadjuvante Phase-II-Studie, welche den Effekt vom Hinzufügen von Carboplatin zu einer neoadjuvanten Chemotherapie mit Paclitaxel, Doxorubicin, Trastuzumab und Lapatinib untersuchte. Zwischen August 2011 und Dezember 2012 wurden 588 Frauen rekrutiert. Eingeschlossen wurden Patientinnen mit einem HER2-positiven oder triple-negativen Mammakarzinom im Tumorstadium cT2-4 oder cT1c bei klinischem oder histologisch gesichertem Lymphknotenbefall.

Die Kohorte wurde in zwei Gruppen randomisiert, eine Gruppe erhielt simultan Carboplatin, die andere Gruppe erhielt keine zusätzliche Therapie. Alle Patientinnen erhielten Paclitaxel und Doxorubicin einmal pro Woche für 18 Wochen. Patientinnen mit einem triple-negativen Mammakarzinom erhielten simultan Bevacizumab, Patientinnen mit einem HER2-positiven Mammakarzinom erhielten simultan Trastuzumab und Lapatinib [115].

3.1.2. Prätherapeutische und intermediäre Biopsien

Die prätherapeutischen Biopsien wurden bei Diagnosestellung entnommen. Die intermediären Biopsien wurden in den Studien G4 und G5 nach vier Zyklen Epirubicin und Cyclophosphamid entnommen, und in der Studie G6 nach zwei Zyklen Paclitaxel und Doxorubicin entnommen.

3.1.3. Verwendete Materialien

Tabelle 1: Verwendete Materialien

Material	Hersteller, Firmensitz
Monoklonaler Maus Ki-67-Antikörper MIB-1 #M7240	DAKO, Glostrup, Dänemark
Xylol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Objektträger Super Frost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Eindeckmittel Vitro Clud	R. Langenbrinck – Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Substanzen für das Färbesystem Ventana Discovery XT:	Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, United States of America

- EZ Prep
- LCS
- RiboWash
- RiboCC
- Reaction Buffer
- CC1 (Cell Conditioner)
- Antibody Diluent
- Hämatoxylin II
- Bluing Reagent
- Universal secondary Antibody
- Amplifier A
- Amplifier B

Discovery DAB Map Kit, enthält:	Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, United States of America
<ul style="list-style-type: none"> - Inhibitor D - Blocker D - SA-HRP - DAB Chromogen D - DAB H₂O₂ D - Copper D 	

3.1.4. Verwendete Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller, Firmensitz
Färbesystem Ventana Discovery XT	Ventana Medical Systems Inc, Tucson, Arizona, United States of America
Mikroskopkamera Olympus DP 25	Olympus Optical, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Olympus BX 53	Olympus Optical, Hamburg, Deutschland

3.2. Methoden

3.2.1. Histopathologische Untersuchung

Alle Gewebeproben wurden in 4% Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. 5 µm dünne Sektionen wurden angefertigt, welche mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt wurden. Die Beurteilung des Differenzierungsgrades erfolgte nach dem Bloom-Richardson-Grading, modifiziert nach Elston und Ellis [116]. Die Tumorgröße und der Lymphknotenstatus wurden gemäß der Richtlinien der TNM-Klassifikation der UICC der 7. Auflage beurteilt [25]. Bei jeder Patientin wurde der Dako-Score hinsichtlich einer Überexpression von HER2 mittels Immunhistologie ermittelt. Ein Dako-Score von 0 und 1+ galt als negativ, ein Dako-Score von 3+ galt als positiv. Bei einem Dako-Score von 2+ erfolgte zusätzlich eine Beurteilung hinsichtlich einer möglichen Genamplifikation von HER2 mittels Fluoreszenz-in-situ-

Hybridisierung (FISH). Fälle mit einem Dako-Score von 2+ und einer HER2-Genamplifikation galten ebenfalls als positiv. Der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus wurde mittels Immunhistologie ermittelt.

3.2.2. Immunhistologie und Auswertung von Ki-67

Immunhistologie von Ki-67

Die immunhistologische Ki-67-Färbung wurde mit dem vollautomatischen Färbesystem Ventana Discovery XT (Ventana Medical Systems Inc, Tucson, Arizona, United States of America) durchgeführt. Alle Chemikalien für die Färbung wurden von der Firma Ventana bezogen. Um Ki-67 zu färben, wurde der MIB-1 Antikörper (Dako) in der Verdünnung 1:50 verwendet. Zuerst wurden Objektträger mit ungefärbten Sektionen in das Färbesystem platziert. Es erfolgte die Entparaffinierung mit Hilfe der Ventana EZ Prep Entparaffinierungslösung bei 76°C. Für die hitzeinduzierte Antigendemaskierung wurden die Präparate für 60 Minuten auf 100°C erhitzt und der Cell Conditioner (Ethylendiamintetraessigsäure- Puffer, pH-Wert 8,4) von Ventana kam zum Einsatz. Für die Antikörper-Inkubation in einer Verdünnung von 1:50, bei 37°C, wurden die Präparate für 32 Minuten inkubiert. Um die Bindung des Primärantikörpers sichtbar zu machen, wurde das Detektionskit „Discovery DAB Map Kit“ von Ventana verwendet. Es erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper „Universal secondary antibody“ für acht Minuten. Danach fand die Inkubation mit DAB (Diaminobenzidin) -Chromogen und Wasserstoffperoxid (0,04 %iges H₂O₂) für acht Minuten statt, um ein braunes Färbeprodukt zu erhalten. Zur Intensivierung des Färbeprodukts erfolgte die Inkubation mit der Copper Lösung (5g/l Kupfersulfat) für vier Minuten. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für acht Minuten und mit einer Bluing-Lösung für vier Minuten, die Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (2x70%, 80%, 96%, 3 x 100% je Ethanol einmal eintauchen, letztes Ethanol 1 min.) und darauffolgend ein Xylolbad (1 min). Daraufhin erfolgte das Eindecken mit Vitro-Clud.

Automatisierte Auswertung des Ki-67-Index

Von den Proben wurden drei repräsentative Areale ausgewählt, welche mit Hilfe einer Mikroskop-Kamera (Olympus DP 25, Olympus Optical, Hamburg, Deutschland) fotografiert wurden. Die Auswertung des Ki-67-Index erfolgte mit der automatischen

Ki-67-Bildanalyse-Software, hierfür wurde das Programm KI67 Quantifier von der CognitionMaster Plattform (VMScope, Berlin, Germany) verwendet und die Empfehlungen zur Ki-67-Auswertung der internationalen „Ki-67 in breast cancer working group“ wurden berücksichtigt [85].

3.2.3. Auswertung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten

Die Evaluation der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) wurde an Hämatoxylin-Eosin Färbungen vorgenommen. Diese wurden digitalisiert mit einer Mikroskop-Kamera (Olympus DP 25, Olympus Optical, Hamburg, Deutschland) und die Auswertung erfolgte mit Hilfe des TILs Quantifier-Programms der CognitionMaster Plattform (VmScope, Berlin, Germany). Die Analyse erfolgte basierend auf den Richtlinien zur standardisierten Evaluation von TILs in Brustkrebs, veröffentlicht von Denkert et al. [77] (vergleiche Kapitel 1.7.1.). Der TILs Quantifier zeigte ausgewählte Referenzbilder für den TIL-Gehalt abgestuft in 5%-Schritten an. Der TIL-Wert wurde im direkten Vergleich des ausgewählten Tumorareals der Biopsie mit den Referenzbildern, welche der TILs Quantifier anzeigt, ermittelt. Es wurden drei repräsentative Tumorareale jeder Biopsie ausgewählt und bewertet.

3.2.4. Auswertung des Tumorgehalts

Der Anteil von invasiven Tumorzellen wurde in allen Schnitten bestimmt, indem der Anteil der Tumorfläche der Sektion der Biopsie in Prozent anteilig zur Gesamtfläche der Sektion angegeben wurde. Konnte in der intermediären Biopsie keine invasive oder nicht-invasive Tumorzelle dargestellt werden, wurde dieser Fall als iTu- definiert. Waren invasive oder nicht-invasive Tumorzellen in der intermediären Biopsie vorhanden, wurde der Fall als iTu+ definiert.

3.3. Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde SPSS v25.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, United States of America) verwendet. Die pathologische Komplettremission (pCR) wurde definiert als die Abwesenheit von invasiven und nicht-invasiven Tumorzellen in Brust und Lymphknoten (ypT0/ypN0). Die Zeit von Studieneinschluss bis zum Auftreten eines lokoregionären Rezidiv oder eines Rezidivs in Form von Fernmetastasen wurde als krankheitsfreies Überleben (DFS) definiert. Der Chi-Quadrat-Test und der Fisher-Test wurden verwendet, um Korrelationen zwischen klinisch-pathologischen

Parametern, pCR und iTu+ zu testen. Der Mantel-Haenszel-Test (chi-square test for trends) wurde angewandt, um auf einen linearen Zusammenhang zwischen iTu+ und dem Grading zu testen. Um den Einfluss von iTu-/iTu+ und pCR auf das krankheitsfreie Überleben zu analysieren, wurden Kaplan-Meyer-Kurven und der Log-Rank-Test verwendet. Von den drei TIL-Werten und den drei Werten von Ki-67, welche für jede Probe ermittelt wurden, wurde der Durchschnitt berechnet. Um den Einfluss des TIL-Wertes und des Ki-67-Index zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (TA und TB) auf die pCR zu testen, wurde die Odds Ratio mit logistischer Regression berechnet. Die Veränderung in TILs und Ki-67 wurde nur in Fällen ausgewertet, bei denen in der intermediären Biopsie Tumorzellen nachweisbar waren (iTu+). Um die Veränderung des TIL-Wertes und Ki-67-Index zu begutachten, wurde der Wert aus der prätherapeutischen Biopsie, von dem Wert aus der intermediären Biopsie subtrahiert [Δ TILs(TB-TA) bzw. Δ Ki-67(TB-TA)]. Um die Vorhersagekraft der Veränderung des TIL-Wertes und des Ki-67-Index [Δ TILs(TB-TA) bzw. Δ Ki-67(TB-TA)] für pCR zu testen, wurde die Odds Ratio für eine gesteigerte pCR-Rate pro 1% Veränderung des Δ TILs(TB-TA) bzw. Δ Ki-67(TB-TA) mit logistischer Regression berechnet. Um den Einfluss der Veränderung des Δ TILs(TB-TA) bzw. Δ Ki-67(TB-TA) auf das DFS zu evaluieren, wurde die Hazard Ratio für Tod oder Rezidiv pro 1% Veränderung des Δ TILs(TB-TA) bzw. Δ Ki-67(TB-TA) mit der Cox-Regression berechnet. Als Anstieg in TILs und Ki-67 wurde ein Zuwachs des Wertes um 20% von TA zu TB definiert. Als Abfall wurde ein Rückgang des Wertes um 20% von TA zu TB definiert. Der Chi-Quadrat-Test und der exakte Fisher-Test wurden verwendet um auf Korrelationen zwischen der Veränderung im TIL-Wert und Ki-67-Index und histopathologischen Merkmalen zu testen. Ein P-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Patientencharakteristika

Insgesamt waren für 297 Patientinnen prätherapeutische (TA) und intermediäre Biopsien (Biopsien die während der Chemotherapie angefertigt wurden, TB) verfügbar. Die Charakteristik des Patientenkollektivs stellte sich folgendermaßen dar (Tabelle 3): 100 Patientinnen (33,7%) aus dem untersuchten Kollektiv nahmen teil an der GeparQuattro-Studie, 139 Patientinnen (46,8%) an der GeparQuinto-Studie und

58 Patientinnen (19,5%) an der GeparSixto-Studie. Das Medianalter der Frauen zum Diagnosezeitpunkt war 48 Jahre (22 – 76 Jahre).

Tabelle 3: Charakteristik des Patientenkollektivs

Merkmal	Anzahl der Patientinnen	%
Gesamtkollektiv	297	100
Histologischer Typ		
Kein spezieller Typ (NST)	268	90,2
Lobuläres Karzinom	23	7,7
Andere Karzinome	6	2,0
Tumorstadium		
cT1	25	8,4
cT2	181	60,9
cT3	42	14,1
cT4	49	16,5
Lymphknotenstatus		
cN0	125	42,1
cN1	158	53,2
cN2	11	3,7
cN3	2	0,7
N/A	1	0,3
Grading		
G1	8	2,7
G2	148	49,8
G3	136	45,8
N/A	5	1,7
Immunhistologische Subgruppe		
HR+/HER2-	138	46,5
HR-/HER2-	87	29,3
HER2+	72	24,2
Pathologische Komplettremission		
ypT0ypN0 (pCR)	62	20,9
Resterkrankung (RD)	235	79,1
Tumorgehalt der intermediären Biopsien		
iTu-	90	28,8
iTu+	207	71,2
Alter		
</= 60	254	85,5
> 60	43	14,5

Tabelle 4: Verteilung der immunhistologischen Tumorsubgruppen in den Studien

Immunhistologische Subgruppe	GeparQuattro	GeparQuinto	GeparSixto
HR+/HER2-	53	85	0
HR-/HER2-	19	43	25
HER2+	28	11	33

4.2. Tumorzellgehalt in intermediären Biopsien: Therapieansprechen und Überleben

4.2.1. Intermediärer Tumorzellgehalt: Korrelation mit histopathologischen Merkmalen

In 90 Fällen (30,3%) waren in der intermediären Biopsie keine Tumorzellen (iTu-) nachweisbar, in 207 Fällen (69,7%) konnten Tumorzellen in der intermediären Biopsie nachgewiesen werden (iTu+). iTu+ korrelierte mit dem Tumorstadium, am häufigsten konnte iTu+ im Stadium T2 nachgewiesen werden, wobei die Abwesenheit von Tumorzellen (iTu-) am häufigsten in T1 auftrat (Chi-Quadrat-Test: $p=0,015$). Es konnte zudem eine Tendenz beobachtet werden, dass mit steigendem Grading iTu+ seltener zu beobachten war, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Mantel-Haenszel-Test: $p=0,064$). Weiters kam iTu+ häufiger in der GeparQuinto-Studie vor (Chi-Quadrat-Test: $p<0,001$). Es konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen iTu+ und dem Lymphknotenbefall oder dem histologischen Typ dargestellt werden.

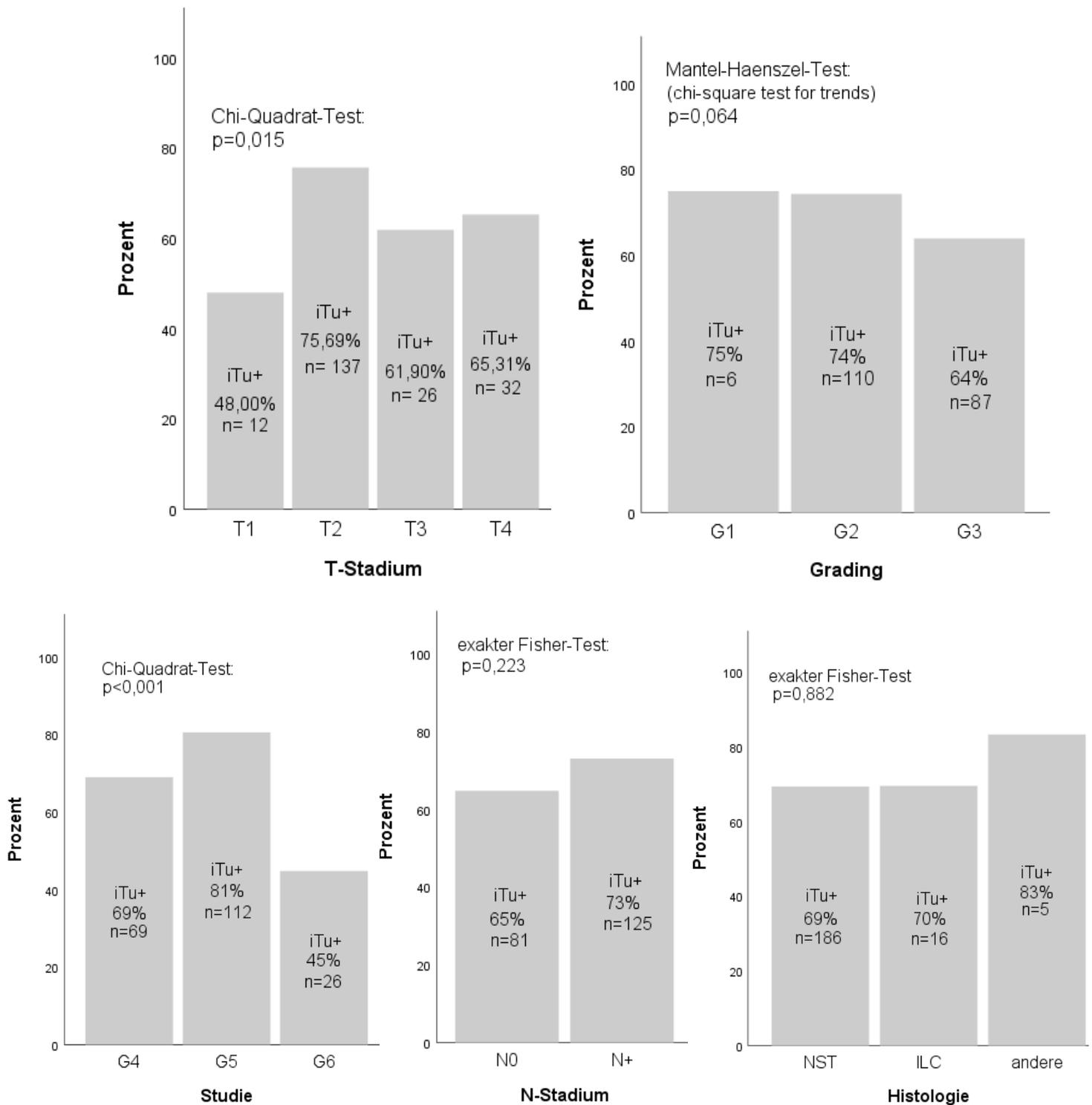


Abb. 6: Prozent und Anzahl von intermediären Biopsien, in denen Tumorzellen nachgewiesen werden konnten (iTU+) je histopathologisches Merkmal [Tumorstadium; Grading; Studie; Lymphknotenbefall: nodal-negativ (N0) oder nodal-positiv (N+); histologischer Typ: NST: invasives Karzinom vom nicht speziellen Typ; ILC: invasiv lobuläres Karzinom, andere histologische Typen.] iTu+ korrelierte mit dem Tumorstadium (Chi-Quadrat-Test: $p=0,015$) und trat häufiger in der GeparQuinto-Studie auf (Chi-Quadrat-Test: $p<0,001$).

4.2.2. Intermediärer Tumorzellgehalt: Untersuchung in den Tumorsubgruppen

Der Nachweis von Tumorzellen in der intermediären Biopsie (iTu+) korrelierte mit dem Tumorsubtyp (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$). Bei 84% (n=116) aus der Hormonrezeptor-positiven Subgruppe konnten in der intermediären Biopsie Tumorzellen (iTu+) gefunden werden. Diese Subgruppe zeigte somit die höchste Rate an iTu+ Fällen. In der triple-negativen Subgruppe zeigten 62% (n=54) iTu+. Am geringsten war die Rate an iTu+ in der HER2-positiven Subgruppe (51%; n=37).

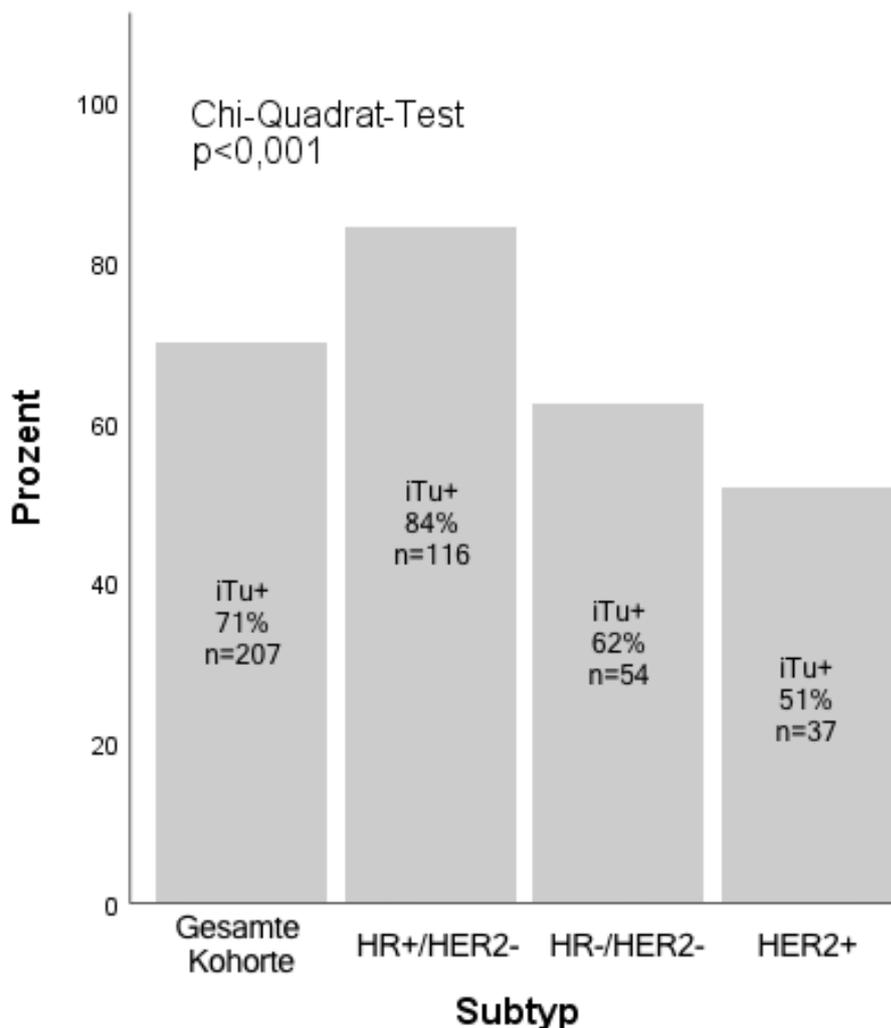


Abb. 7: Prozent und Anzahl von intermediären Biopsien, in denen Tumorzellen nachgewiesen werden konnten (iTu+) je Tumorsubgruppe (HR+/HER2-= Hormonrezeptor-positiver und HER2-negativer Subtyp; HR-/HER2-= triple-negativer Subtyp; HER2+= HER2-positiver Subtyp). iTu+ konnte häufiger im HR+/HER2-Subtyp nachgewiesen werden (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$).

4.2.3. Intermediärer Tumorzellgehalt: Vorhersagekraft für das Therapieansprechen

Waren Tumorzellen (iT_u+) in der intermediären Biopsie auffindbar, so korrelierte dies stark mit einer Resterkrankung (RD) nach neoadjuvanter Chemotherapie (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$), auch in den einzelnen Tumorsubgruppen war diese Korrelation signifikant. Waren keine Tumorzellen in der intermediären Biopsie nachweisbar (iT_u-), so zeigten 50% der Fälle eine pathologische Vollremission (pCR) und 50% eine RD nach Abschluss der neoadjuvanten Chemotherapie.

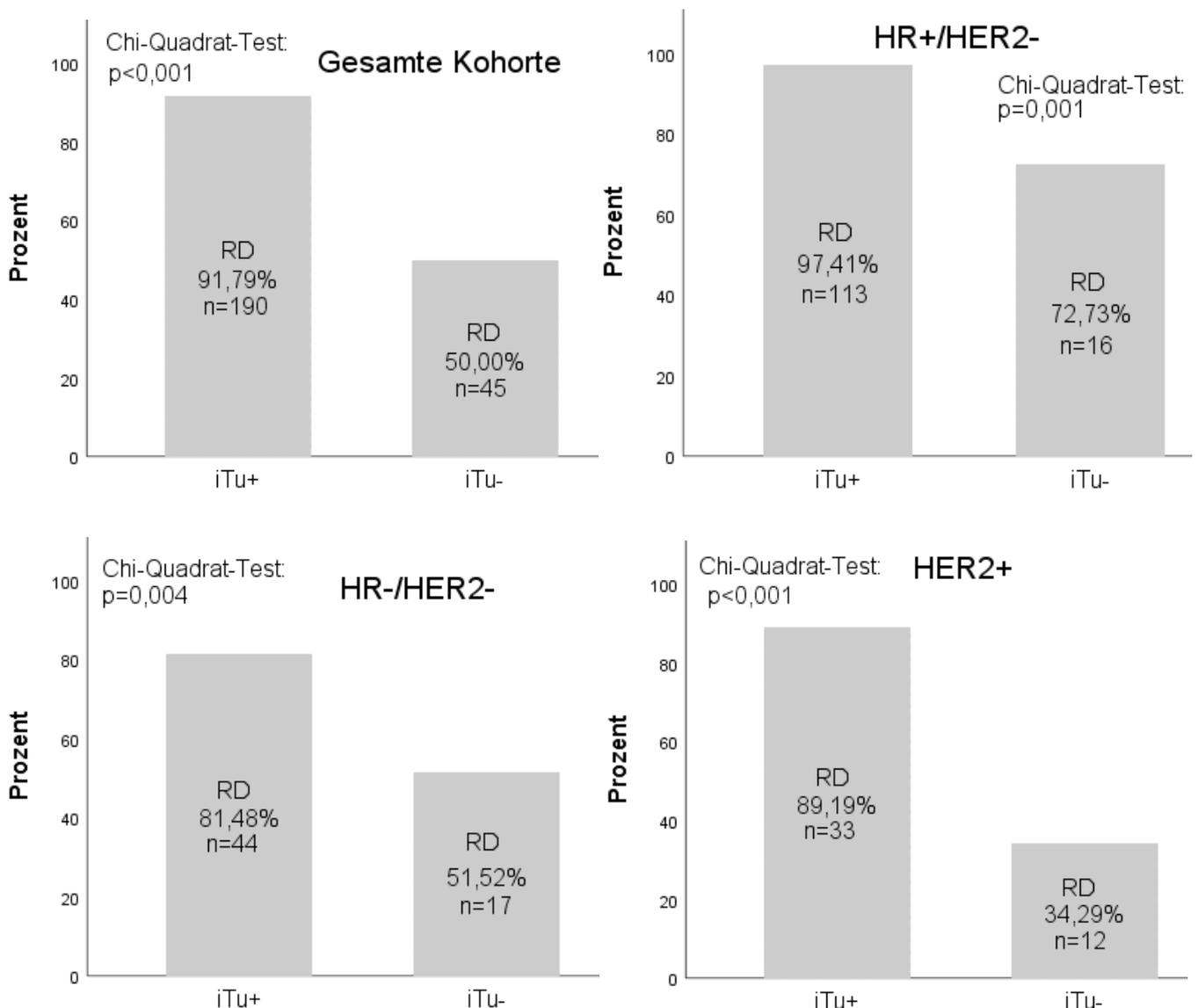


Abb. 8: Assoziation von einer Resterkrankung (RD) nach neoadjuvanter Chemotherapie mit dem Nachweis von Tumorzellen in der intermediären Biopsie (iT_u+), dargestellt in den Tumorsubgruppen. iT_u+ korrelierte mit RD (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$).

4.2.4. Intermediärer Tumorzellgehalt: Einfluss auf das Überleben

Daten zum krankheitsfreien Überleben (DFS) waren für alle Patientinnen verfügbar. Die Nachbeobachtungszeit betrug im Durchschnitt 52,2 Monate (0-126 Monate). 79 von 297 Frauen (25,3%) starben oder bekamen ein Rezidiv in der Nachbeobachtungszeit. Die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit bei Frauen, bei denen es zu keinem Ereignis kam, lag bei 59,3 Monaten (0-126,3 Monate).

Eine Abwesenheit von Tumorzellen in der intermediären Biopsie (iTu-) konnte in der triple-negativen Subgruppe ein verlängertes krankheitsfreies Überleben (DFS) vorhersagen (Log-Rank-Test: $p=0,04$). In der gesamten Kohorten, der HER2-positiven Subgruppe und der Hormonrezeptor-positiven Subgruppe konnte keine signifikante Korrelation des krankheitsfreien Überleben mit iTu-/iTU+ nachgewiesen werden.

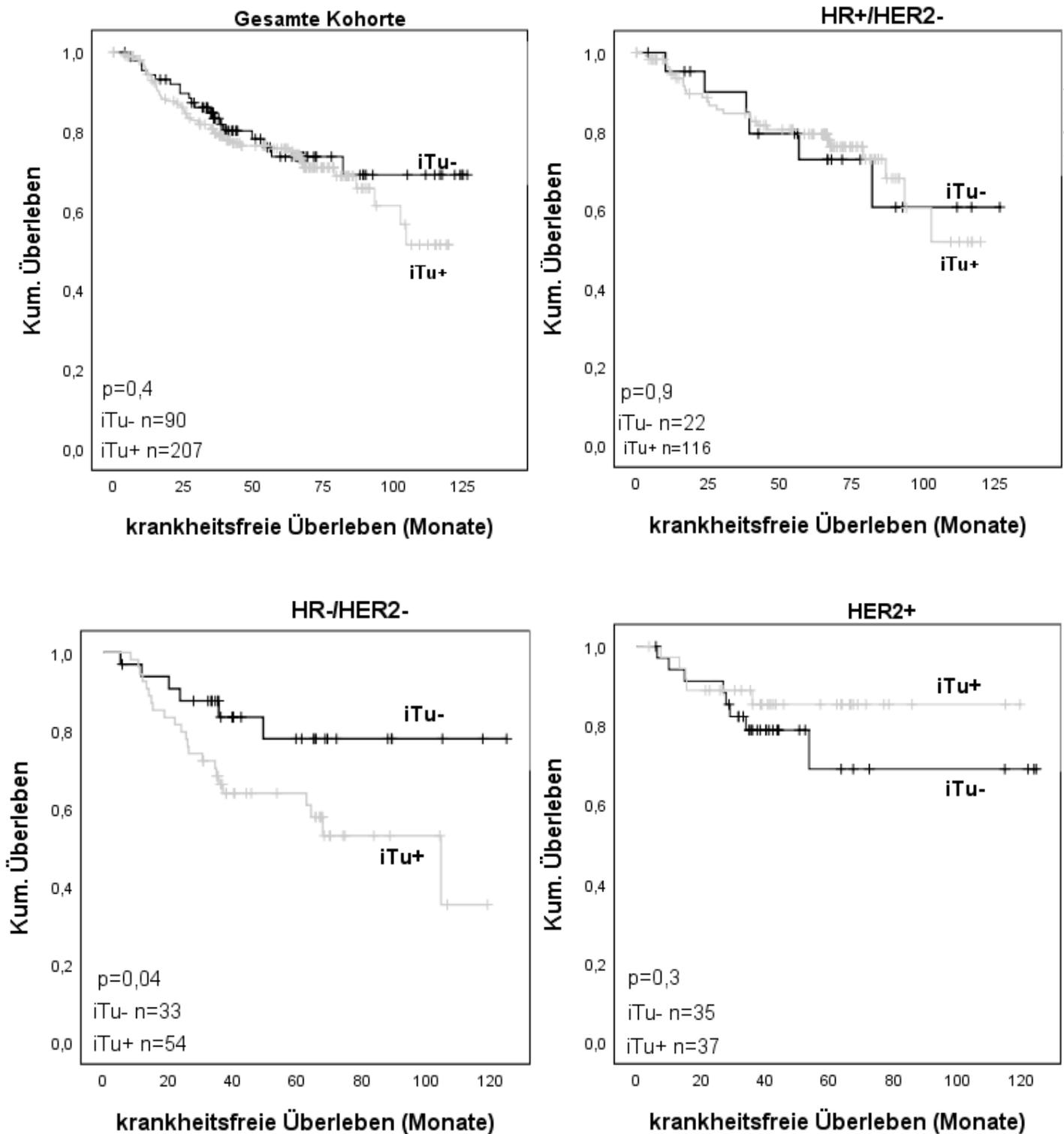


Abb. 9: Einfluss der Abwesenheit (iTU-) und des Nachweises von Tumorzellen in der intermediären Biopsie (iTU+) auf das krankheitsfreie Überleben, dargestellt als Kaplan-Meier-Analyse. Es erfolgte eine Analyse für die gesamte Kohorte und für die Tumorsubgruppen (HR+/HER2-= Hormonrezeptor-positive und HER2-negative Subgruppe; HR-/HER2-= triple-negative Subgruppe; HER2+= HER2-positive Subgruppe). iTU- korrelierte mit einem verbesserten krankheitsfreien Überleben in der triple-negativen Subgruppe (Log-Rank-Test: $p=0,04$)

4.3. Pathologische Komplettremission: Einfluss auf das Überleben

Zeigten Patientinnen eine pathologische Komplettremission (pCR) nach neoadjuvanter Chemotherapie, so war dies in der triple-negativen Subgruppe mit einem besseren Überleben assoziiert (Log-Rank-Test: $p=0,009$). In der gesamten Kohorte, der HER2-positiven Subgruppe und der Hormonrezeptor-positiven Subgruppe konnte keine signifikante Korrelation mit dem krankheitsfreien Überleben dargestellt werden.

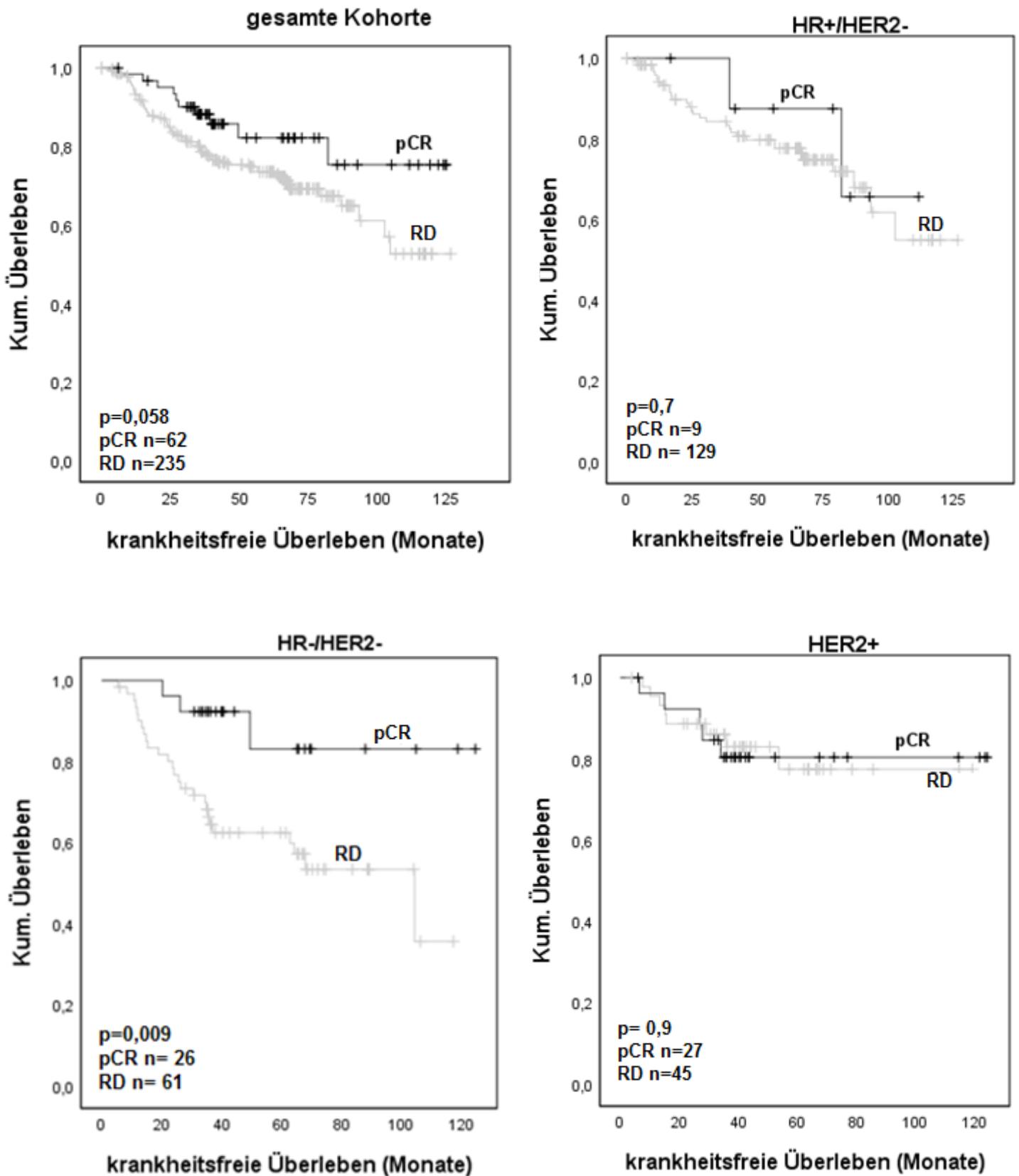


Abb. 10: Einfluss der pathologischen Komplettremission (pCR) auf das krankheitsfreie Überleben, dargestellt als Kaplan-Meier-Analyse. Es erfolgte eine Analyse für die gesamte Kohorte und für die Tumorsubgruppen (HR+/HER2-= Hormonrezeptor-positive und HER2-negative Subgruppe; HR-/HER2-= triple-negative Subgruppe; HER2+= HER2-positive Subgruppe). pCR korrelierte mit einem besseren krankheitsfreien Überleben in der triple-negativen Subgruppe (Log-Rank-Test: $p=0,009$).

4.4. Tumordinfiltrierende Lymphozyten: Therapieansprechen und Überleben

4.4.1. Tumordinfiltrierende Lymphozyten: deskriptive Statistik in der prätherapeutischen und intermediären Biopsie

Der durchschnittliche TIL-Wert in der prätherapeutischen Biopsie (TA) war 12,5%. 26 Biopsien (8,8%) zeigten in TA ein TIL-Wert von 0%. In der Gruppe, die nach Beendigung der Chemotherapie noch eine Resterkrankung (RD) aufwies, war der durchschnittliche TIL-Wert in TA 10,7%. In der Gruppe, die ein sehr gutes Ansprechen auf Chemotherapie in Form einer pathologischen Komplettremission zeigte, war der durchschnittliche TIL-Wert in TA 19,4%. In der triple-negativen Subgruppe betrug der durchschnittliche TIL-Wert in TA 17,3%, in der Hormonrezeptor-positiven Subgruppe 8,2% in der HER2-positiven Subgruppe 15,2%. Der durchschnittliche TIL-Wert in der intermediären Biopsie (TB) betrug 15,2%; Zehn Biopsien (4,9%) zeigten in TB einen TIL-Wert von 0%; der durchschnittliche TIL-Wert war 5% in der Gruppe, die eine Resterkrankung nach Chemotherapie zeigte und 19,1% in der Gruppe, die eine pathologische Komplettremission nach Chemotherapie zeigte. In der triple-negativen Subgruppe betrug der durchschnittliche TIL-Wert in TB 24,7%, in der Hormonrezeptor-positiven Gruppe 9,7% und in der HER2-positiven Gruppe 18,5%.

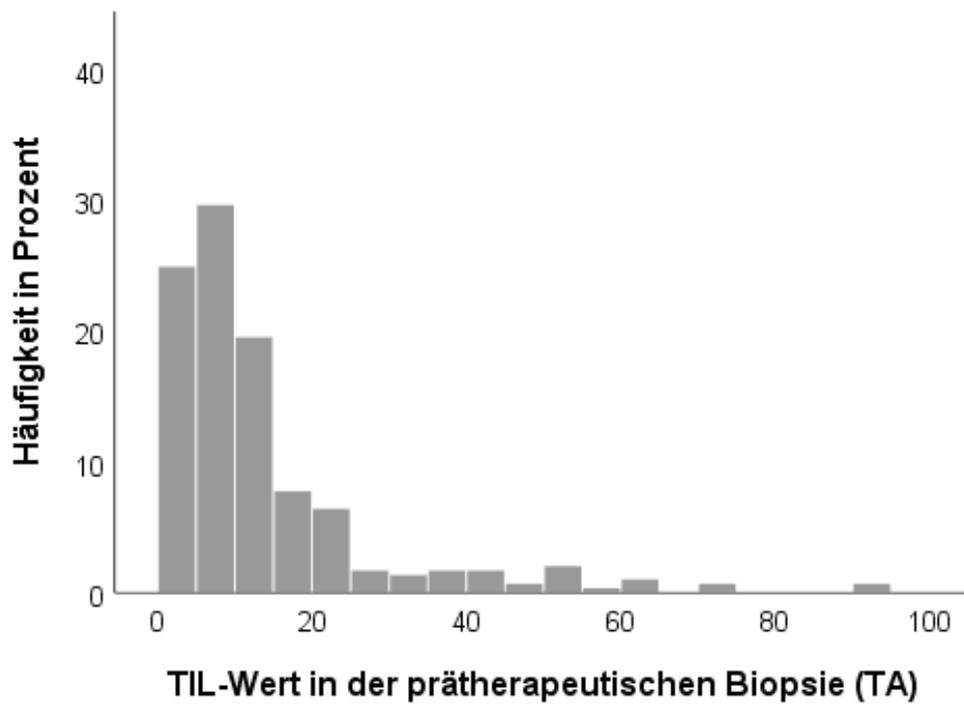


Abb. 11: Verteilung der Häufigkeit (in Prozent) eines TIL-Wertes in der prätherapeutischen Biopsie (TA)

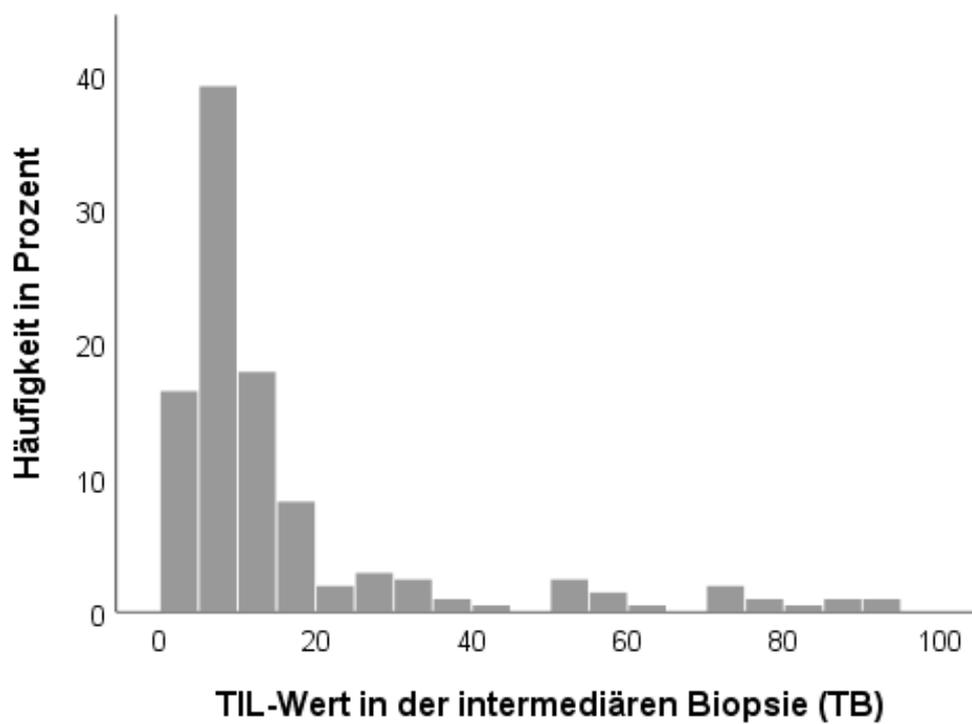


Abb. 12: Verteilung der Häufigkeit (in Prozent) eines TIL-Wertes in der intermediären Biopsie (TB)

4.4.2. Tumorerfiltrierende Lymphozyten: Vorhersagekraft für die pCR

Eine hohe Anzahl von TILs in der prätherapeutischen Biopsie (TA) und in der intermediären Stanze (TB) zeigte eine Tendenz eine pathologische Komplettremission (pCR) vorherzusagen, jedoch nur in wenigen Subtypen war diese Korrelation signifikant. In der triple-negativen Subgruppe zeigte eine hohe Anzahl von TILs in TB eine signifikante Korrelation mit pCR (Odds Ratio [OR]=1,35; 95%-Konfidenzintervall [KI]: 1,06-1,76; p=0,017). In der HER2-positiven Subgruppe konnte eine hohe Anzahl von TILs in TA eine pCR voraussagen (OR=1,39, 95%-KI: 1,02-1,97; p=0,047). Die Odds Ratio für eine gesteigerte pCR-Rate wurde pro 10% Veränderung im TIL-Wert berechnet.

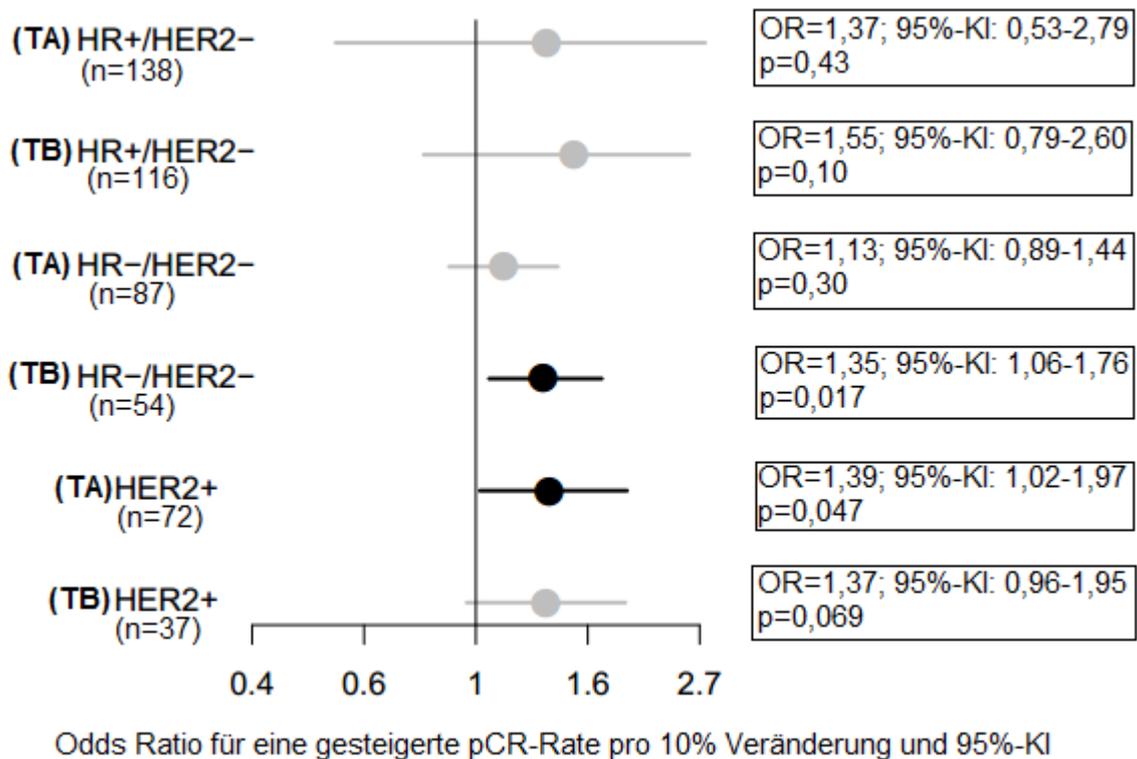


Abb. 13: Odds Ratio für die Vorhersagekraft des TIL-Wertes in der prätherapeutischen (TA) und in der intermediären Biopsie (TB) für pCR in der gesamten Kohorte und aufgeteilt nach Tumorsubgruppen (HR+/HER2-= Hormonrezeptor-positiv und HER2-negativ; HR-/HER2-= triple-negativ; HER2+= HER2-positiv). Ein hoher TIL-Wert in der triple-negativen Subgruppe in der intermediären Biopsie (OR=1,35; 95%-KI: 1,06-1,76; p=0,017) und ein hoher TIL-Wert in der HER2-positiven Subgruppe (OR=1,39; 95%-KI: 1,02-1,97, p=0,047) in der prätherapeutischen Biopsie korrelierte mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer pCR.

4.4.3. Tumorinfiltrierende Lymphozyten: Veränderung während neoadjuvanter Chemotherapie

Als Anstieg in TILs wurde ein Zuwachs des Wertes um 20% von TA zu TB definiert. Als Abfall wurde ein Rückgang des Wertes um 20% von TA zu TB definiert. Die Veränderung im TIL-Wert wurde nur bei Patientinnen berechnet, bei denen in TB ein Nachweis von Tumorzellen gelang. Bei den meisten Patientinnen zeigte sich keine relevante Veränderung im TIL-Wert [Δ TILs(TB-TA)] während neoadjuvanter Chemotherapie, insgesamt zeigte sich der TIL-Wert bei 86,5% (n=179) der Patientinnen unverändert. Ein Abfall in TILs konnte in 4,3% (n=9) beobachtet werden. Ein Anstieg im TIL-Wert zeigten 9,2% (n=19). Tabelle 5 zeigt die Verteilung in den Subgruppen. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen den Häufigkeiten der Veränderung und den Subgruppen gefunden werden (exakter Fisher-Test: p=0,082). Eine Veränderung des TIL-Wertes während neoadjuvanter Chemotherapie korrelierte mit dem Tumorstadium, so kam ein Anstieg in TILs häufiger im Stadium T1 vor (exakter Fisher-Test: p=0,006). Weiters konnte auch eine signifikante Korrelation mit dem Grading dargestellt werden, je höher das Grading, desto wahrscheinlicher war ein Anstieg in TILs (Mantel-Haenszel-Test: p=0,016). Zudem wiesen nodal-negative Patientinnen häufiger einen TIL-Anstieg auf (exakter Fisher-Test: p=0,012). Das Δ TILs(TB-TA) war nicht mit dem histologischen Typ assoziiert (exakter Fisher-Test: p=0,205).

Tabelle 5: Verteilung der TIL-Veränderung in den Tumorsubgruppen (Angabe in absoluten Häufigkeiten und proportional zur gesamten Subgruppe). Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen den Subgruppen und der Veränderung des TIL-Werts unter Chemotherapie (exakter Fisher-Test: p=0,082)

Tumorsubgruppe	Abfall	Keine Veränderung	Anstieg
Gesamte Kohorte	9 (4,3%)	179 (86,5%)	19 (9,2%)
HR+/HER2-	3 (2,6%)	106 (91,4%)	7 (6,0%)
HR-/HER2-	4 (7,4%)	41(75,9%)	9(16,7%)
HER2+	2 (5,4%)	32 (86,5%)	3 (8,1%)

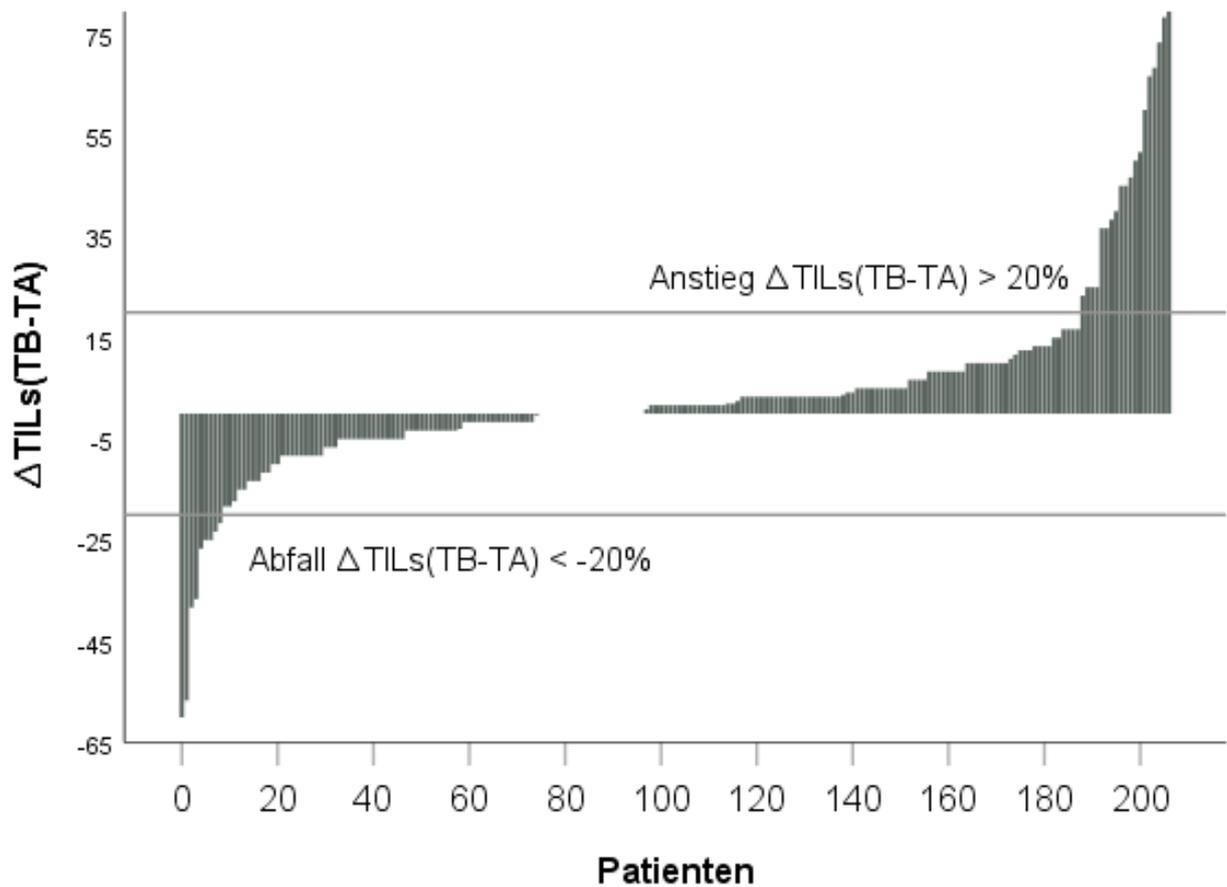


Abb. 14: Darstellung der Veränderung des TIL-Wertes [$\Delta TILs(TB-TA)$] für jede Patientin als Wasserfalldiagramm. Es wurden die Grenzwerte für den Anstieg [$\Delta TILs(TB-TA) > 20\%$] und den Abfall [$\Delta TILs(TB-TA) < -20\%$] eingezeichnet.

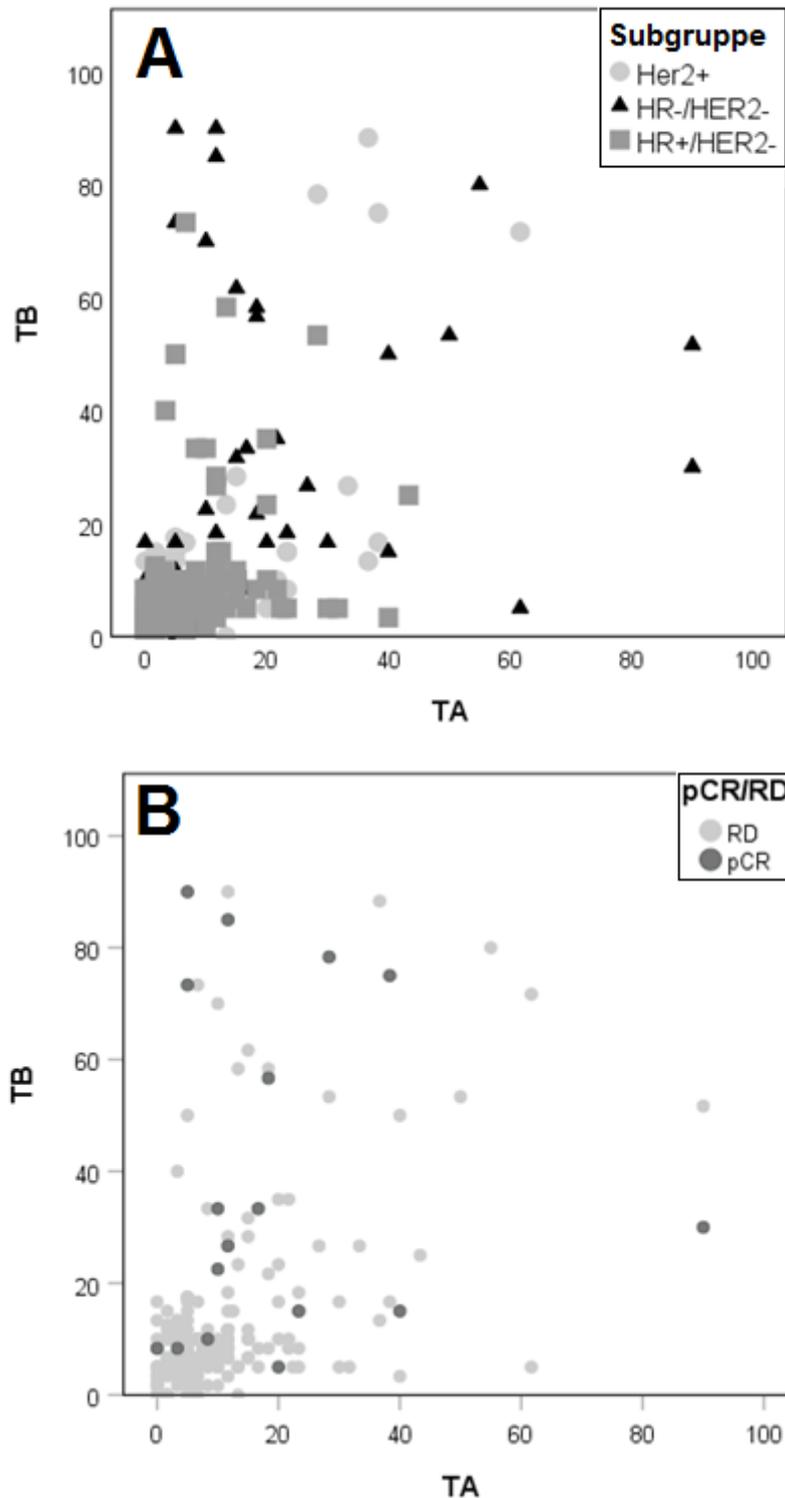
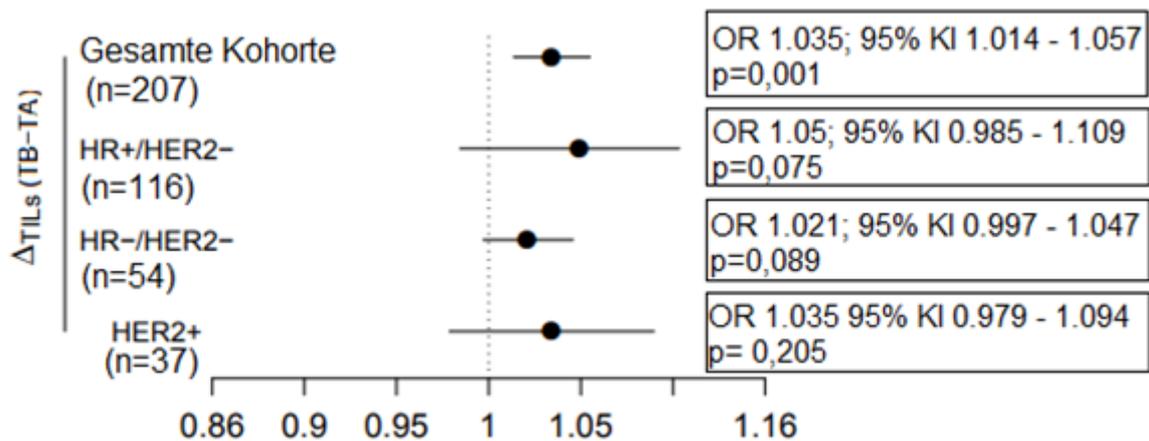


Abb. 15: Veränderung des TIL-Wertes jeder Patientin als Streudiagramm. Der TIL-Wert jeder Patientin aus der prätherapeutischen Biopsie (x-Achse: TA) ist gegenüber dem TIL-Wert aus der intermediären Biopsie (y-Achse: TB) dargestellt. In Diagramm **A** sind Patientinnen je nach Tumorsubgruppe markiert. In Diagramm **B** sind Patientinnen markiert, je nachdem ob eine pathologische Komplettremission (pCR) oder eine Resterkrankung (RD) nach neoadjuvanter Chemotherapie bestanden hat.

4.4.4. TIL-Veränderung: Vorhersagekraft für die pCR

Zeigte sich ein Anstieg der TILs von der prätherapeutischen zur intermediären Biopsie [Δ TILs(TB-TA)], so korrelierte dies mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eine pathologische Komplettremission zu erreichen (OR=1.035; 95%-KI: 1.014 - 1.057; $p=0,001$). In den einzelnen Subgruppen ist diese Korrelation nicht mehr signifikant. Für die Hormonrezeptor-positive Subgruppe beträgt die OR 1.05 (95%-KI: 0.985 - 1.109; $p=0,075$), für die triple-negative Subgruppe OR 1.021 (95%-KI: 0.997 - 1.047; $p=0,089$) und für die HER2-positive Subgruppe beträgt die OR 1.035 (95%-KI: 0.979 - 1.094; $p=0,205$). Die Odds Ratio für eine gesteigerte pCR-Rate wurde pro 1% Veränderung im TIL-Wert berechnet.



Odds Ratio für eine gesteigerte pCR-Rate pro 1% Veränderung und 95% KI

Abb. 16: Odds Ratio für die Vorhersagekraft des Δ TILs(TB-TA) für pCR in der gesamten Kohorte und aufgeteilt in Tumorsubgruppen (HR+/HER2-= Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ; HR-/HER2-= triple-negativ; HER2+= HER2-positiv). Ein Anstieg in TILs korrelierte mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eine pCR zu erreichen (OR=1.035; 95%-KI: 1.014 - 1.057; $p=0,001$).

4.4.5. TIL-Veränderung: Einfluss auf das Überleben

In der univariaten Überlebensanalyse des Einflusses des Δ TILs(TB-TA) auf das krankheitsfreie Überleben, konnte keine signifikante Hazard Ratio für das gesamte Patientenkollektiv berechnet werden (HR=0.986; 95%-KI: 0.969 - 1.003; p=0,111). In der Subgruppen-Analyse konnte jedoch in der triple-negativen Subgruppe der Anstieg von TILs ein verlängertes krankheitsfreies Überleben vorhersagen (HR=0.98; 95%-KI: 0.963 - 0.997; p=0,024). In der Hormonrezeptor-positiven, HER2-negativen Subgruppe (HR=1.007; 95%-KI: 0.97 - 1.044; p= 0,719) und in der HER2-positiven Subgruppe (HR=0.987; 95%-KI: 0.934 - 1.043; p= 0,643) konnte keine signifikante Korrelation gezeigt werden. Die Hazard Ratio für Tod oder Rezidiv wurde pro 1% Veränderung im TIL-Wert berechnet.

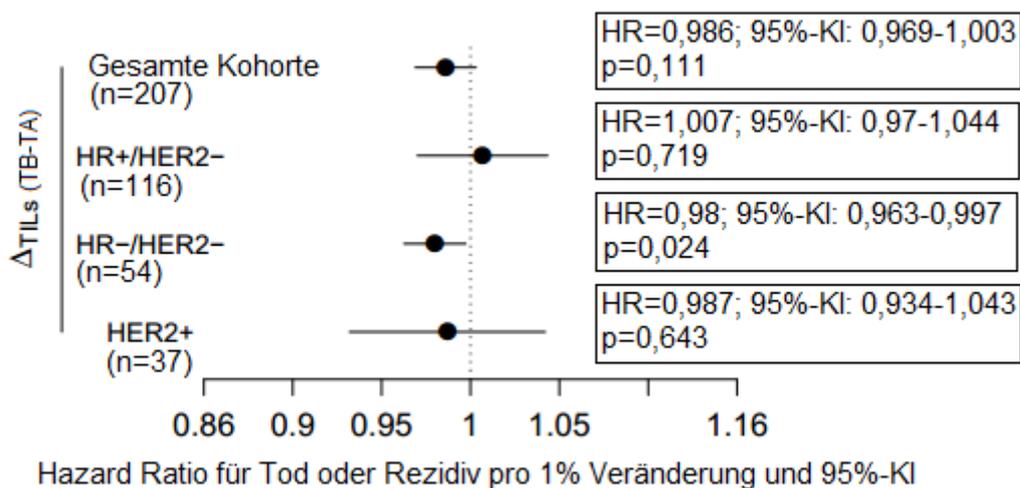


Abb. 17: Hazard Ratio für Tod oder Rezidiv (HR) des Δ TILs(TB-TA) in der gesamten Kohorte und aufgeteilt in Tumorsubgruppen (HR+/HER2-= Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ; HR-/HER2-= triple-negativ; HER2+= HER2-positiv). In der triple-negativen Kohorte konnte ein Anstieg in TILs ein verlängertes krankheitsfreies Überleben vorhersagen (HR=0.98; 95%-KI: 0.963 - 0.997; p=0,024).

4.5. Ki-67: Therapieansprechen und Überleben

4.5.1. Ki-67: deskriptive Statistik in der prätherapeutischen und intermediären Biopsie

Der Mittelwert der Anzahl der ausgewerteten Zellen für die prätherapeutische Biopsie (TA) betrug 1095 Zellen (120-2899 Zellen). Elf Fälle (3,7%) zeigten in der prätherapeutischen Biopsie (TA) keine Expression von Ki-67. In TA war der durchschnittliche Ki-67-Wert 17,9%. In der Gruppe, die nach Beendigung der Chemotherapie eine Resterkrankung (RD) zeigte, war der durchschnittliche Ki-67-Wert 17,6%. In der Gruppe, die eine pathologische Komplettremission (pCR) zeigte, war der durchschnittliche Ki-67-Wert 19,2%. In der triple-negativen Subgruppe betrug der durchschnittliche Ki-67-Index in TA 28,6%, in der Hormonrezeptor-positiven und HER2-negativen Gruppe 12,1%, in der HER2-positiven Gruppe 20,0%.

Der Mittelwert der Anzahl der ausgewerteten Zellen für die intermediäre Biopsie (TB) betrug 829 Zellen (71-3096 Zellen). In der intermediären Biopsie (TB) war der durchschnittliche Ki-67-Wert 5,8%. In TB zeigten 10,4% (23 Fälle) keine Expression von Ki-67. In der Gruppe, die nach Beendigung der Chemotherapie eine Resterkrankung (RD) zeigte, lag der durchschnittliche Ki-67-Wert bei 5,2%. In der Gruppe, die eine pathologische Komplettremission (pCR) zeigte, war der durchschnittliche Ki-67-Wert 5%. In der Hormonrezeptor-positiven und HER2-negativen Subgruppe betrug der durchschnittliche Ki-67-Index in TB 6,1%, in der triple-negativen Subgruppe 14,6%, in der HER2-positiven Subgruppe 6,3%.

Teilte man die Fälle in die von der S3-Leitlinie Mammakarzinom empfohlenen Gruppen des Ki-67-Index, so erhielt man folgende Verteilung für TA: niedrig (Ki-67-Index <10%): 33,0% (n= 98); intermediär (Ki-67-Index: 10-25%): 35,7% (n= 106); hoch (Ki-67-Index >25%): 31,3% (n= 93). Für TB zeigte sich eine deutliche Umverteilung zur niedrigen Ki-67-Gruppe.

Es zeigte sich folgende Verteilung: niedrig: 75,4% (157 Fälle); intermediär: 15,0% (31 Fälle); hoch: 9,2% (19 Fälle).

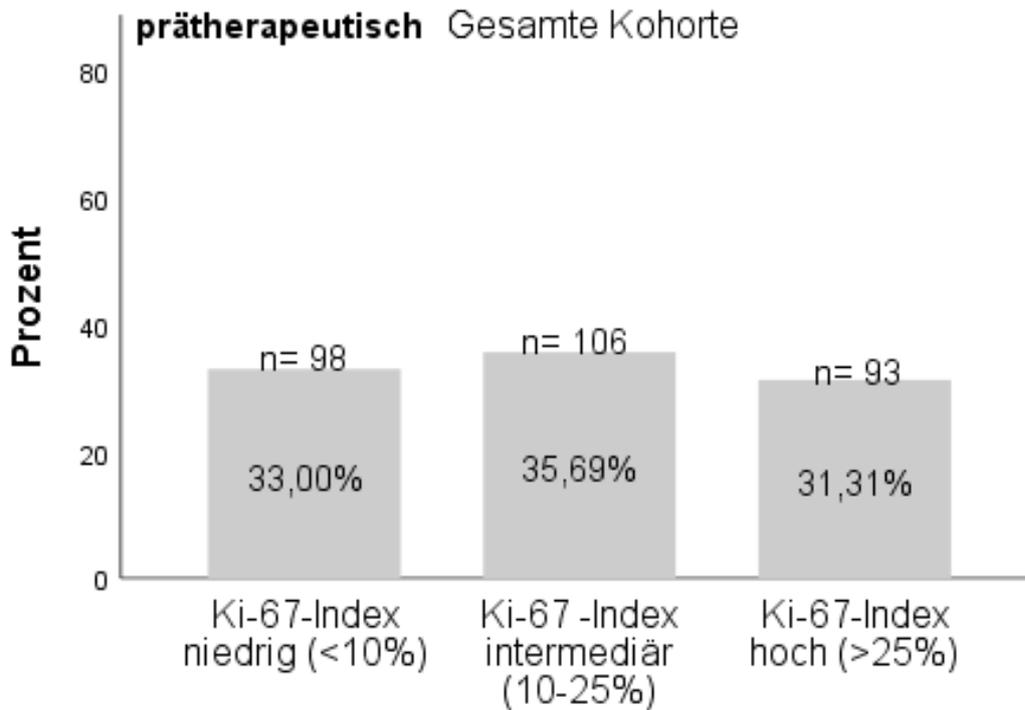


Abb. 18: Verteilung der Patientinnen der gesamten Kohorte in den Gruppen des Ki-67-Index in der prätherapeutischen Biopsie (TA): niedrig (Ki-67-Index <10%), intermediär (Ki-67-Index: 10-25%) und hoch (Ki-67-Index >25%)

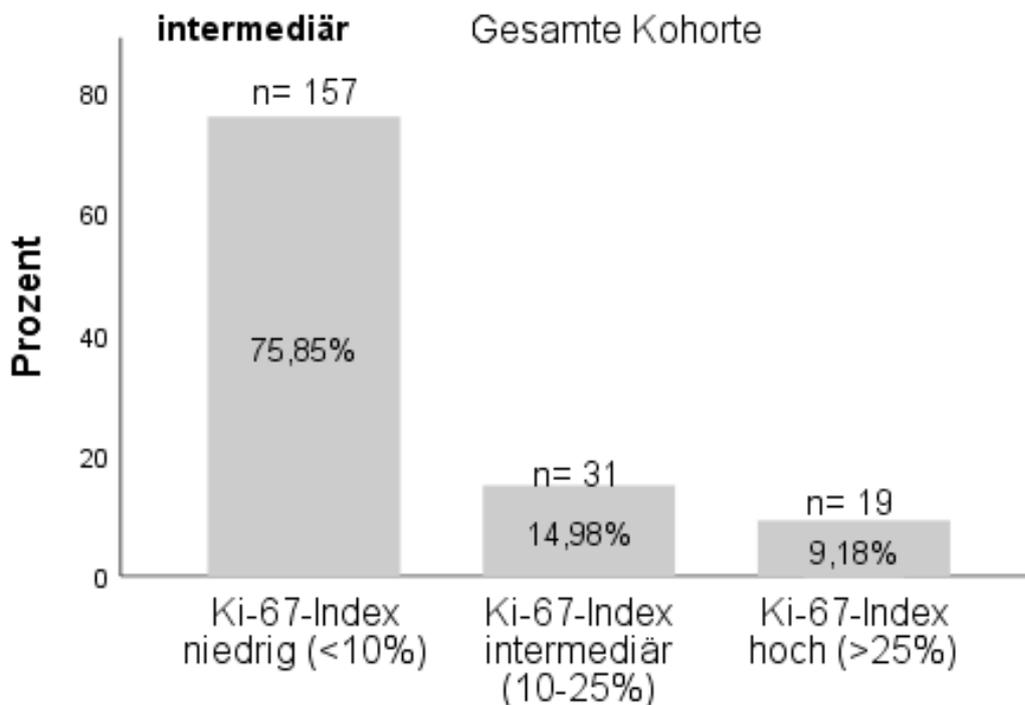


Abb. 19: Verteilung der Patientinnen der gesamten Kohorte in Gruppen des Ki-67-Index in der intermediären Biopsie (TB): niedrig (Ki-67-Index <10%), intermediär (Ki-67-Index: 10-25%) und hoch (Ki-67-Index >25%)

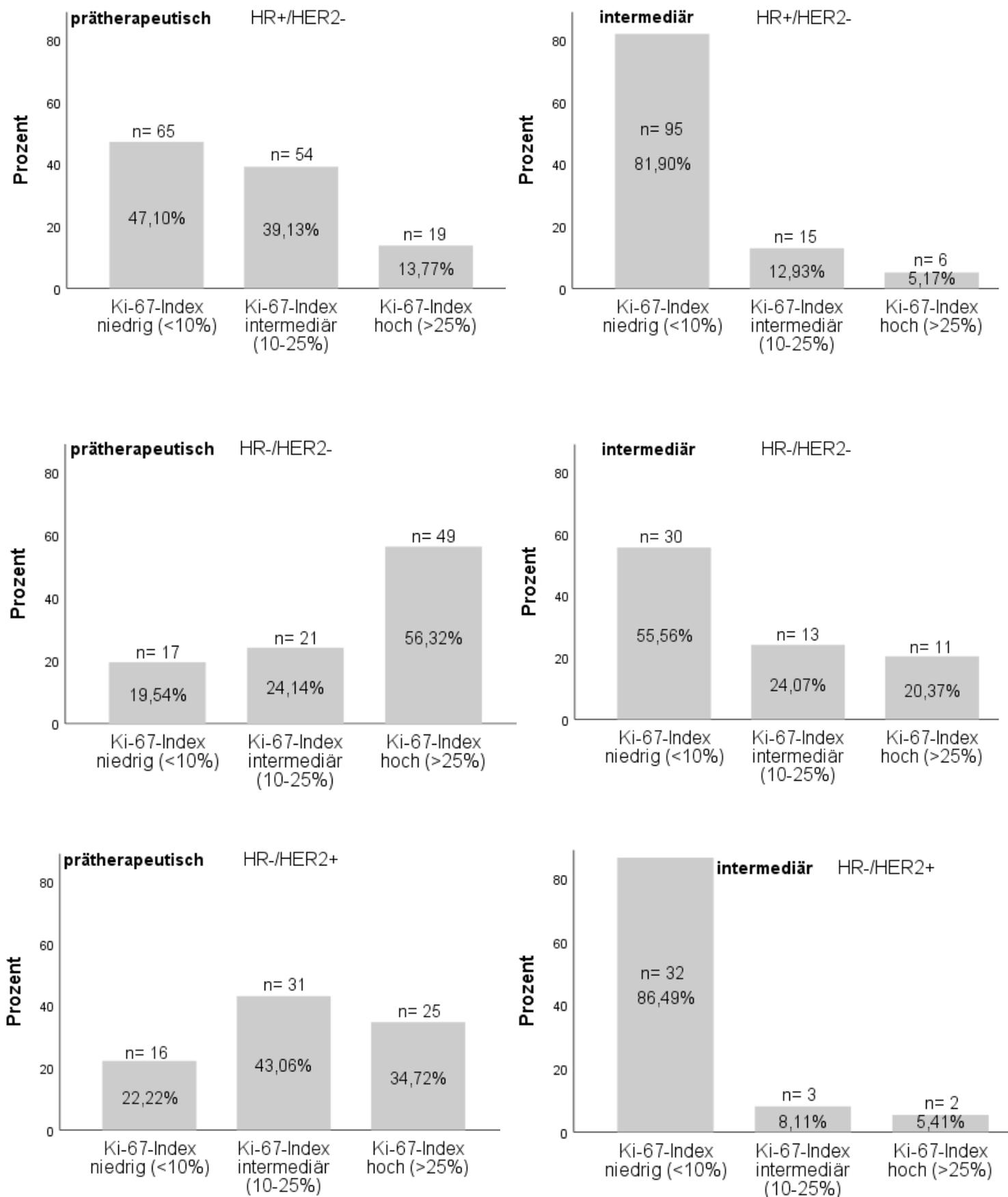


Abb. 20: Gegenüberstellung der Verteilung der Patientinnen in Gruppen des Ki-67-Index in der prätherapeutischen und intermediären Biopsie, aufgeteilt nach Tumorsubgruppen (HR+/HER2- = Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ; HR-/HER2- = triple-negativ; HER2+ = HER2-positiv).

4.5.2. Ki-67: Vorhersagekraft für die pCR

Eine signifikante Korrelation von Ki-67 mit pCR konnte nur in der Hormonrezeptor-positiven Subgruppe in der prätherapeutischen Biopsie gesehen werden. Eine hohe Ki-67-Expression war mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer pCR assoziiert (OR=1.06; 95%-KI: 1,00-1,11; p=0,039). In den restlichen Subgruppen zeigte sich keine signifikante Korrelation. Die Odds Ratio für eine gesteigerte pCR-Rate wurde pro 1% Veränderung im Ki-67-Index berechnet.

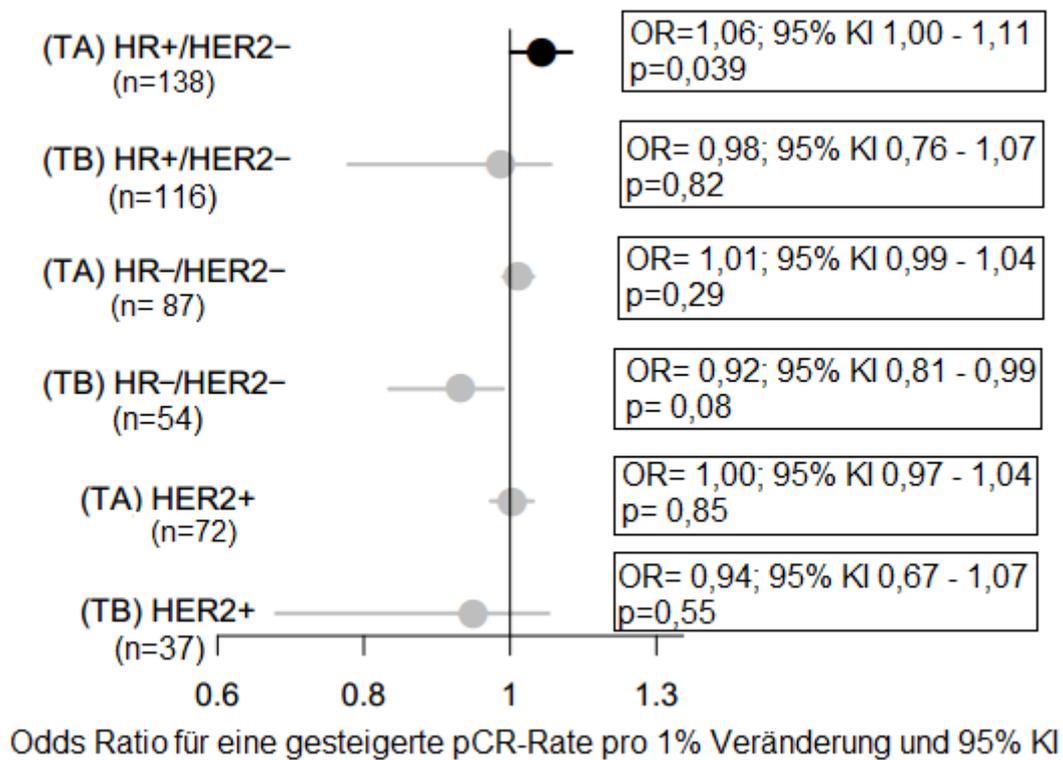


Abb. 21: Odds Ratio für die Vorhersagekraft des Ki-67-Index in der prätherapeutischen (TA) und in der intermediären Biopsie (TB) für pCR in der gesamten Kohorte und aufgeteilt in Tumorsubgruppen (HR+/HER2-= Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ; HR-/HER2-= triple-negativ; HER2+= HER2-positiv). Ein hoher Ki-67-Index in der Hormonrezeptor-positiven Subgruppe in der prätherapeutischen Biopsie korrelierte mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eine pCR zu erreichen (OR=1.06; 95%-KI: 1,00-1,11; p=0,039).

4.5.3. Ki-67: Veränderung während neoadjuvanter Chemotherapie

Als Anstieg im Ki-67-Index wurde ein Zuwachs des Wertes um 20% von TA zu TB definiert. Als Abfall wurde ein Rückgang des Wertes um 20% von TA zu TB festgelegt. Bei den meisten Patienten konnte keine relevante Veränderung des Ki-67-Index [Δ Ki-67(TB-TA)] während der neoadjuvanten Chemotherapie beobachtet werden. 75,4% (n=156) der Patientinnen zeigten keine Veränderung im Ki-67-Index. Ein Abfall in der Ki-67-Expression konnte bei 22,2% (n=46) festgestellt werden. Ein Anstieg konnte in 2,4% (n=5) nachgewiesen werden. In Tabelle 6 ist die Verteilung in den Subgruppen dargestellt. In der Hormonrezeptor-positiven Subgruppe (HR+/HER2-) blieb der Ki-67-Index häufiger unverändert als in den anderen Subgruppen (exakter Fisher-Test: $p < 0,001$). Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Veränderung des Ki-67-Index und dem T-Stadium (exakter Fisher-Test: $p = 0,222$), N-Stadium (exakter Fisher-Test: $p = 0,264$), histologischen Typ (exakter Fisher-Test: $p = 0,118$) und Grading (exakter Fisher-Test: $p = 0,153$) gezeigt werden.

Tabelle 6: Verteilung der Ki-67-Veränderung [Δ Ki-67(TB-TA)] in den Tumorsubgruppen (Angabe in absoluten Häufigkeiten und proportional zur entsprechenden Subgruppe). In der Hormonrezeptor-positiven Subgruppe (HR+/HER2-) blieb der Ki-67-Index häufiger unverändert während neoadjuvanter Chemotherapie (exakter Fisher-Test: $p < 0,001$).

Subgruppe	Abfall	Stabiler Wert	Anstieg
HR+/HER2-	12 (10,3%)	104 (89,7%)	0 (0%)
HR-/HER2-	20 (37,0%)	30 (55,6%)	4 (7,4%)
HER2+	14 (37,8%)	22 (59,5%)	1 (2,7%)

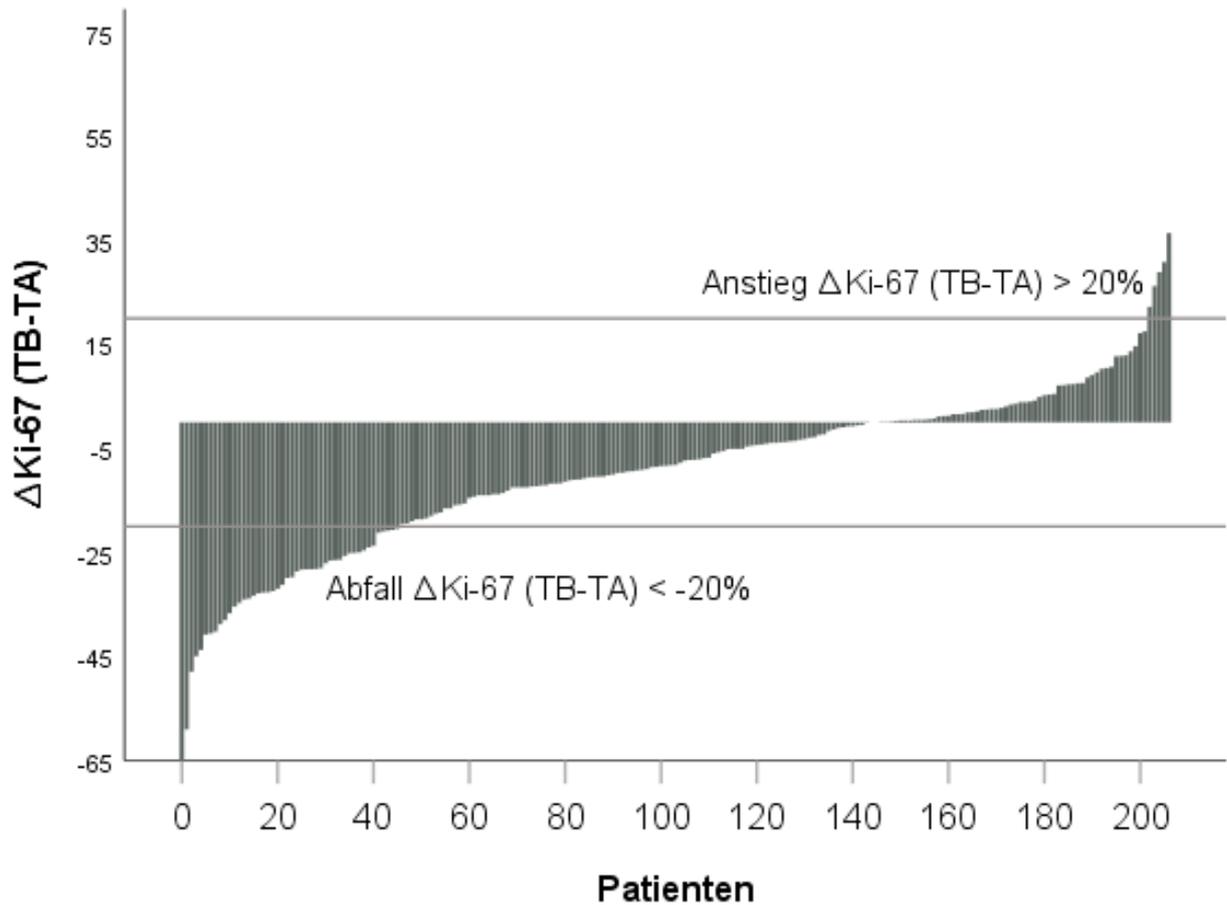


Abb. 22: Darstellung der Veränderung des Ki-67-Index [$\Delta\text{Ki-67(TB-TA)}$] für jede Patientin als Wasserfalldiagramm. Es wurden die Grenzwerte für den Anstieg [$\Delta\text{Ki-67(TB-TA)} > 20\%$] und den Abfall [$\Delta\text{Ki-67(TB-TA)} < -20\%$] eingezeichnet.

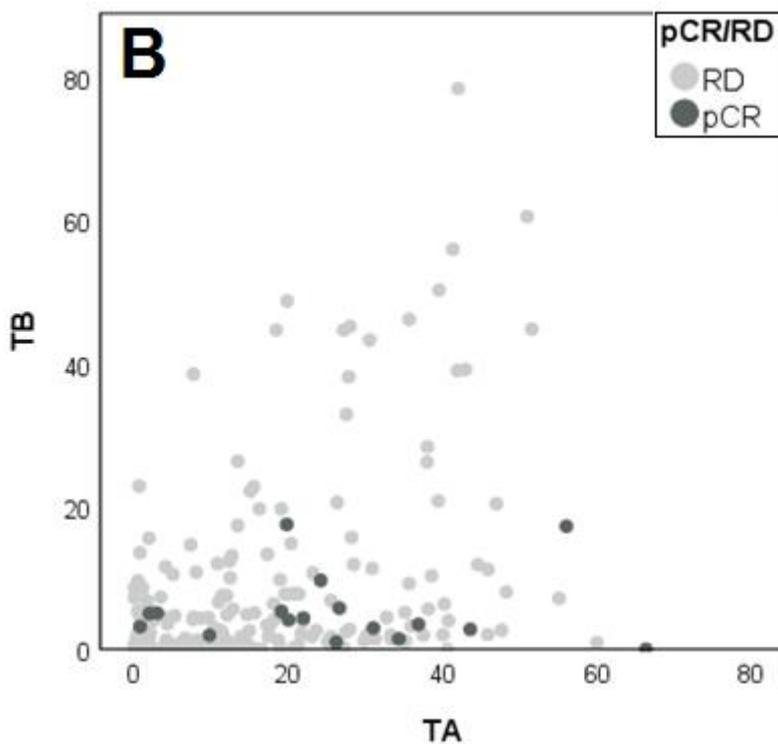
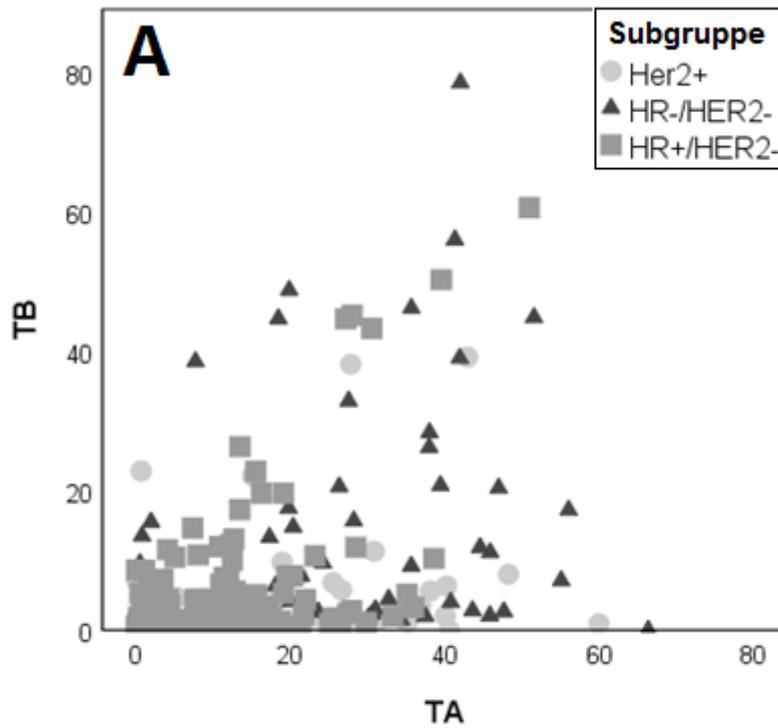


Abb. 23: Veränderung des Ki-67-Index jeder Patientin als Streudiagramm. Der Ki-67-Index aus der prätherapeutischen Biopsie (x-Achse: TA) ist gegenüber dem Ki-67-Index aus der intermediären Biopsie (y-Achse: TB) dargestellt; in Diagramm **A** sind Patientinnen je nach Tumorsubgruppe markiert. In Diagramm **B** sind Patientinnen markiert, je nachdem ob eine pathologische Komplettremission (pCR) oder eine Resterkrankung (RD) nach neoadjuvanter Chemotherapie bestanden hat.

4.5.4. Ki-67-Veränderung: Vorhersagekraft für die pCR

Ein Anstieg in der Ki-67-Expression war assoziiert mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit nach Beendigung der Chemotherapie eine pCR zu erreichen (OR=0.957; 95%-KI: 0.928 - 0.986; p=0,004). In den einzelnen Subgruppen war diese Korrelation nicht signifikant. Für die Hormonrezeptor-positive Subgruppe betrug die OR 0.969 (95%-KI: 0.874 - 1.082; p=0,546), für die triple-negative Subgruppe betrug die OR 0.967 (95%-KI: 0.928 - 1.001; p=0,073) und für die HER2-positive Subgruppe betrug die OR 0.992 (95%-KI: 0.929 - 1.058; p=0,805). Die Odds Ratio für eine gesteigerte pCR-Rate wurde pro 1% Veränderung im Ki-67-Index berechnet.

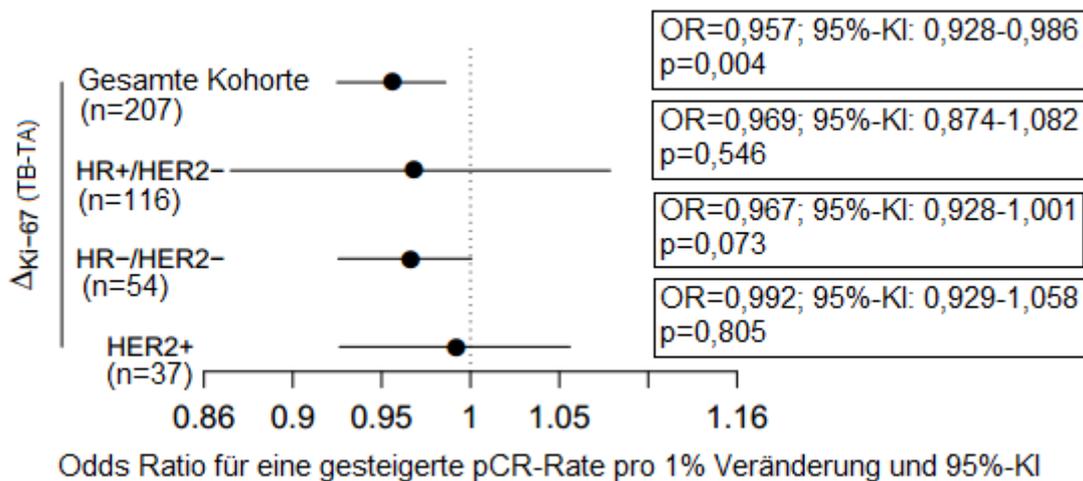


Abb. 24: Odds Ratio für die Vorhersagekraft des Δ Ki-67(TB-TA) für pCR in der gesamten Kohorte und aufgeteilt in den Tumorsubgruppen (HR+/HER2-= Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ; HR-/HER2-= triple-negativ; HER2+= HER2-positiv). Ein Anstieg im Ki-67-Index war mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit eine pCR zu erreichen assoziiert (OR=0.957; 95%-KI: 0.928 - 0.986; p=0,004).

4.5.5. Ki-67-Veränderung: Einfluss auf das Überleben

In der univariaten Überlebensanalyse des Einflusses des Δ Ki-67(TB-TA) auf das krankheitsfreie Überleben, konnte keine signifikante Korrelation für das gesamte Patientenkollektiv gezeigt werden (HR=1.012; 95%-KI: 0.992 - 1.032; p=0,245). In der Subgruppen-Analyse, konnte jedoch in der triple-negativen Subgruppe der Anstieg des Ki-67-Index ein schlechteres krankheitsfreies Überleben vorhersagen (HR=1.024; 95%-KI; 1.001 - 1.047; p=0,040). In der Hormonrezeptor-positiven Subgruppe (HR=0.992; 95%-KI: 0.954 - 1.033; p= 0,705) und in der HER2-positiven Subgruppe (HR=0.992; 95%-KI: 0.935 - 1.052; p= 0,783) konnte keine signifikante Korrelation gezeigt werden. Die Hazard Ratio für Tod oder Rezidiv wurde pro 1% Veränderung im Ki-67-Index berechnet.

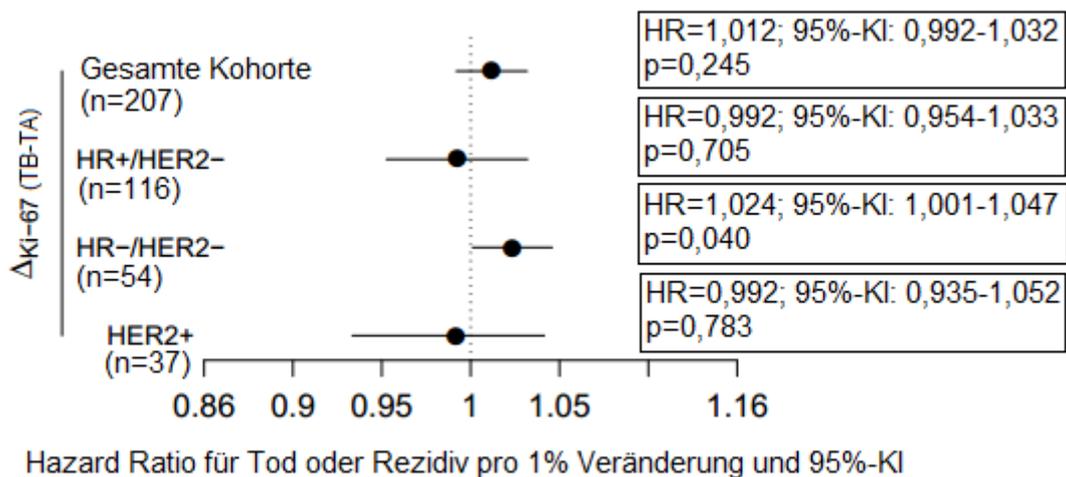


Abb. 25: Hazard Ratio für Tod oder Rezidiv (HR) des Δ Ki-67(TB-TA) in der gesamten Kohorte und aufgeteilt in Tumorsubgruppen (HR+/HER2-= Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ; HR-/HER2-= triple-negativ; HER2+= HER2-positiv). In der triple-negativen Subgruppe sagte ein Anstieg des Ki-67-Index während neoadjuvanter Chemotherapie ein schlechteres krankheitsfreies Überleben vorher (HR=1.024; 95%-KI: 1.001 - 1.047; p=0,040).

4.6. Zusammenhang der Veränderungen des TIL-Wertes und des Ki-67-Index während neoadjuvanter Chemotherapie

Tabelle 9 stellt die Veränderungen in TILs und Ki-67 während neoadjuvanter Chemotherapie gegenüber. Es gab keine signifikante Korrelation zwischen den Veränderungen der Parameter während neoadjuvanter Chemotherapie (exakter Fisher-Test: $p=0,174$).

Tabelle 7: Das Δ TILs(TB-TA) und Δ Ki-67(TB-TA) im Vergleich. Es gibt keine signifikante Korrelation zwischen der Veränderung im TIL-Wert und Ki-67-Index während neoadjuvanter Chemotherapie (exakter Fisher-Test: $p=0,174$).

	Δ TILs: Abfall	Δ TILs: Keine Veränderung	Δ TILs: Anstieg
Δ Ki-67: Abfall	3	35	8
Δ Ki-67: Keine Veränderung	6	139	11
Δ Ki-67: Anstieg	0	5	0

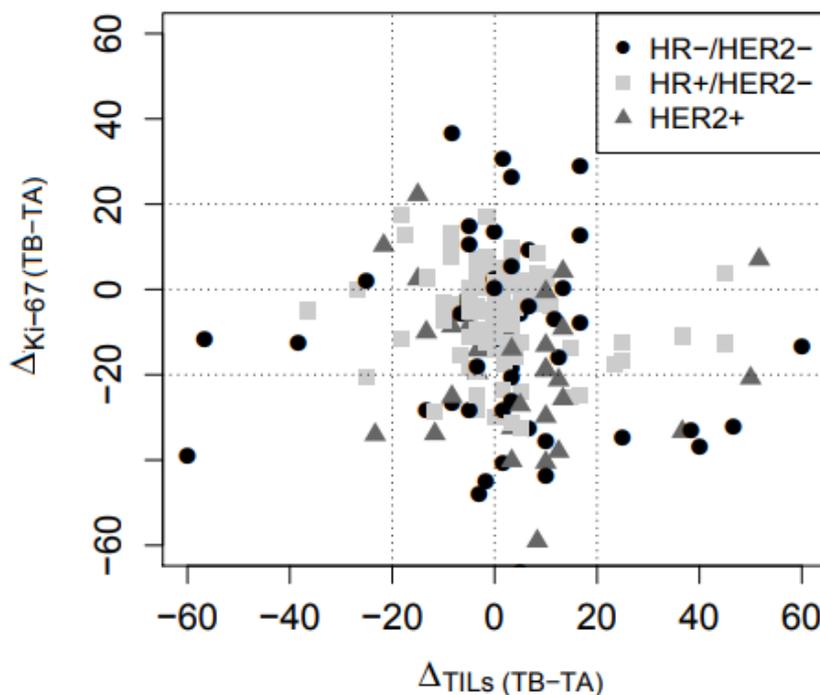


Abb. 26: Gegenüberstellung des Δ TILs(TB-TA) (x-Achse) und des Δ Ki-67(TB-TA) (y-Achse) jeder Patientin. Patientinnen sind nach zugehöriger Tumorsubgruppe markiert.

5. Diskussion

5.1. Der Nachweis von Tumorzellen in der intermediären Biopsie als negativer Responsemarker

Der Nachweis von Tumorzellen in der intermediären Biopsie (iT_u+) korrelierte stark mit einer Resterkrankung nach Chemotherapie (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$). 92% der Patientinnen, bei denen in der intermediären Biopsie Tumorzellen nachweisbar waren, zeigten auch nach Beendigung der neoadjuvanten Chemotherapie (NACT) eine Resterkrankung (RD). Der Nachweis von iT_u+ könnte daher, unter der Voraussetzung einer standardisierten Probenentnahme, als ein Mittel dienen, Patienten, die nicht auf Chemotherapie ansprechen, schon während der Chemotherapie zu identifizieren.

In 28,8% (90 Fälle) konnten in der intermediären Biopsie keine invasiven Tumorzellen (iT_u-) gefunden werden. Die Gruppe die iT_u- aufwies, wies zu 50% eine pathologische Komplettremission (pCR) auf und zu 50% eine Resterkrankung (RD) nach Therapieende. iT_u- eignete sich daher nicht als ein Marker um eine pCR vorherzusagen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte bei der Probenentnahme liegen. Das Entnehmen einer Biopsie kann sich bei bereits teilweise pathologischen Ansprechen auf Chemotherapie, aufgrund der heterogenen Regression, als schwierig erweisen und es ist anzunehmen, dass der Tumor bei der Probenentnahme in manchen Fällen verfehlt wurde. iT_u- war häufiger in kleinen Tumoren (T1) zu sehen. Dies ist eine Korrelation, die auch bei der pCR zu beobachten ist. Das klinische Tumorstadium hat die größte unabhängige Vorhersagekraft für pCR [117]. iT_u- war zudem, genauso wie die pCR, häufiger in HER2-positiven Tumoren zu sehen [110]. Dies könnte möglicherweise auf ein schnelleres Ansprechen auf die Chemotherapie bei HER2-positiven Tumoren zurückzuführen sein. Die Tendenz, dass der Nachweis von Tumorzellen in der intermediären Biopsie bei steigendem Grading seltener zu beobachten war, könnte vor allem mit der Tatsache zusammenhängen, dass iT_u+ seltener im HER2-positiven und triple-negativen Mammakarzinom nachgewiesen werden konnte, beides Subtypen, die oft ein höheres Grading aufweisen. Eine weitere Gemeinsamkeit, die iT_u- mit pCR verbindet, ist die Überlebensanalyse. In der triple-negativen Subgruppe hatten Patientinnen, die iT_u- aufwiesen, ein verbessertes krankheitsfreies Überleben gegenüber den Patientinnen, die iT_u+ zeigten. Eine mögliche Erklärung hierfür

könnte sein, dass für Patienten mit HER2-positiven und Hormonrezeptor-positiven Tumoren weitere adjuvante Therapien verfügbar sind, die einen Einfluss auf das Überleben haben.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von pCR auf das Überleben ebenfalls in der triple-negativen Subgruppe am größten ist [108, 118]. Zum Vergleich führten wir eine Überlebensanalyse der pCR in unserer Kohorte durch. In dieser Arbeit korrelierte eine pCR nur in der triple-negativen Kohorte mit einem verlängerten krankheitsfreien Überleben.

5.2. Tumorinfiltrierende Lymphozyten als prognostischer und prädiktiver Faktor

In der HER2-positiven Subgruppe war eine hohe Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) in der prätherapeutischen Biopsie (TA) mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer pCR verbunden. In der triple-negativen Subgruppe konnte ein erhöhter Wert in der intermediären Biopsie (TB) eine gesteigerte pCR-Rate vorhersagen. Ein Anstieg in TILs war in dieser Arbeit in der gesamten Kohorte mit einer höheren Rate an pCR assoziiert. Eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang des TIL-Anstiegs mit einer höheren pCR-Rate ist, dass ein TIL-Anstieg vor allem beim triple-negativen Mammakarzinom zu beobachten ist und diese Gruppe ohnehin bereits eine höhere pCR-Rate hat. Die triple-negative Subgruppe war die einzige Subgruppe, in welcher der Anstieg in TILs ein verlängertes krankheitsfreies Überleben vorhersagen konnte.

Verglichen mit anderen Arbeiten, wurden die Veränderungen in TILs bis dato hauptsächlich nach Abschluss der NACT im OP-Präparat untersucht. Die meisten dieser Studie zeigten, dass ein hoher posttherapeutischer TIL-Wert genau so wie ein hoher prätherapeutischer TIL-Wert mit einem besseren Überleben und einer höheren Ansprechrate auf die Therapie assoziiert ist [119]. Wie auch in dieser Arbeit, unterstützen einige Daten die Relevanz von TILs vor allem im triple-negativen Subtyp. In einer Studie mit 278 triple-negativen Mammakarzinomen hatte die Gruppe mit einem hohen posttherapeutischen TIL-Wert eine 5-Jahresüberlebensrate von 91%, wohingegen jene, bei der Gruppe mit einem niedrigen posttherapeutischen TIL-Wert, bei lediglich 55% lag [120]. Der Einfluss von posttherapeutischen TILs konnte jedoch auch im Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom bestätigt werden. Auch der Anstieg des TIL-Wertes als kontinuierlicher Marker korrelierte mit einem

verbesserten rezidivfreien Überleben [121]. Eine Studie konnte den Einfluss des TIL-Anstiegs auf das Gesamtüberleben, ähnlich wie in dieser Studie, auch vor allem für die triple-negative Subgruppe zeigen [70]. Diese Daten sind vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Studie und machen deutlich, dass nicht nur die Anzahl von prätherapeutischen TILs wichtige Informationen liefert, sondern dass auch die posttherapeutischen Veränderungen Relevanz haben und Therapieentscheidungen beeinflussen könnten.

Betrachtet man die Leukozyten im Mammakarzinom in ihren Subgruppen, dann wird deutlich, dass vor allem das Verhältnis von CD8+ T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen (CD8/FOXP3 ratio [CFR]) eine große Rolle spielt. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer hohen posttherapeutischen Anzahl von CD8+ T-Zellen und einer niedrigen Anzahl von regulatorischen T-Zellen eine bessere Prognose aufweisen [122, 123]. Auch ein Anstieg im CFR nach Chemotherapie ist ein überlebensverbessernder Faktor und wurde mit einer verringerten Neoangiogenese in Verbindung gebracht [124, 125].

5.3. Immunstimulation durch Chemotherapie

Eine Erklärung für den TIL-Anstieg oder einen hohen posttherapeutischen TIL-Wert und deren Benefit, könnte die immunstimulierende Wirkung einer Chemotherapie sein, die eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort des Patienten auslöst. Daten aus dem Tiermodell unterstützen diese Theorie. Untersucht man die Wirkung von Antrazyklinen an Tumorgewebe von immunkompetenten und immundefizienten Mäusen, so können Anthrazykline nur eine optimale Wirkung bei funktionalem Immunsystem entfalten [126]. Auch in dem Zusammenhang kommen die unterschiedlichen Funktionen der Leukozyten zu tragen. Waren unterschiedliche T-Zell-Subgruppen (unter anderem CD8+ T-Zellen) im Tumorgewebe nicht vorhanden, so konnte Doxorubicin nicht sein ganzliches zytotoxisches Potential entwickeln [127]. Bei der Abwesenheit von B-Zellen und NK-Zellen konnte dies jedoch nicht beobachtet werden [126].

Die immunologische Wirkung der unterschiedlichen Zytostatika beruht auf verschiedenen Mechanismen. Epirubicin und Cyclophosphamid induzieren immunogenen Zelltod, Cyclophosphamid vernichtet regulatorische T-Zellen und Taxane ermöglichen es dem Immunsystem, maligne Zellen einfacher zu erkennen [126]. Die immunstimulierende Wirkung wurde zudem nicht nur bei verschiedenster

zytostatischer Therapie (Anthrazykline, Taxane, Cyclophosphamid) beobachtet, sondern auch bei Trastuzumab und endokriner Therapie [128-130].

5.4. Immunotherapie als neue Therapieoption

Einerseits könnte die posttherapeutische Bestimmung von TILs behilflich sein, eine Entscheidung für oder gegen eine postneoadjuvante Chemotherapie zu treffen. Ein niedriger posttherapeutischer TIL-Wert ist mit einer schlechteren Prognose verbunden, und könnte somit behilflich sein, die Patienten zu identifizieren, welche von einer postneoadjuvanten zytotoxischen Therapie profitieren könnten. Andererseits ist anzunehmen, dass ein hoher posttherapeutischer TIL-Wert eine Antwort des Immunsystems widerspiegelt, welche durch Immunotherapie zusätzlich stimuliert werden könnte. Die Bestimmung der posttherapeutischen TILs könnte helfen, diese Gruppe von Patienten zu identifizieren, die von einer postneoadjuvanten Immunotherapie profitieren könnten. Eine vielversprechende Therapie, die die Behandlung des metastasierten Melanom deutlich verbessert hat, sind Immun-Checkpoint-Inhibitoren. Die Wirkung von Antikörpern, die das Programmed Cell Death Protein-1 (PD-1) oder den Programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) hemmen, werden derzeit im Mammakarzinom untersucht. Tumoren sind fähig über die Expression von PD-L1 aktivierte T-Zellen zu eliminieren, indem PD-L1 an den Rezeptor PD-1 der T-Zellen bindet und deren Proliferation hemmt [131]. Werden PD-L1 oder PD-1 gehemmt, so wird eine Immunantwort, welche gegen das Tumorwachstum gerichtet ist, unterstützt. Im metastasierten Melanom zeigen PD-1- und PD-L1-Inhibitoren sehr gute Ergebnisse [132]. Obwohl in der Phase-IIb-Studie KEYNOTE-086 der PD-1-Antikörper Pembrolizumab, getestet an metastasierten triple-negativen Mammakarzinomen, nur eine geringe allgemeine Ansprechrate von 5,3% erreichen konnte [133], zeigte die Phase-III-Studie KEYNOTE-522 vielversprechende Ergebnisse. In der Studie wurde die Gabe von Pembrolizumab zusammen mit neoadjuvanter Chemotherapie am triple-negativen Mammakarzinom getestet, und es konnte in der Zwischenanalyse beobachtet werden, dass die Gruppe, die Pembrolizumab erhalten hatte, eine signifikant höhere Rate an pCR aufwies [134]. Bereits präklinische Daten wiesen daraufhin, dass durch vorangehende Chemotherapie oder Bestrahlung eine Immunantwort initiiert werden konnte, die durch die Therapie mit PD-1- und PD-L1-Antikörpern weiter verstärkt werden könnte. Es konnte gezeigt werden, dass Doxorubicin eine gegen den Tumor

gerichtete Immunreaktion initiiert, indem es hilft, myeloide Suppressorzellen zu eliminieren, die Produktion von Interferon Typ 1 steigert und einen immunogenen Zelltod induziert [127, 135, 136]. Cyclophosphamid kann, durch eine Vernichtung von regulatorischen T-Zellen und der Wiederherstellung der Effektorfunktion von T-Zellen und NK-Zellen, eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort begünstigen [137]. Cisplatin unterstützt die Immunreaktion, indem es die MHC-1-Expression steigert und die T-Zell-Funktion stimuliert [138, 139]. Diese Mechanismen hatte man sich in der Phase-II-Studie Tonic zunutze gemacht. In der Studie wurde untersucht, ob eine Induktion mit Bestrahlung, Cyclophosphamid, Cisplatin und Doxorubicin die Ansprechrate auf PD-1-Inhibitor Nivolumab im triple-negativen Mammakarzinomen erhöht [140]. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem nach einer Induktion mit Cisplatin und Doxorubicin die allgemeinen Ansprechraten verbessert waren. Zudem konnte in Genexpressionsanalysen nachgewiesen werden, dass durch die Induktion mit Doxorubicin und Cisplatin Gene, die an der PD-1- und PD-L1-Expression beteiligt sind, hochreguliert wurden [140]. In der Phase-III-Studie IMpassion-130, die 902 unbehandelte Patienten mit einem triple-negativen Mammakarzinom einschloss, wurde die Wirkung des PD-L1-Antikörpers Atezolizumab nach Induktion mit Nab-Paclitaxel gegen ein Placebo plus Nab-Paclitaxel getestet und es konnte gezeigt werden, dass Atezolizumab das krankheitsfreie (HR=0.80; 95%-KI: 0.69-0.92; p=0.002) und das Gesamtüberleben signifikant verlängerte (HR=0.84; 95%-KI: 0.69 - 1.02; p=0.08) [141]. Eine weitere Substanz, die das Überleben beim metastasiertem Melanom deutlich verlängern konnte und nun zur Standardtherapie gehört, sind CTLA-4-Inhibitoren [142]. Das cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 wird vor allem von regulatorischen T-Zellen exprimiert und ist ein inhibierender Rezeptor, der durch eine kompetitive Bindung an CD28 wirkt. CD28 ist ein Rezeptor, der von T-Zellen exprimiert wird und durch den die T-Zell-Aktivität stimuliert werden kann. Dies erfolgt durch die Bindung von CD28 mit den Liganden CD80 und CD86 von antigenpräsentierenden Zellen [143]. CTLA-4-Inhibitoren werden momentan in Pilotstudien am Mammakarzinom getestet.

5.5. Ki-67 als positiver Responsemarker und negativer Prognosefaktor

Ein hoher Ki-67-Index in der prätherapeutischen Biopsie in der Hormonrezeptorpositiven, HER2-negativen Subgruppe war in dieser Arbeit mit einer höheren

Wahrscheinlichkeit einer pCR assoziiert. Dies deckt sich mit mehreren neoadjuvanten Studien, in denen ein hoher prätherapeutischer Ki-67-Index mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer pCR nach Beendigung der NACT in Verbindung gebracht werden konnte [93, 94]. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Ki-67-Anstieg während NACT mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit einer pCR verbunden ist und dass Patienten der triple-negativen Subgruppe, welche einen Anstieg in der Ki-67-Expression zeigten, ein schlechteres krankheitsfreies Überleben hatten.

Wird während der Chemotherapie ein Anstieg in der Ki-67-Expression beobachtet, ist daraus zu schließen, dass der Tumor trotz zytotoxischer Therapie ein steigendes Wachstum zeigt, welches die schlechtere Prognose dieser Gruppe erklärt. Eine mögliche Erklärung für den Anstieg in der Ki-67-Expression während der Chemotherapie ist, dass die Patienten bereits vor Chemotherapie einen hochproliferativen Tumor hatten, welcher resistent gegenüber den Zytostatika war und im Laufe der Therapie an proliferativer Aktivität zugenommen hatte. Eine andere Möglichkeit ist, dass der Tumor dieser Patienten bereits initial aus unterschiedlichen Populationen von Tumorzellen bestand, einer Zellreihe die ein gutes Ansprechen zeigte und einer aggressiver wachsenden Tumorzellreihe, welche im Laufe der Therapie die Überhand gewann.

5.5.1. Frühe Veränderungen des Ki-67-Index während Chemotherapie

Nur wenige publizierte Studien haben die Veränderung des Ki-67-Index an intermediären Biopsien untersucht. Diese Studien sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Wie auch in dieser Studie, waren in den meisten Fällen der Studien aus Tabelle 8 während der Chemotherapie ein Abfall der Ki-67-Expression zu beobachten. Jedoch korrelierte die Veränderung in der Ki-67-Expression nur in einer Arbeit signifikant mit dem Therapieansprechen. In der Studie von Burcombe et al. korrelierte ein niedrigerer intermediärer Ki-67-Index mit dem klinischen Ansprechen, hingegen ein höherer intermediärer Ki-67-Index mit dem pathologischen Ansprechen. Diese Zusammenhänge sind unerwartet, da eine pathologische Regression des Tumors von einer verminderten Proliferationsrate begleitet sein sollte [144]. Da das klinische und pathologische Ansprechen in der Studie jedoch auch nicht mit einander korrelierten, ist fraglich ob die gewählte Klassifikation des Ansprechens in der Studie von Burcombe zuverlässige Surrogatmarker darstellen

[144]. Anzumerken ist, dass die Fallzahlen, in den in Tabelle 8 aufgelisteten Studien, im Vergleich zu dieser Studie kleiner sind. Zudem erfolgte die statistische Auswertung der Veränderung des Ki-67-Index und der Korrelation mit dem Ansprechen sehr unterschiedlich. In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang mit der pathologischen Komplettremission (definiert als ypT0ypN0) beurteilt, in den genannten Arbeiten wurden jedoch unterschiedliche Definitionen von pathologischem und klinischen Ansprechen betrachtet. Nur in einer der aufgelisteten Studien wurde der Einfluss der Veränderung des Ki-67-Index unter Chemotherapie auf das Überleben untersucht. Die Implikationen einer frühen Veränderung des Ki-67-Index unter Chemotherapie bleiben noch abschließend zu klären.

Tabelle 8: Korrelation der Veränderung der Ki-67-Expression mit klinischem oder pathologischem Ansprechen, evaluiert in intermediären Biopsien während neoadjuvanter Chemotherapie.

Autor	Patienten und Therapie	Zeitpunkt der intermediären Biopsie	Veränderung von Ki-67 und Korrelation mit Ansprechen und Überleben
Sharma et al. [145], 2009	30 Patienten, neoadjuvante Chemotherapie (Regime nicht erwähnt)	24-48h und 21 Tage nach Therapiebeginn	Keine signifikante Korrelation von Ki-67-Veränderungen mit pathologischem Ansprechen
Chuah et al. [146], 2011	100 Patienten, 6 Zyklen, alternierend Doxorubicin und Docetaxel	3 Wochen nach dem ersten und zweiten Zyklus der Therapie	Keine signifikante Veränderung von Ki-67
Burcombe et al. [144], 2006	27 Patienten, 5-Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid	3 Wochen nach Therapiebeginn	Korrelation von niedrigerem intermediärem Ki-67-Index mit klinischem Ansprechen; Korrelation von

			höherem intermediärem Ki-67-Index mit pathologischem Ansprechen
Magbanua et al. [147], 2015	28 Patienten, ein Anthrazyklin, gefolgt von einem Taxan (genaues Regime nicht erwähnt)	24-96 Stunden nach Therapiebeginn	Keine signifikante Korrelation zwischen der Ki-67-Veränderung und dem pathologischem Ansprechen und dem rezidivfreiem Überleben

5.5.2. Veränderungen des Ki-67-Index nach Chemotherapieende

Weitaus mehr Studien beschäftigten sich mit der Veränderung des Ki-67-Index nach Abschluss der Chemotherapie und untersuchten diese Veränderung am OP-Präparat. In der GeparTrio-Studie wurde an 667 Patienten der Ki-67-Index vor und nach Chemotherapie immunhistologisch bestimmt und es konnte gezeigt werden, dass der Ki-67-Index nach Chemotherapie von einem größerem prognostischen Wert ist, als der prätherapeutische Ki-67-Index oder die Veränderung des Ki-67-Index [148]. Von Minckwitz et al. zeigte, dass ein hoher Ki-67-Index nach Beendigung der Chemotherapie mit einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv oder Tod verbunden war (Log-Rank-Test: $p < 0,0001$), verglichen mit Patienten, die nach Therapieende einen niedrigen oder intermediären Ki-67-Index aufwiesen. In der Hormonrezeptor-positiven Subgruppe hatte zudem die Kombination des posttherapeutischen Ki-67-Index und pCR eine größere prognostische Aussagekraft als die pCR alleine [148]. Eine weitere retrospektive Studie hatte den prä- und posttherapeutischen Ki-67-Index an 455 gepaarten Proben untersucht und konnte nachweisen, dass auch die Veränderung des Ki-67-Index eine wichtige Rolle spielt. Je höher der Abfall des Ki-67-Index war, desto besser war das rezidivfreie Überleben [149]. Auch eine Metaanalyse von 49 Studien mit insgesamt 14 076 Patienten kam zu dem Schluss, dass ein hoher posttherapeutischer Ki-67-Index (HR= 2.24; 95%-KI: 1.82–2.75) und

ein Anstieg im Ki-67-Index (HR=2.13; 95%-KI: 1.51–3.02) mit einem schlechterem Überleben assoziiert war [150].

Diese Daten bestätigen, dass nicht nur der prätherapeutische Ki-67-Index eine Relevanz hat, sondern dass der Ki-67, ermittelt im OP-Präparat nach Chemotherapie, ebenfalls Beachtung verdient. Der posttherapeutische Ki-67-Index könnte helfen, eine Gruppe von Patienten zu identifizieren, die von einer postneoadjuvanten zytostatischen Therapie profitieren könnten. Durch die zusätzliche Betrachtung des posttherapeutischen Ki-67-Index, könnte die Indikationsstellung noch differenzierter erfolgen. Der Vorteil der Evaluation des Ki-67-Index während der Chemotherapie wäre hierbei, dass ein Chemotherapie-Regime, auf das ein Patient nicht anspricht, frühzeitig gewechselt werden könnte.

5.6. Limitierungen der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden 297 Biopsie-Paare untersucht, damit handelt es sich um eine der größten Studien, die die Veränderungen von Biomarkern während der neoadjuvanten Chemotherapie an intermediären Biopsien untersucht hat. Dennoch ist die Größe der einzelnen Subgruppenkohorten lediglich moderat. Eine Validierung der Daten an einer größeren Kohorte sollte erfolgen, sodass die Effekte in den einzelnen molekularen Subtypen besser evaluiert werden können. Eine weitere Limitierung der Arbeit war, dass nicht für alle Patientinnen aus den ausgewählten Studien intermediäre Biopsien vorlagen. Die Evaluation von Biomarkern an Biopsien birgt außerdem ein gewisses Bias-Risiko. Durch Biopsien kann die Heterogenität des Tumors, welche unter anderem durch die heterogene Regression bei neoadjuvanter Chemotherapie verursacht sein kann, schlecht erfasst werden. Die Zusammenstellung dieser Kohorte erfolgte zudem retrospektiv. Daraus könnte sich ein Selektionsbias ergeben, da nur Patientinnen eingeschlossen wurden, für die jeweils eine prätherapeutische und eine intermediäre Biopsie verfügbar waren.

5.7. Postneoadjuvante Chemotherapie bei Patienten mit einer schlechten Prognose

Patienten, die eine pCR nach neoadjuvanter Chemotherapie zeigen, haben eine gute Prognose und ein verlängertes Überleben [118]. Weisen Patienten jedoch keine pCR auf, kann die Prognose je nach Residualtumor differieren. Patienten mit einer ausgedehnten Resterkrankung weisen eine schlechte Prognose auf [151]. Eine

postneoadjuvante endokrine Therapie beim Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom oder eine postneoadjuvante Antikörpertherapie, mit Trastuzumab und Pertuzumab, beim HER2-positiven Mammakarzinom gehört bereits zum Therapiestandard. In verschiedenen klinischen Studien wurde getestet, ob auch eine adjuvante Chemotherapie nach erfolgter neoadjuvanter Chemotherapie einen zusätzlichen Benefit bei Patienten, die keine pCR erreichten, bringt. In der CREATE-X-Studie (Capecitabine for Residual Cancer as Adjuvant Therapy) wurde an Patienten mit einem HER2-negativen Mammakarzinom und einer Resterkkrankung nach neoadjuvanter Chemotherapie mit Anthrazyklinen und/oder Taxanen getestet, ob Capecitabin als postneoadjuvante Chemotherapie die Prognose verbessert. Die 5-Jahres-Überlebensrate stieg durch die zusätzliche Therapie von 83,6% auf 89,2% (HR=0.59; 95%-KI: 0.39-0.90; p=0.01). Im triple-negativen Mammakarzinom konnte die 5-Jahres-Überlebensrate durch Capecitabin am deutlichsten verbessert werden, von 70,3% auf 78,8% (HR=0.52; 95%-KI: 0.30-0.90) [152]. In der Katherine-Studie wurde bei HER2-positiven Patienten ein Konjugat aus Trastuzumab und dem Zytostatikum Emantasin (T-DM1) getestet. In der Zwischenanalyse konnte gezeigt werden, dass für die Patienten aus der T-DM1-Gruppe das Risiko eines Rezidivs oder von Tod 50% niedriger war als in der Gruppe, die nur Trastuzumab erhielt (HR=0.50; 95%-KI: 0.39-0.64; p<0.001) [153].

Um eine Übertherapie zu vermeiden, bedarf es einer sorgfältigen Auswahl der Patienten, die von einer postneoadjuvanten Chemotherapie profitieren. Dabei könnte die posttherapeutische Bestimmung von TILs und Ki-67 behilflich sein. In einer Studie wurde untersucht, welchen prognostischen Wert ein Index bestehend aus RCB (Residual Cancer Burden) und Ki-67 hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Integration beider Werte von größerer prognostischer Aussagekraft ist als ausschließlich RCB oder Ki-67 [154]. Auch die zusätzliche Betrachtung von posttherapeutischen TILs könnte helfen, die Prognose der Patienten weiter zu stratifizieren [155].

5.8. Translationale Forschungsmöglichkeiten in neoadjuvanten Studien

Eine neoadjuvante Chemotherapie bietet eine einzigartige Möglichkeit, molekularbiologische Veränderungen der Tumorzellen im Tumor selbst zu untersuchen. In dieser Studie wurde die Veränderung von Biomarkern zwischen der

prätherapeutischen Biopsie gegenüber einer intermediären Biopsie, entnommen während der neoadjuvanten Chemotherapie, untersucht. Weitaus mehr Studien beschäftigen sich jedoch mit dem Vergleich von prä- und posttherapeutischen Gewebeproben. Prätherapeutische Biopsien und posttherapeutische Gewebeproben werden bereits routinemäßig im Behandlungsverlauf einer Patientin entnommen, sodass vor allem die einfachere Umsetzbarkeit ein Grund für die Vielzahl an Studien, die diese vergleichen, ist. Andererseits kann nach Abschluss der Chemotherapie das umfassende Bild der Veränderungen in der Tumorbilogie besser erfasst werden. Dennoch könnte auch der Verlauf der Veränderungen während der Chemotherapie einen zusätzlichen Wissenszuwachs bringen, da die dynamischen Veränderungen unter der Therapie hier besser erfasst werden können.

5.8.1. Intermediäre Biopsien zu Forschungszwecken

Chuah et al. hat die Expression von COX-2, ein Enzym, welches an der Tumorgenese und Angiogenese beteiligt ist, in seriellen Biopsien zu vier verschiedenen Zeitpunkten während neoadjuvanter Chemotherapie untersucht und gezeigt, dass viele Tumoren durch Chemotherapie keine COX-2-Expression mehr aufweisen. Diese Veränderung der COX-2-Expression war signifikant mit dem klinischen Therapieansprechen assoziiert. Zudem konnte Chuah et al. beobachten, dass diese Veränderung der Expression vor allem zwischen dem dritten und letzten Zyklus aufgetreten ist, eine Information, die nur durch Biopsien zu verschiedenen Zeitpunkten während der Chemotherapie gewonnen werden kann und so möglicherweise helfen könnte, die optimale Länge der Chemotherapie zu eruieren [146].

Intermediäre Gewebeproben könnten zudem eine gute Möglichkeit sein, zu untersuchen, wie sich die Genexpression im Tumor durch Chemotherapie verändert. Eine Studie untersuchte dies an seriellen Biopsien und konnte bereits nach dem ersten Zyklus Veränderungen in der Expression von Genen des Immunsystems und der Zellteilung feststellen. Eine verringerte Expression von Zellzyklusinhibitoren und eine erhöhte Expression von proliferativen Genen war mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Interferonen die Rezidivrate ansteigen lässt [147].

5.9. Evaluation des frühen Ansprechens während neoadjuvanter Chemotherapie

In dieser Arbeit korrelierte der intermediäre Nachweis von invasiven Tumorzellen stark mit einer Resterkrankung nach Abschluss der Chemotherapie. Intermediäre Biopsien könnten also behilflich sein, Patienten, deren Tumor nicht auf die Chemotherapie anspricht, zu identifizieren. Die Hypothese, dass diese Patienten von einer Umstellung des Chemotherapieregime profitieren, wurde in Studien bereits untersucht.

In der GeparTrio-Studie bekamen Patienten, die nach zwei Zyklen Docetaxel, Doxorubicin und Cyclophosphamid (TAC) kein klinisches oder sonographisches Ansprechen zeigten, entweder weitere vier Zyklen TAC oder vier Zyklen Vinorelbin und Capecitabin (NX). Die Studie wurde unter der Annahme konzipiert, dass es sich bei NX um ein nichtkreuzresistentes Regime handle. Es konnte kein verbessertes pathologisches Ansprechen bei Wechsel auf ein nichtkreuzresistentes Regime festgestellt werden, die pCR-Rate war 5,3% in der TAC-Gruppe und 6% in der NX-Gruppe [156]. Das krankheitsfreie Überleben war in der NX-Gruppe jedoch signifikant länger (HR=0.6; 95%-KI: 0.43–0.82, p=0.001), das Gesamtüberleben wiederum nicht (HR=0.85; 95%-KI: 0.57–1.27, p=0.4) [157]. Eine andere Studie, die sich die frühe Evaluation des Therapieansprechens zu nutze gemacht hat, war die Aberdeen-Studie. In der Studie wurde nach vier Zyklen Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon (CVAP) das klinische Therapieansprechen evaluiert. Alle Patienten, die nicht auf die Chemotherapie angesprochen hatten, erhielten vier Zyklen Docetaxel. Die Patienten, die auf die Chemotherapie ansprachen, wurden randomisiert, entweder weitere vier Zyklen CVAP oder ebenfalls vier Zyklen Docetaxel zu erhalten. In der Studie konnte gezeigt werden, dass die Gruppe, die Docetaxel erhielt, ein verlängertes Überleben zeigte (p=0,05) [158]. Die pCR-Rate in der Gruppe der Nicht-Ansprecher blieb jedoch trotz Wechsel des Chemotherapieregime niedrig. Die pCR-Rate bei den Nicht-Ansprechern lag bei 2% gegenüber 31% bei Ansprechern, die zusätzlich Docetaxel erhielten, und 15% bei den Ansprechern, die weitere vier Zyklen CVAP erhielten [158]. Die Überlebensdate sollten jedoch vorsichtig betrachtet werden, da es sich um eine relativ kleine Studienkohorte handelte. Auch war die Studie nicht konzipiert, einen Überlebensvorteil durch den Wechsel eines Chemotherapieregime bei Nicht-Ansprechern zu untersuchen, da es keine Kontroll-Gruppe bei den Nicht-

Ansprechern gab. In der GeparTrio-Studie konnte eine Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens bei Modifikation der Therapie beobachtet werden, das Gesamtüberleben und das pathologische Ansprechen zeigten sich jedoch nicht signifikant verbessert [156]. In der Aberdeen Studie konnte gezeigt werden, dass ein Gabe von Taxanen bei Therapieansprechen einen deutlichen Vorteil hat [158]. Eine taxanhaltige Chemotherapie gehört heutzutage zum Therapiestandard. Bei Nicht-Ansprechern war die pCR-Rate auch bei Therapieumstellung gering [158]. Obwohl die Modifikation der Therapie einen Nutzen zeigte, sind weitere Studien notwendig um den Vorteil einer Evaluation des frühen Ansprechens und anschließenden Therapieumstellung zu untersuchen.

5.10. Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass es sinnvoll sein kann, das Ansprechen auch in intermediären Biopsien zu untersuchen. Das Chemotherapie-Regime könnte bei Patientinnen, die in der intermediären Biopsie ein schlechtes Ansprechen zeigen, angepasst werden, und die Prognose der Patientinnen könnte so verbessert werden.

Literaturverzeichnis

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
2. WHO, *Breast cancer: Early diagnosis and screening at <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>*. 2019.
3. Gemeinsames Krebsregister der Länder Berlin, B., Mecklenburg-Vorpommern, SachsenAnhalt und der Freistaaten Sachsen und Thüringen, *Krebsinzidenz und Krebsmortalität 2009- 20012 (Jahresbericht)*. 01/2015.
4. Robert Koch Institut, *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 11/2016.
5. Iqbal, J., O. Ginsburg, P.A. Rochon, P. Sun, and S.A. Narod, *Differences in breast cancer stage at diagnosis and cancer-specific survival by race and ethnicity in the United States*. Jama, 2015. **313**(2): p. 165-73.
6. Rojas, K. and A. Stuckey, *Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors*. Clin Obstet Gynecol, 2016. **59**(4): p. 651-672.
7. Zhu, Y., J. Wu, C. Zhang, S. Sun, J. Zhang, W. Liu, J. Huang, and Z. Zhang, *BRCA mutations and survival in breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis*. Oncotarget, 2016. **7**(43): p. 70113-70127.
8. Liebens, F.P., B. Carly, A. Pastijn, and S. Rozenberg, *Management of BRCA1/2 associated breast cancer: a systematic qualitative review of the state of knowledge in 2006*. Eur J Cancer, 2007. **43**(2): p. 238-57.
9. Arpino, G., R. Laucirica, and R.M. Elledge, *Premalignant and in situ breast disease: biology and clinical implications*. Ann Intern Med, 2005. **143**(6): p. 446-57.
10. Lakhani SR El, S.S., Tan PH, van de Vijver MJ, *World Health Organization Classification of tumors of the breast*. IARC Prsee, Lyon. , 2012.

11. Bastien, R.R., A. Rodriguez-Lescure, M.T. Ebbert, A. Prat, B. Munarriz, L. Rowe, P. Miller, M. Ruiz-Borrego, D. Anderson, B. Lyons, I. Alvarez, T. Dowell, D. Wall, M.A. Segui, L. Barley, K.M. Boucher, E. Alba, L. Pappas, C.A. Davis, I. Aranda, C. Fauron, I.J. Stijleman, J. Palacios, A. Anton, E. Carrasco, R. Caballero, M.J. Ellis, T.O. Nielsen, C.M. Perou, M. Astill, P.S. Bernard, and M. Martin, *PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers*. BMC Med Genomics, 2012. **5**: p. 44.
12. Prat, A., E. Pineda, B. Adamo, P. Galvan, A. Fernandez, L. Gaba, M. Diez, M. Viladot, A. Arance, and M. Munoz, *Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer*. Breast, 2015. **24 Suppl 2**: p. S26-35.
13. Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO), *Pathologie at http://www.agoonline.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/maerz2015/de/2015D_04_Pathologie.pdf*. 2015.
14. Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. Zuckschwerdt Verlag GmbH, 2019. **Langversion 4.2**.
15. Coates, A.S., E.P. Winer, A. Goldhirsch, R.D. Gelber, M. Gnant, M. Piccart-Gebhart, B. Thurlimann, and H.J. Senn, *Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015*. Ann Oncol, 2015. **26**(8): p. 1533-46.
16. Gschwind, A., O.M. Fischer, and A. Ullrich, *The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 361-70.
17. Petrelli, F., G. Tomasello, S. Barni, V. Lonati, R. Passalacqua, and M. Ghidini, *Clinical and pathological characterization of HER2 mutations in human breast cancer: a systematic review of the literature*. Breast Cancer Res Treat, 2017. **166**(2): p. 339-349.
18. Foulkes, W.D., I.M. Stefansson, P.O. Chappuis, L.R. Begin, J.R. Goffin, N. Wong, M. Trudel, and L.A. Akslen, *Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(19): p. 1482-5.
19. Milioli, H.H., I. Tishchenko, C. Riveros, R. Berretta, and P. Moscato, *Basal-like breast cancer: molecular profiles, clinical features and survival outcomes*. BMC Med Genomics, 2017. **10**(1): p. 19.
20. Li, X., J. Yang, L. Peng, A.A. Sahin, L. Huo, K.C. Ward, R. O'Regan, M.A. Torres, and J.L. Meisel, *Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2017. **161**(2): p. 279-287.
21. Dias, K., A. Dvorkin-Gheva, R.M. Hallett, Y. Wu, J. Hassell, G.R. Pond, M. Levine, T. Whelan, and A.L. Bane, *Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0168669.
22. Gemeinsamer Bundesausschuss des Bundesministeriums für Gesundheit, *Krebsfrüherkennungs-Richtlinie*. Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses, 2017.
23. Brem, R.F., M.J. Lenihan, J. Lieberman, and J. Torrente, *Screening breast ultrasound: past, present, and future*. AJR Am J Roentgenol, 2015. **204**(2): p. 234-40.
24. Eberl, M.M., C.H. Fox, S.B. Edge, C.A. Carter, and M.C. Mahoney, *BI-RADS classification for management of abnormal mammograms*. J Am Board Fam Med, 2006. **19**(2): p. 161-4.
25. Uehiro, N., R. Horii, T. Iwase, M. Tanabe, T. Sakai, H. Morizono, K. Kimura, K. Iijima, Y. Miyagi, S. Nishimura, M. Makita, Y. Ito, and F. Akiyama, *Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer*. Breast Cancer, 2014. **21**(6): p. 748-53.
26. Houssami, N., P. Macaskill, M.L. Marinovich, and M. Morrow, *The association of surgical margins and local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy: a meta-analysis*. Ann Surg Oncol, 2014. **21**(3): p. 717-30.

27. Veronesi, U., N. Cascinelli, L. Mariani, M. Greco, R. Saccozzi, A. Luini, M. Aguilar, and E. Marubini, *Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(16): p. 1227-32.
28. Fisher, B. and S. Anderson, *Conservative surgery for the management of invasive and noninvasive carcinoma of the breast: NSABP trials. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*. *World J Surg*, 1994. **18**(1): p. 63-9.
29. Brackstone, M., G.G. Fletcher, I.S. Dayes, Y. Madarnas, S.K. SenGupta, and S. Verma, *Locoregional therapy of locally advanced breast cancer: a clinical practice guideline*. *Curr Oncol*, 2015. **22**(Suppl 1): p. S54-66.
30. Lyman, G.H., M.R. Somerfield, L.D. Bosserman, C.L. Perkins, D.L. Weaver, and A.E. Giuliano, *Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients With Early-Stage Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update*. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(5): p. 561-564.
31. Clarke, M., R. Collins, S. Darby, C. Davies, P. Elphinstone, V. Evans, J. Godwin, R. Gray, C. Hicks, S. James, E. MacKinnon, P. McGale, T. McHugh, R. Peto, C. Taylor, and Y. Wang, *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. *Lancet*, 2005. **366**(9503): p. 2087-106.
32. Bartelink, H., P. Maingon, P. Poortmans, C. Weltens, A. Fourquet, J. Jager, D. Schinagl, B. Oei, C. Rodenhuis, J.C. Horiot, H. Struikmans, E. Van Limbergen, Y. Kirova, P. Elkhuizen, R. Bongartz, R. Miralbell, D. Morgan, J.B. Dubois, V. Remouchamps, R.O. Mirimanoff, S. Collette, and L. Collette, *Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(1): p. 47-56.
33. Davies, C., J. Godwin, R. Gray, M. Clarke, D. Cutter, S. Darby, P. McGale, H.C. Pan, C. Taylor, Y.C. Wang, M. Dowsett, J. Ingle, and R. Peto, *Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials*. *Lancet*, 2011. **378**(9793): p. 771-84.
34. Eisen, A., G.G. Fletcher, S. Gandhi, M. Mates, O.C. Freedman, S.F. Dent, and M.E. Trudeau, *Optimal systemic therapy for early breast cancer in women: a clinical practice guideline*. *Curr Oncol*, 2015. **22**(Suppl 1): p. S67-81.
35. Bedard, P.L., A. Di Leo, and M.J. Piccart-Gebhart, *Taxanes: optimizing adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010. **7**(1): p. 22-36.
36. Bria, E., C. Nistico, F. Cuppone, P. Carlini, M. Ciccarese, M. Milella, G. Natoli, E. Terzoli, F. Cognetti, and D. Giannarelli, *Benefit of taxanes as adjuvant chemotherapy for early breast cancer: pooled analysis of 15,500 patients*. *Cancer*, 2006. **106**(11): p. 2337-44.
37. Clavarezza, M., L. Del Mastro, and M. Venturini, *Taxane-containing chemotherapy in the treatment of early breast cancer patients*. *Ann Oncol*, 2006. **17 Suppl 7**: p. vii22-6.
38. Estevez, L.G., M. Munoz, I. Alvarez, Y. Fernandez, J. Garcia-Mata, M. Ruiz-Borrego, I. Tusquets, M.A. Segui, A. Rodriguez-Lescure, E. Adrover, and A. Lluch, *Evidence-based use of taxanes in the adjuvant setting of breast cancer. A review of randomized phase III trials*. *Cancer Treat Rev*, 2007. **33**(5): p. 474-83.
39. Moja, L., L. Tagliabue, S. Balduzzi, E. Parmelli, V. Pistotti, V. Guarneri, and R. D'Amico, *Trastuzumab containing regimens for early breast cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012(4): p. Cd006243.
40. Bundred, N.J., *Prognostic and predictive factors in breast cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2001. **27**(3): p. 137-42.
41. Peto, R., C. Davies, J. Godwin, R. Gray, H.C. Pan, M. Clarke, D. Cutter, S. Darby, P. McGale, C. Taylor, Y.C. Wang, J. Bergh, A. Di Leo, K. Albain, S. Swain, M. Piccart, and K. Pritchard, *Comparisons between different polychemotherapy regimens for*

- early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials.* Lancet, 2012. **379**(9814): p. 432-44.
42. Parker, J.S., M. Mullins, M.C. Cheang, S. Leung, D. Voduc, T. Vickery, S. Davies, C. Fauron, X. He, Z. Hu, J.F. Quackenbush, I.J. Stijleman, J. Palazzo, J.S. Marron, A.B. Nobel, E. Mardis, T.O. Nielsen, M.J. Ellis, C.M. Perou, and P.S. Bernard, *Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes.* J Clin Oncol, 2009. **27**(8): p. 1160-7.
 43. Buus, R., I. Sestak, R. Kronenwett, C. Denkert, P. Dubsy, K. Krappmann, M. Scheer, C. Petry, J. Cuzick, and M. Dowsett, *Comparison of EndoPredict and EPclin With Oncotype DX Recurrence Score for Prediction of Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy.* J Natl Cancer Inst, 2016. **108**(11).
 44. Sparano, J.A., R.J. Gray, D.F. Makower, K.I. Pritchard, K.S. Albain, D.F. Hayes, C.E. Geyer, Jr., E.C. Dees, E.A. Perez, J.A. Olson, Jr., J. Zujewski, T. Lively, S.S. Badve, T.J. Saphner, L.I. Wagner, T.J. Whelan, M.J. Ellis, S. Paik, W.C. Wood, P. Ravdin, M.M. Keane, H.L. Gomez Moreno, P.S. Reddy, T.F. Goggins, I.A. Mayer, A.M. Brufsky, D.L. Toppmeyer, V.G. Kaklamani, J.N. Atkins, J.L. Berenberg, and G.W. Sledge, *Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer.* N Engl J Med, 2015. **373**(21): p. 2005-14.
 45. Cardoso, F., L.J. van't Veer, J. Bogaerts, L. Slaets, G. Viale, S. Delaloge, J.Y. Pierga, E. Brain, S. Causeret, M. DeLorenzi, A.M. Glas, V. Golfopoulos, T. Goulioti, S. Knox, E. Matos, B. Meulemans, P.A. Neijenhuis, U. Nitz, R. Passalacqua, P. Ravdin, I.T. Rubio, M. Saghatchian, T.J. Smilde, C. Sotiriou, L. Stork, C. Straehle, G. Thomas, A.M. Thompson, J.M. van der Hoeven, P. Vuylsteke, R. Bernardis, K. Tryfonidis, E. Rutgers, and M. Piccart, *70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer.* N Engl J Med, 2016. **375**(8): p. 717-29.
 46. Harris, L.N., N. Ismaila, L.M. McShane, F. Andre, D.E. Collyar, A.M. Gonzalez-Angulo, E.H. Hammond, N.M. Kuderer, M.C. Liu, R.G. Mennel, C. Van Poznak, R.C. Bast, and D.F. Hayes, *Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline.* J Clin Oncol, 2016. **34**(10): p. 1134-50.
 47. Gesundheit, G.B.d.B.f., *Unterstützung der Therapieentscheidung bei Brustkrebs im Frühstadium: Biomarker-Test künftig Kassenleistung at <https://www.g-ba.de/presse/pressemitteilungen/800/>.* 20.06.2019.
 48. Schmidt, M., C. Thomssen, and M. Untch, *Intrinsic Subtypes of Primary Breast Cancer--Gene Expression Analysis.* Oncol Res Treat, 2016. **39**(3): p. 102-10.
 49. Dubsy, P., J.C. Brase, R. Jakesz, M. Rudas, C.F. Singer, R. Greil, O. Dietze, I. Luisser, E. Klug, R. Sedivy, M. Bachner, D. Mayr, M. Schmidt, M.C. Gehrman, C. Petry, K.E. Weber, K. Fisch, R. Kronenwett, M. Gnant, and M. Filipits, *The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients.* Br J Cancer, 2013. **109**(12): p. 2959-64.
 50. Dubsy, P., M. Filipits, R. Jakesz, M. Rudas, C.F. Singer, R. Greil, O. Dietze, I. Luisser, E. Klug, R. Sedivy, M. Bachner, D. Mayr, M. Schmidt, M.C. Gehrman, C. Petry, K.E. Weber, R. Kronenwett, J.C. Brase, and M. Gnant, *EndoPredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer.* Ann Oncol, 2013. **24**(3): p. 640-7.
 51. Filipits, M., M. Rudas, R. Jakesz, P. Dubsy, F. Fitzal, C.F. Singer, O. Dietze, R. Greil, A. Jelen, P. Sevelde, C. Freibauer, V. Muller, F. Janicke, M. Schmidt, H. Kolbl, A. Rody, M. Kaufmann, W. Schroth, H. Brauch, M. Schwab, P. Fritz, K.E. Weber, I.S. Feder, G. Hennig, R. Kronenwett, M. Gehrman, and M. Gnant, *A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(18): p. 6012-20.
 52. Martin, M., J.C. Brase, L. Calvo, K. Krappmann, M. Ruiz-Borrego, K. Fisch, A. Ruiz, K.E. Weber, B. Munarriz, C. Petry, C.A. Rodriguez, R. Kronenwett, C. Crespo, E. Alba, E. Carrasco, M. Casas, R. Caballero, and A. Rodriguez-Lescure, *Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2-*

- breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial.* Breast Cancer Res, 2014. **16**(2): p. R38.
53. Paik, S., S. Shak, G. Tang, C. Kim, J. Baker, M. Cronin, F.L. Baehner, M.G. Walker, D. Watson, T. Park, W. Hiller, E.R. Fisher, D.L. Wickerham, J. Bryant, and N. Wolmark, *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer.* N Engl J Med, 2004. **351**(27): p. 2817-26.
 54. Paik, S., G. Tang, S. Shak, C. Kim, J. Baker, W. Kim, M. Cronin, F.L. Baehner, D. Watson, J. Bryant, J.P. Costantino, C.E. Geyer, Jr., D.L. Wickerham, and N. Wolmark, *Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer.* J Clin Oncol, 2006. **24**(23): p. 3726-34.
 55. Gnant, M., M. Filipits, R. Greil, H. Stoeger, M. Rudas, Z. Bago-Horvath, B. Mlineritsch, W. Kwasny, M. Knauer, C. Singer, R. Jakesz, P. Dubsy, F. Fitzal, R. Bartsch, G. Steger, M. Balic, S. Ressler, J.W. Cowens, J. Storhoff, S. Ferree, C. Schaper, S. Liu, C. Fesl, and T.O. Nielsen, *Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone.* Ann Oncol, 2014. **25**(2): p. 339-45.
 56. Filipits, M., T.O. Nielsen, M. Rudas, R. Greil, H. Stoger, R. Jakesz, Z. Bago-Horvath, O. Dietze, P. Regitnig, C. Gruber-Rossipal, E. Muller-Holzner, C.F. Singer, B. Mlineritsch, P. Dubsy, T. Bauernhofer, M. Hubalek, M. Knauer, H. Trapl, C. Fesl, C. Schaper, S. Ferree, S. Liu, J.W. Cowens, and M. Gnant, *The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer.* Clin Cancer Res, 2014. **20**(5): p. 1298-305.
 57. Mittal, D., M.M. Gubin, R.D. Schreiber, and M.J. Smyth, *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape.* Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 16-25.
 58. Angell, H. and J. Galon, *From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer.* Curr Opin Immunol, 2013. **25**(2): p. 261-7.
 59. Galon, J., H.K. Angell, D. Bedognetti, and F.M. Marincola, *The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures.* Immunity, 2013. **39**(1): p. 11-26.
 60. DeNardo, D.G. and L.M. Coussens, *Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression.* Breast Cancer Res, 2007. **9**(4): p. 212.
 61. Mahmoud, S.M., E.C. Paish, D.G. Powe, R.D. Macmillan, M.J. Grainge, A.H. Lee, I.O. Ellis, and A.R. Green, *Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer.* J Clin Oncol, 2011. **29**(15): p. 1949-55.
 62. Gu-Trantien, C., S. Loi, S. Garaud, C. Equeter, M. Libin, A. de Wind, M. Ravoet, H. Le Buanec, C. Sibille, G. Manfouo-Foutsop, I. Veys, B. Haibe-Kains, S.K. Singhal, S. Michiels, F. Rothe, R. Salgado, H. Duvillier, M. Ignatiadis, C. Desmedt, D. Bron, D. Larsimont, M. Piccart, C. Sotiriou, and K. Willard-Gallo, *CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival.* J Clin Invest, 2013. **123**(7): p. 2873-92.
 63. Coussens, L.M. and J.W. Pollard, *Leukocytes in mammary development and cancer.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(3).
 64. Teschendorff, A.E., S. Gomez, A. Arenas, D. El-Ashry, M. Schmidt, M. Gehrman, and C. Caldas, *Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules.* BMC Cancer, 2010. **10**: p. 604.
 65. Bates, G.J., S.B. Fox, C. Han, R.D. Leek, J.F. Garcia, A.L. Harris, and A.H. Banham, *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. **24**(34): p. 5373-80.
 66. West, N.R., S.E. Kost, S.D. Martin, K. Milne, R.J. Deleeuw, B.H. Nelson, and P.H. Watson, *Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic*

- immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer.* Br J Cancer, 2013. **108**(1): p. 155-62.
67. Qi, W., X. Huang, and J. Wang, *Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment.* Cell Immunol, 2013. **285**(1-2): p. 18-22.
 68. Wang, K., J. Xu, T. Zhang, and D. Xue, *Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: A meta-analysis.* Oncotarget, 2016. **7**(28): p. 44288-44298.
 69. Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, and F. Pages, *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.* Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
 70. Denkert, C., G. von Minckwitz, S. Darb-Esfahani, B. Lederer, B.I. Heppner, K.E. Weber, J. Budczies, J. Huober, F. Klauschen, J. Furlanetto, W.D. Schmitt, J.U. Blohmer, T. Karn, B.M. Pfitzner, S. Kummel, K. Engels, A. Schneeweiss, A. Hartmann, A. Noske, P.A. Fasching, C. Jackisch, M. van Mackelenbergh, P. Sinn, C. Schem, C. Hanusch, M. Untch, and S. Loibl, *Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy.* Lancet Oncol, 2018. **19**(1): p. 40-50.
 71. Mao, Y., Q. Qu, Y. Zhang, J. Liu, X. Chen, and K. Shen, *The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis.* PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115103.
 72. Denkert, C., S. Loibl, A. Noske, M. Roller, B.M. Muller, M. Komor, J. Budczies, S. Darb-Esfahani, R. Kronenwett, C. Hanusch, C. von Torne, W. Weichert, K. Engels, C. Solbach, I. Schrader, M. Dietel, and G. von Minckwitz, *Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.* J Clin Oncol, 2010. **28**(1): p. 105-13.
 73. Adams, S., R.J. Gray, S. Demaria, L. Goldstein, E.A. Perez, L.N. Shulman, S. Martino, M. Wang, V.E. Jones, T.J. Saphner, A.C. Wolff, W.C. Wood, N.E. Davidson, G.W. Sledge, J.A. Sparano, and S.S. Badve, *Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199.* J Clin Oncol, 2014. **32**(27): p. 2959-66.
 74. West, N.R., K. Milne, P.T. Truong, N. Macpherson, B.H. Nelson, and P.H. Watson, *Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer.* Breast Cancer Res, 2011. **13**(6): p. R126.
 75. Burstein, H.J., G. Curigliano, S. Loibl, P. Dubsy, M. Gnant, P. Poortmans, M. Colleoni, C. Denkert, M. Piccart-Gebhart, M. Regan, H.J. Senn, E.P. Winer, and B. Thurlimann, *Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019.* Ann Oncol, 2019. **30**(10): p. 1541-1557.
 76. WHO Classification of Tumours Editorial Board *Breast Tumors.* Lyon (France): International Agency for Research on Cancer, 2019.
 77. Salgado, R., C. Denkert, S. Demaria, N. Sirtaine, F. Klauschen, G. Pruneri, S. Wienert, G. Van den Eynden, F.L. Baehner, F. Penault-Llorca, E.A. Perez, E.A. Thompson, W.F. Symmans, A.L. Richardson, J. Brock, C. Criscitiello, H. Bailey, M. Ignatiadis, G. Floris, J. Sparano, Z. Kos, T. Nielsen, D.L. Rimm, K.H. Allison, J.S. Reis-Filho, S. Loibl, C. Sotiriou, G. Viale, S. Badve, S. Adams, K. Willard-Gallo, and S. Loi, *The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014.* Ann Oncol, 2015. **26**(2): p. 259-71.
 78. Denkert, C., S. Wienert, A. Poterie, S. Loibl, J. Budczies, S. Badve, Z. Bago-Horvath, A. Bane, S. Bedri, J. Brock, E. Chmielik, M. Christgen, C. Colpaert, S. Demaria, G. Van den Eynden, G. Floris, S.B. Fox, D. Gao, B. Ingold Heppner, S.R. Kim, Z. Kos, H.H. Kreipe, S.R. Lakhani, F. Penault-Llorca, G. Pruneri, N. Radosevic-Robin, D.L.

- Rimm, S.J. Schnitt, B.V. Sinn, P. Sinn, N. Sirtaine, S.A. O'Toole, G. Viale, K. Van de Vijver, R. de Wind, G. von Minckwitz, F. Klauschen, M. Untch, P.A. Fasching, T. Reimer, K. Willard-Gallo, S. Michiels, S. Loi, and R. Salgado, *Standardized evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: results of the ring studies of the international immuno-oncology biomarker working group*. *Mod Pathol*, 2016. **29**(10): p. 1155-64.
79. Gerdes, J., U. Schwab, H. Lemke, and H. Stein, *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. *Int J Cancer*, 1983. **31**(1): p. 13-20.
 80. Duchrow, M., C. Schluter, C. Wohlenberg, H.D. Flad, and J. Gerdes, *Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67*. *Cell Prolif*, 1996. **29**(1): p. 1-12.
 81. Beresford, M.J., G.D. Wilson, and A. Makris, *Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications*. *Breast Cancer Res*, 2006. **8**(6): p. 216.
 82. Bullwinkel, J., B. Baron-Luhr, A. Ludemann, C. Wohlenberg, J. Gerdes, and T. Scholzen, *Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells*. *J Cell Physiol*, 2006. **206**(3): p. 624-35.
 83. Rahmzadeh, R., G. Huttmann, J. Gerdes, and T. Scholzen, *Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis*. *Cell Prolif*, 2007. **40**(3): p. 422-30.
 84. Penault-Llorca, F. and N. Radosevich-Robin, *Ki67 assessment in breast cancer: an update*. *Pathology*, 2017. **49**(2): p. 166-171.
 85. Dowsett, M., T.O. Nielsen, R. A'Hern, J. Bartlett, R.C. Coombes, J. Cuzick, M. Ellis, N.L. Henry, J.C. Hugh, T. Lively, L. McShane, S. Paik, F. Penault-Llorca, L. Prudkin, M. Regan, J. Salter, C. Sotiriou, I.E. Smith, G. Viale, J.A. Zujewski, and D.F. Hayes, *Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group*. *J Natl Cancer Inst*, 2011. **103**(22): p. 1656-64.
 86. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
 87. Berlin, A., J.F. Castro-Mesta, L. Rodriguez-Romo, D. Hernandez-Barajas, J.F. Gonzalez-Guerrero, I.A. Rodriguez-Fernandez, G. Gonzalez-Conchas, A. Verdines-Perez, and F.E. Vera-Badillo, *Prognostic role of Ki-67 score in localized prostate cancer: A systematic review and meta-analysis*. *Urol Oncol*, 2017. **35**(8): p. 499-506.
 88. Pan, D., K. Wei, Y. Ling, S. Su, M. Zhu, and G. Chen, *The prognostic role of Ki-67/MIB-1 in cervical cancer: a systematic review with meta-analysis*. *Med Sci Monit*, 2015. **21**: p. 882-9.
 89. Tian, Y., Z. Ma, Z. Chen, M. Li, Z. Wu, M. Hong, H. Wang, R. Svatek, R. Rodriguez, and Z. Wang, *Clinicopathological and Prognostic Value of Ki-67 Expression in Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *PLoS One*, 2016. **11**(7): p. e0158891.
 90. Petrelli, F., G. Viale, M. Cabiddu, and S. Barni, *Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients*. *Breast Cancer Res Treat*, 2015. **153**(3): p. 477-91.
 91. Luporsi, E., F. Andre, F. Spyrtos, P.M. Martin, J. Jacquemier, F. Penault-Llorca, N. Tubiana-Mathieu, B. Sigal-Zafrani, L. Arnould, A. Gompel, C. Egele, B. Poulet, K.B. Clough, H. Crouet, A. Fourquet, J.P. Lefranc, C. Mathelin, N. Rouyer, D. Serin, M. Spielmann, M. Haugh, M.P. Chenard, E. Brain, P. de Cremoux, and J.P. Bellocq, *Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **132**(3): p. 895-915.
 92. de Azambuja, E., F. Cardoso, G. de Castro, Jr., M. Colozza, M.S. Mano, V. Durbecq, C. Sotiriou, D. Larsimont, M.J. Piccart-Gebhart, and M. Paesmans, *Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients*. *Br J Cancer*, 2007. **96**(10): p. 1504-13.
 93. Fasching, P.A., K. Heusinger, L. Haeberle, M. Niklos, A. Hein, C.M. Bayer, C. Rauh, R. Schulz-Wendtland, M.R. Bani, M. Schrauder, L. Kahmann, M.P. Lux, J.D. Strehl,

- A. Hartmann, A. Dimmler, M.W. Beckmann, and D.L. Wachter, *Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 486.
94. Yerushalmi, R., R. Woods, P.M. Ravdin, M.M. Hayes, and K.A. Gelmon, *Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential*. Lancet Oncol, 2010. **11**(2): p. 174-83.
 95. Gluz, O., U.A. Nitz, M. Christgen, R.E. Kates, S. Shak, M. Clemens, S. Kraemer, B. Aktas, S. Kuemmel, T. Reimer, M. Kusche, V. Heyl, F. Lorenz-Salehi, M. Just, D. Hofmann, T. Degenhardt, C. Liedtke, C. Svedman, R. Wuerstlein, H.H. Kreipe, and N. Harbeck, *West German Study Group Phase III PlanB Trial: First Prospective Outcome Data for the 21-Gene Recurrence Score Assay and Concordance of Prognostic Markers by Central and Local Pathology Assessment*. J Clin Oncol, 2016. **34**(20): p. 2341-9.
 96. Nitz, U., O. Gluz, J. Huober, H.H. Kreipe, R.E. Kates, A. Hartmann, R. Erber, Z. Moustafa, M. Scholz, B. Lisboa, S. Mohrmann, V. Mobus, D. Augustin, G. Hoffmann, E. Weiss, S. Bohmer, R. Kreienberg, A. Du Bois, D. Sattler, C. Thomssen, M. Kiechle, F. Janicke, D. Wallwiener, N. Harbeck, and W. Kuhn, *Final analysis of the prospective WSG-AGO EC-Doc versus FEC phase III trial in intermediate-risk (pN1) early breast cancer: efficacy and predictive value of Ki67 expression*. Ann Oncol, 2017. **28**(11): p. 2899.
 97. Sonnenblick, A., P.A. Francis, H.A. Azim, Jr., E. de Azambuja, B. Nordenskjold, J. Gutierrez, E. Quinaux, M.G. Mastropasqua, L. Ameye, M. Anderson, A. Lluch, M. Gnant, A. Goldhirsch, A. Di Leo, A. Barnadas, H. Cortes-Funes, M. Piccart, and J. Crown, *Final 10-year results of the Breast International Group 2-98 phase III trial and the role of Ki67 in predicting benefit of adjuvant docetaxel in patients with oestrogen receptor positive breast cancer*. Eur J Cancer, 2015. **51**(12): p. 1481-9.
 98. Criscitiello, C., D. Disalvatore, M. De Laurentiis, L. Gelao, L. Fumagalli, M. Locatelli, V. Bagnardi, N. Rotmensz, A. Esposito, I. Minchella, S. De Placido, M. Santangelo, G. Viale, A. Goldhirsch, and G. Curigliano, *High Ki-67 score is indicative of a greater benefit from adjuvant chemotherapy when added to endocrine therapy in luminal B HER2 negative and node-positive breast cancer*. Breast, 2014. **23**(1): p. 69-75.
 99. Viale, G., M.M. Regan, M.G. Mastropasqua, F. Maffini, E. Maiorano, M. Colleoni, K.N. Price, R. Golouh, T. Perin, R.W. Brown, A. Kovacs, K. Pillay, C. Ohlschlegel, B.A. Gusterson, M. Castiglione-Gertsch, R.D. Gelber, A. Goldhirsch, and A.S. Coates, *Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(3): p. 207-12.
 100. Dumontet, C., M. Krajewska, I. Treilleux, J.R. Mackey, M. Martin, M. Rupin, L. Lafanechere, and J.C. Reed, *BCIRG 001 molecular analysis: prognostic factors in node-positive breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(15): p. 3988-97.
 101. Denkert, C., J. Budczies, G. von Minckwitz, S. Wienert, S. Loibl, and F. Klauschen, *Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer*. Breast, 2015. **24 Suppl 2**: p. S67-72.
 102. Varga, Z., J. Diebold, C. Dommann-Scherrer, H. Frick, D. Kaup, A. Noske, E. Obermann, C. Ohlschlegel, B. Padberg, C. Rakozy, S. Sancho Oliver, S. Schobinger-Clement, H. Schreiber-Facklam, G. Singer, C. Tapia, U. Wagner, M.G. Mastropasqua, G. Viale, and H.A. Lehr, *How reliable is Ki-67 immunohistochemistry in grade 2 breast carcinomas? A QA study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37379.
 103. Mengel, M., R. von Wasielewski, B. Wiese, T. Rudiger, H.K. Muller-Hermelink, and H. Kreipe, *Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial*. J Pathol, 2002. **198**(3): p. 292-9.
 104. Varga, Z., E. Cassoly, Q. Li, C. Oehlschlegel, C. Tapia, H.A. Lehr, D. Klingbiel, B. Thurlimann, and T. Ruhstaller, *Standardization for Ki-67 assessment in moderately*

- differentiated breast cancer. A retrospective analysis of the SAKK 28/12 study.* PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123435.
105. Leung, S.C.Y., T.O. Nielsen, L. Zabaglo, I. Arun, S.S. Badve, A.L. Bane, J.M.S. Bartlett, S. Borgquist, M.C. Chang, A. Dodson, R.A. Enos, S. Fineberg, C.M. Focke, D. Gao, A.M. Gown, D. Grabau, C. Gutierrez, J.C. Hugh, Z. Kos, A.V. Laenholm, M.G. Lin, M.G. Mastropasqua, T. Moriya, S. Nofech-Mozes, C.K. Osborne, F.M. Penault-Llorca, T. Piper, T. Sakatani, R. Salgado, J. Starczynski, G. Viale, D.F. Hayes, L.M. McShane, and M. Dowsett, *Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration.* NPJ Breast Cancer, 2016. **2**: p. 16014.
 106. Wienert, S., D. Heim, K. Saeger, A. Stenzinger, M. Beil, P. Hufnagl, M. Dietel, C. Denkert, and F. Klauschen, *Detection and segmentation of cell nuclei in virtual microscopy images: a minimum-model approach.* Sci Rep, 2012. **2**: p. 503.
 107. Klauschen, F., S. Wienert, W.D. Schmitt, S. Loibl, B. Gerber, J.U. Blohmer, J. Huober, T. Rudiger, E. Erbstosser, K. Mehta, B. Lederer, M. Dietel, C. Denkert, and G. von Minckwitz, *Standardized Ki67 Diagnostics Using Automated Scoring--Clinical Validation in the GeparTrio Breast Cancer Study.* Clin Cancer Res, 2015. **21**(16): p. 3651-7.
 108. Patricia Cortazar, e.a., *Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis.* Lancet, 2014. **384**(9938): p. 164-172.
 109. Amoroso, V., D. Generali, T. Buchholz, M. Cristofanilli, R. Pedersini, G. Curigliano, M.G. Daidone, S. Di Cosimo, M. Dowsett, S. Fox, A.L. Harris, A. Makris, L. Vassalli, A. Ravelli, M.R. Cappelletti, C. Hatzis, C.A. Hudis, P. Pedrazzoli, A. Sapino, V. Semiglazov, G. Von Minckwitz, E.L. Simoncini, M.A. Jacobs, P. Barry, T. Kühn, S. Darby, K. Hermelink, F. Symmans, A. Gennari, G. Schiavon, L. Dogliotti, A. Berruti, and A. Bottini, *International Expert Consensus on Primary Systemic Therapy in the Management of Early Breast Cancer: Highlights of the Fifth Symposium on Primary Systemic Therapy in the Management of Operable Breast Cancer, Cremona, Italy (2013).* J Natl Cancer Inst Monogr, 2015. **2015**(51): p. 90-6.
 110. Houssami, N., P. Macaskill, G. von Minckwitz, M.L. Marinovich, and E. Mamounas, *Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy.* Eur J Cancer, 2012. **48**(18): p. 3342-54.
 111. von Minckwitz, G., M. Untch, E. Nüesch, S. Loibl, M. Kaufmann, S. Kümmel, P.A. Fasching, W. Eiermann, J.U. Blohmer, S.D. Costa, K. Mehta, J. Hilfrich, C. Jackisch, B. Gerber, A. du Bois, J. Huober, C. Hanusch, G. Konecny, W. Fett, E. Stickeler, N. Harbeck, V. Müller, and P. Jüni, *Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials.* Breast Cancer Res Treat, 2011. **125**(1): p. 145-56.
 112. Symmans, W.F., F. Peintinger, C. Hatzis, R. Rajan, H. Kuerer, V. Valero, L. Assad, A. Poniecka, B. Hennessy, M. Green, A.U. Buzdar, S.E. Singletary, G.N. Hortobagyi, and L. Pusztai, *Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy.* J Clin Oncol, 2007. **25**(28): p. 4414-22.
 113. von Minckwitz, G., M. Rezai, P.A. Fasching, J. Huober, H. Tesch, I. Bauerfeind, J. Hilfrich, H. Eidtmann, B. Gerber, C. Hanusch, J.U. Blohmer, S.D. Costa, C. Jackisch, S. Paepke, A. Schneeweiss, S. Kummel, C. Denkert, K. Mehta, S. Loibl, and M. Untch, *Survival after adding capecitabine and trastuzumab to neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy for primary breast cancer (GBG 40--GeparQuattro).* Ann Oncol, 2014. **25**(1): p. 81-9.
 114. von Minckwitz, G., S. Loibl, M. Untch, H. Eidtmann, M. Rezai, P.A. Fasching, H. Tesch, H. Eggemann, I. Schrader, K. Kittel, C. Hanusch, J. Huober, C. Solbach, C. Jackisch, G. Kunz, J.U. Blohmer, M. Hauschild, T. Fehm, V. Nekljudova, and B. Gerber, *Survival after neoadjuvant chemotherapy with or without bevacizumab or everolimus for HER2-negative primary breast cancer (GBG 44-GeparQuinto)dagger.* Ann Oncol, 2014. **25**(12): p. 2363-72.

115. von Minckwitz, G., A. Schneeweiss, S. Loibl, C. Salat, C. Denkert, M. Rezai, J.U. Blohmer, C. Jackisch, S. Paepke, B. Gerber, D.M. Zahm, S. Kummel, H. Eidtmann, P. Klare, J. Huober, S. Costa, H. Tesch, C. Hanusch, J. Hilfrich, F. Khandan, P.A. Fasching, B.V. Sinn, K. Engels, K. Mehta, V. Nekljudova, and M. Untch, *Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(7): p. 747-56.
116. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *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. **19**(5): p. 403-10.
117. Goorts, B., T.J. van Nijnatten, L. de Munck, M. Moosdorff, E.M. Heuts, M. de Boer, M.B. Lobbes, and M.L. Smidt, *Clinical tumor stage is the most important predictor of pathological complete response rate after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients*. *Breast Cancer Res Treat*, 2017. **163**(1): p. 83-91.
118. Kong, X., M.S. Moran, N. Zhang, B. Haffty, and Q. Yang, *Meta-analysis confirms achieving pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy predicts favourable prognosis for breast cancer patients*. *Eur J Cancer*, 2011. **47**(14): p. 2084-90.
119. Dieci, M.V., C. Criscitiello, A. Goubar, G. Viale, P. Conte, V. Guarneri, G. Ficarra, M.C. Mathieu, S. Delalogue, G. Curigliano, and F. Andre, *Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study*. *Ann Oncol*, 2015. **26**(7): p. 1518.
120. Dieci, M.V., C. Criscitiello, A. Goubar, G. Viale, P. Conte, V. Guarneri, G. Ficarra, M.C. Mathieu, S. Delalogue, G. Curigliano, and F. Andre, *Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(3): p. 611-8.
121. Pelekanou, V., D.E. Carvajal-Hausdorf, M. Altan, B. Wasserman, C. Carvajal-Hausdorf, H. Wimberly, J. Brown, D. Lannin, L. Pusztai, and D.L. Rimm, *Effect of neoadjuvant chemotherapy on tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in breast cancer and its clinical significance*. *Breast Cancer Res*, 2017. **19**(1): p. 91.
122. Issa-Nummer, Y., S. Darb-Esfahani, S. Loibl, G. Kunz, V. Nekljudova, I. Schrader, B.V. Sinn, H.U. Ulmer, R. Kronenwett, M. Just, T. Kuhn, K. Diebold, M. Untch, F. Holms, J.U. Blohmer, J.O. Habek, M. Dietel, F. Overkamp, P. Krabisch, G. von Minckwitz, and C. Denkert, *Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer--a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e79775.
123. Miyashita, M., H. Sasano, K. Tamaki, H. Hirakawa, Y. Takahashi, S. Nakagawa, G. Watanabe, H. Tada, A. Suzuki, N. Ohuchi, and T. Ishida, *Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study*. *Breast Cancer Res*, 2015. **17**: p. 124.
124. Goto, W., S. Kashiwagi, Y. Asano, K. Takada, K. Takahashi, T. Hatano, T. Takashima, S. Tomita, H. Motomura, M. Ohsawa, K. Hirakawa, and M. Ohira, *Predictive value of improvement in the immune tumour microenvironment in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy*. *ESMO Open*, 2018. **3**(6): p. e000305.
125. Chan, M.S., S.F. Chen, S.J. Felizola, L. Wang, N. Nemoto, K. Tamaki, T. Ishida, L.W. Chow, N. Ohuchi, and H. Sasano, *Correlation of tumor-infiltrative lymphocyte subtypes alteration with neoangiogenesis before and after neoadjuvant chemotherapy treatment in breast cancer patients*. *Int J Biol Markers*, 2014. **29**(3): p. e193-203.

126. Galluzzi, L., A. Buque, O. Kepp, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents*. *Cancer Cell*, 2015. **28**(6): p. 690-714.
127. Casares, N., M.O. Pequignot, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, A. Hamai, S. Hervas-Stubbs, M. Obeid, F. Coutant, D. Metivier, E. Pichard, P. Aucoeur, G. Pierron, C. Garrido, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death*. *J Exp Med*, 2005. **202**(12): p. 1691-701.
128. Tokes, A.M., O. Ruzs, G. Cserni, E. Toth, G. Rubovszky, T. Tokes, L. Vizkeleti, L. Reiniger, R. Koszo, Z. Kahan, J. Kulka, M. Donia, A. Voros, and Z. Szallasi, *Influence of mutagenic versus non-mutagenic pre-operative chemotherapy on the immune infiltration of residual breast cancer*. *Acta Oncol*, 2019: p. 1-9.
129. Honkanen, T.J., T. Moilanen, P. Karihtala, S. Tiainen, P. Auvinen, J.P. Vayrynen, M. Makinen, and J.P. Koivunen, *Prognostic and predictive role of spatially positioned tumour infiltrating lymphocytes in metastatic HER2 positive breast cancer treated with trastuzumab*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 18027.
130. Chan, M.S., L. Wang, S.J. Felizola, T. Ueno, M. Toi, W. Loo, L.W. Chow, T. Suzuki, and H. Sasano, *Changes of tumor infiltrating lymphocyte subtypes before and after neoadjuvant endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer patients--an immunohistochemical study of Cd8+ and Foxp3+ using double immunostaining with correlation to the pathobiological response of the patients*. *Int J Biol Markers*, 2012. **27**(4): p. e295-304.
131. Dong, H., S.E. Strome, D.R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D.B. Flies, P.C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V.A. Lennon, E. Celis, and L. Chen, *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. *Nat Med*, 2002. **8**(8): p. 793-800.
132. Robert, C., G.V. Long, B. Brady, C. Dutriaux, M. Maio, L. Mortier, J.C. Hassel, P. Rutkowski, C. McNeil, E. Kalinka-Warzocho, K.J. Savage, M.M. Hernberg, C. Lebbe, J. Charles, C. Mihalciou, V. Chiarion-Sileni, C. Mauch, F. Cognetti, A. Arance, H. Schmidt, D. Schadendorf, H. Gogas, L. Lundgren-Eriksson, C. Horak, B. Sharkey, I.M. Waxman, V. Atkinson, and P.A. Ascierto, *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(4): p. 320-30.
133. Adams, S., P. Schmid, H.S. Rugo, E.P. Winer, D. Loirat, A. Awada, D.W. Cescon, H. Iwata, M. Campone, R. Nanda, R. Hui, G. Curigliano, D. Toppmeyer, J. O'Shaughnessy, S. Loi, S. Paluch-Shimon, A.R. Tan, D. Card, J. Zhao, V. Karantz, and J. Cortes, *Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study*. *Ann Oncol*, 2019. **30**(3): p. 397-404.
134. Schmid, P., J. Cortes, L. Pusztai, H. McArthur, S. Kummel, J. Bergh, C. Denkert, Y.H. Park, R. Hui, N. Harbeck, M. Takahashi, T. Foukakis, P.A. Fasching, F. Cardoso, M. Untch, L. Jia, V. Karantz, J. Zhao, G. Aktan, R. Dent, and J. O'Shaughnessy, *Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2020. **382**(9): p. 810-821.
135. Sistigu, A., T. Yamazaki, E. Vacchelli, K. Chaba, D.P. Enot, J. Adam, I. Vitale, A. Goubar, E.E. Baracco, C. Remedios, L. Fend, D. Hannani, L. Aymeric, Y. Ma, M. Niso-Santano, O. Kepp, J.L. Schultze, T. Tuting, F. Belardelli, L. Bracci, V. La Sorsa, G. Ziccheddu, P. Sestili, F. Urbani, M. Delorenzi, M. Lacroix-Triki, V. Quidville, R. Conforti, J.P. Spano, L. Pusztai, V. Poirier-Colame, S. Delalogue, F. Penault-Llorca, S. Ladoire, L. Arnould, J. Cyrta, M.C. Dessoliers, A. Eggermont, M.E. Bianchi, M. Pittet, C. Engblom, C. Pfirschke, X. Preville, G. Uze, R.D. Schreiber, M.T. Chow, M.J. Smyth, E. Proietti, F. Andre, G. Kroemer, and L. Zitvogel, *Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy*. *Nat Med*, 2014. **20**(11): p. 1301-9.
136. Alizadeh, D., M. Trad, N.T. Hanke, C.B. Larmonier, N. Janikashvili, B. Bonnotte, E. Katsanis, and N. Larmonier, *Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells*

- and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res*, 2014. **74**(1): p. 104-18.
137. Scurr, M., T. Pembroke, A. Bloom, D. Roberts, A. Thomson, K. Smart, H. Bridgeman, R. Adams, A. Brewster, R. Jones, S. Gwynne, D. Blount, R. Harrop, R. Hills, A. Gallimore, and A. Godkin, *Low-Dose Cyclophosphamide Induces Antitumor T-Cell Responses, which Associate with Survival in Metastatic Colorectal Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2017. **23**(22): p. 6771-6780.
 138. Wan, S., S. Pestka, R.G. Jubin, Y.L. Lyu, Y.C. Tsai, and L.F. Liu, *Chemotherapeutics and radiation stimulate MHC class I expression through elevated interferon-beta signaling in breast cancer cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e32542.
 139. de Biasi, A.R., J. Villena-Vargas, and P.S. Adusumilli, *Cisplatin-induced antitumor immunomodulation: a review of preclinical and clinical evidence*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(21): p. 5384-91.
 140. Voorwerk, L., M. Slagter, H.M. Horlings, K. Sikorska, K.K. van de Vijver, M. de Maaker, I. Nederlof, R.J.C. Kluin, S. Warren, S. Ong, T.G. Wiersma, N.S. Russell, F. Lalezari, P.C. Schouten, N.A.M. Bakker, S.L.C. Ketelaars, D. Peters, C.A.H. Lange, E. van Werkhoven, H. van Tinteren, I.A.M. Mandjes, I. Kemper, S. Onderwater, M. Chalabi, S. Wilgenhof, J. Haanen, R. Salgado, K.E. de Visser, G.S. Sonke, L.F.A. Wessels, S.C. Linn, T.N. Schumacher, C.U. Blank, and M. Kok, *Immune induction strategies in metastatic triple-negative breast cancer to enhance the sensitivity to PD-1 blockade: the TONIC trial*. *Nat Med*, 2019. **25**(6): p. 920-928.
 141. Schmid, P., S. Adams, H.S. Rugo, A. Schneeweiss, C.H. Barrios, H. Iwata, V. Dieras, R. Hegg, S.A. Im, G. Shaw Wright, V. Henschel, L. Molinero, S.Y. Chui, R. Funke, A. Husain, E.P. Winer, S. Loi, and L.A. Emens, *Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2018. **379**(22): p. 2108-2121.
 142. Hodi, F.S., S.J. O'Day, D.F. McDermott, R.W. Weber, J.A. Sosman, J.B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J.C. Hassel, W. Akerley, A.J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J.M. Vaubel, G.P. Linette, D. Hogg, C.H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J.I. Clark, J.D. Wolchok, J.S. Weber, J. Tian, M.J. Yellin, G.M. Nichol, A. Hoos, and W.J. Urba, *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(8): p. 711-23.
 143. Krummel, M.F. and J.P. Allison, *CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation*. *J Exp Med*, 1995. **182**(2): p. 459-65.
 144. Burcombe, R., G.D. Wilson, M. Dowsett, I. Khan, P.I. Richman, F. Daley, S. Detre, and A. Makris, *Evaluation of Ki-67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2006. **8**(3): p. R31.
 145. Sharma, S., K.R. Hiran, K. Pavithran, and D.K. Vijaykumar, *A pilot study to assess the feasibility of evaluation of markers of response to chemotherapy at one day & 21 days after first cycle of chemotherapy in carcinoma of breast: a prospective non-randomized observational study*. *World J Surg Oncol*, 2009. **7**: p. 35.
 146. Chuah, B.Y., T. Putti, M. Salto-Tellez, A. Charlton, P. Iau, S.A. Buhari, C.I. Wong, S.H. Tan, A.L. Wong, C.W. Chan, B.C. Goh, and S.C. Lee, *Serial changes in the expression of breast cancer-related proteins in response to neoadjuvant chemotherapy*. *Ann Oncol*, 2011. **22**(8): p. 1748-54.
 147. Magbana, M.J., D.M. Wolf, C. Yau, S.E. Davis, J. Crothers, A. Au, C.M. Haqq, C. Livasy, H.S. Rugo, L. Esserman, J.W. Park, and L.J. van 't Veer, *Serial expression analysis of breast tumors during neoadjuvant chemotherapy reveals changes in cell cycle and immune pathways associated with recurrence and response*. *Breast Cancer Res*, 2015. **17**: p. 73.
 148. von Minckwitz, G., W.D. Schmitt, S. Loibl, B.M. Muller, J.U. Blohmer, B.V. Sinn, H. Eidtmann, W. Eiermann, B. Gerber, H. Tesch, J. Hilfrich, J. Huober, T. Fehm, J. Barinoff, T. Rudiger, E. Erbstoesser, P.A. Fasching, T. Karn, V. Muller, C. Jackisch,

- and C. Denkert, *Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(16): p. 4521-31.
149. Matsubara, N., H. Mukai, M. Masumoto, M. Sasaki, Y. Naito, S. Fujii, and N. Wada, *Survival outcome and reduction rate of Ki-67 between pre- and post-neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients with non-pCR*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **147**(1): p. 95-102.
 150. Li, L., D. Han, X. Wang, Q. Wang, J. Tian, J. Yao, L. Yuan, K. Qian, Q. Zou, W. Yi, E. Zhou, and K. Yang, *Prognostic values of Ki-67 in neoadjuvant setting for breast cancer: a systematic review and meta-analysis*. Future Oncol, 2017. **13**(11): p. 1021-1034.
 151. Symmans, W.F., C. Wei, R. Gould, X. Yu, Y. Zhang, M. Liu, A. Walls, A. Bousamra, M. Ramineni, B. Sinn, K. Hunt, T.A. Buchholz, V. Valero, A.U. Buzdar, W. Yang, A.M. Brewster, S. Moulder, L. Pusztai, C. Hatzis, and G.N. Hortobagyi, *Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype*. J Clin Oncol, 2017. **35**(10): p. 1049-1060.
 152. Masuda, N., S.J. Lee, S. Ohtani, Y.H. Im, E.S. Lee, I. Yokota, K. Kuroi, S.A. Im, B.W. Park, S.B. Kim, Y. Yanagita, S. Ohno, S. Takao, K. Aogi, H. Iwata, J. Jeong, A. Kim, K.H. Park, H. Sasano, Y. Ohashi, and M. Toi, *Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy*. N Engl J Med, 2017. **376**(22): p. 2147-2159.
 153. von Minckwitz, G., C.S. Huang, M.S. Mano, S. Loibl, E.P. Mamounas, M. Untch, N. Wolmark, P. Rastogi, A. Schneeweiss, A. Redondo, H.H. Fischer, W. Jacot, A.K. Conlin, C. Arce-Salinas, I.L. Wapnir, C. Jackisch, M.P. DiGiovanna, P.A. Fasching, J.P. Crown, P. Wülfing, Z. Shao, E. Rota Caremoli, H. Wu, L.H. Lam, D. Tesarowski, M. Smitt, H. Douthwaite, S.M. Singel, and C.E. Geyer, Jr., *Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer*. N Engl J Med, 2019. **380**(7): p. 617-628.
 154. Sheri, A., I.E. Smith, S.R. Johnston, R. A'Hern, A. Nerurkar, R.L. Jones, M. Hills, S. Detre, S.E. Pinder, W.F. Symmans, and M. Dowsett, *Residual proliferative cancer burden to predict long-term outcome following neoadjuvant chemotherapy*. Ann Oncol, 2015. **26**(1): p. 75-80.
 155. Asano, Y., S. Kashiwagi, W. Goto, K. Takada, K. Takahashi, T. Hatano, S. Noda, T. Takashima, N. Onoda, S. Tomita, H. Motomura, M. Ohsawa, K. Hirakawa, and M. Ohira, *Prediction of survival after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer by evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 888.
 156. von Minckwitz, G., S. Kummel, P. Vogel, C. Hanusch, H. Eidtmann, J. Hilfrich, B. Gerber, J. Huober, S.D. Costa, C. Jackisch, S. Loibl, K. Mehta, and M. Kaufmann, *Neoadjuvant vinorelbine-capecitabine versus docetaxel-doxorubicin-cyclophosphamide in early nonresponsive breast cancer: phase III randomized GeparTrio trial*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(8): p. 542-51.
 157. von Minckwitz, J.U.B., S.D. Costa, C. Denkert, H. Eidtmann, W. Eiermann, et al., *Neoadjuvant chemotherapy adapted by interim response improves overall survival of primary breast cancer patients – results of the GeparTrio trial*. Cancer Res, 2011. **71**: p. 103.
 158. Smith, I.C., S.D. Heys, A.W. Hutcheon, I.D. Miller, S. Payne, F.J. Gilbert, A.K. Ah-See, O. Eremin, L.G. Walker, T.K. Sarkar, S.P. Eggleton, and K.N. Ogston, *Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel*. J Clin Oncol, 2002. **20**(6): p. 1456-66.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katharina Sychra, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Neoadjuvante Chemotherapie beim Mammakarzinom - Bestimmung von Ki-67 und tumorinfiltrierenden Lymphozyten in intermediären Biopsien / neoadjuvant chemotherapy in breast cancer – evaluation of Ki-67 and tumorinfiltrating lymphocytes in intermediate biopsies selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, 02.10.2020

Katharina Sychra

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Hypoxia-mediated alterations and their role in the HER-2/neuregulated CREB status and localization; Steven A, Leisz S, **Sychra K**, Hiebl B, Wickenhauser C, Mougiakakos D, Kiessling R, Denkert C, Seliger B. Oncotarget, 2016

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Carsten Denkert für die Überlassung des Themas und die sehr gute, stets herzliche und motivierende Betreuung in allen Phasen der Arbeit.

Weiters möchte ich mich bei Dr. med. Bruno Sinn für seine Betreuung und Hilfe bedanken. Dem Team der GBG Studiengruppe, besonders Frau Prof. Sibylle Loibl, möchte ich für die Bereitstellung der Proben und der Daten, aus den erwähnten Studien, danken.

Für interessante Anregungen und Diskussionen möchte ich mich bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe bedanken. Für die Hilfe beim Erlernen der praktischen Fähigkeiten im Labor gilt besonderer Dank Ines Koch und Petra Wachs.

Für die stete Motivation und Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken.