

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Prognostische Relevanz von tumorinfiltrierenden
Plasmazellen beim triple-negativem Mammakarzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Natali Riedel
aus Talgar (Kasachstan)

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

25. Mai 2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	3
1 Einleitung	5
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms	5
1.2 Maligne Tumoren der Mamma.....	6
1.3 Pathogenese des Mammakarzinoms	7
1.4 Risikofaktoren	7
1.5 Die Rolle des Immunsystems in Tumoren.....	11
1.5.1. Die Rolle der B-/Plasma-Zellen.....	11
1.5.1.1 Immunglobulin kappa C (Igκc) als B-Zell-Marker	12
1.5.1.2 CD38 als Plasmazell-Marker	13
1.5.2. Die Rolle Zytotoxischer T-Zellen.....	13
1.6 Therapiemöglichkeiten beim triple-negativem Mammakarzinom.....	15
1.7 Aktueller Forschungsstand zu prognostischen Faktoren.....	17
1.8 Ziel und Fragestellung der Arbeit	20
2 Methodik	22
2.1 Patientenkollektiv	22
2.2 Ablauf.....	23
2.3 Reagenz und Materialien	24
2.4 Immunhistochemie.....	26
2.5 Follow-Up.....	28
2.6 Statistische Methoden.....	29

3	Ergebnisse.....	30
3.1	Patientencharakteristika	30
3.2	Krankheitsverlauf.....	33
3.3	Überlebenszeitanalyse mit Kaplan-Meier.....	35
3.4	Prognostische Analyse mit Cox Regressionen	40
3.4.1	Uni- und multivariate Cox Regression von IgκC und CD38 im Hinblick auf das Gesamtüberleben (OVS).....	40
3.4.2	Uni- und multivariate Cox Regression von IgκC und CD38 im Hinblick auf das metastasenfrie Überleben (MFS).....	44
3.5	Ist die Stärke der Infiltration von Plasmazellen im Tumor abhängig von der Stärke des Proliferationsmarkers Ki67?.....	47
3.6	Ist die Stärke der Infiltration von Plasmazellen im Tumor abhängig vom Grading des Tumors?	49
4.	Diskussion.....	50
4.1.	Gesamtüberleben (OVS) und das metastasenfrie Überleben (MFS) in Abhängigkeit von der Stärke der Infiltration mit IgκC- und CD38-positiven Plasmazellen.....	50
4.2.	Prognostische Bedeutung von IgκC, CD38, Alter, Tumorgröße, Nodalstatus und Grading.....	52
4.3.	Abhängigkeit der Stärke der Infiltration mit IgκC- und CD38- positiven Plasmazellen vom Proliferationsmarker Ki67 und vom Grading	54
4.4.	Stärken und Schwächen der Studie	56
5.	Zusammenfassung.....	58
6.	Literaturverzeichnis	60
7.	Danksagung.....	63

8. Lebenslauf.....	64
--------------------	----

Abkürzungsverzeichnis

AGO: Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Gynäkologie

ATM: Ataxia teleangiectatica Mutation, DNA-Reparatur

AKT1: Serin/Threoninkinase

AGO: Arbeitsgemeinschaft Gynäkologischer Onkologie

BARD1: BRCA1 assoziiertes RING-Domänenprotein 1, DNA-Reparatur

BRCA1 und BRCA2: Breast Cancer 1 oder 2, DNA-Reparatur

CHEK2: Kontrollpunkt Kinase 2, DNA-Reparatur

DDFS: distant disease free survival

ER: Estrogenrezeptor/Östrogenrezeptor

FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

IGHM: Immunoglobulin Heavy Constant Mu

IGHG1: Immunoglobulin Heavy Constant Gamma 1

IARC: International Agency for Research on Cancer

MHC-I/-II: major histocompatibility complex I, -II

MFS: metastasis free survival

OVS: overall survival

PARP: Poly-ADP-Ribose-Polymerase

pCR: pathologische Komplettremission

PCR: Polymerase-chain-reaction

PD-L1: programmed cell death ligand - 1

PD1: programmed cell death Protein 1

PIK3CA: Phosphatidylinositol 3-Kinase

PR: Progesteronrezeptor

PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

RAD51C und RAD51D: Proteine zur DNA-Reparatur

SPSS: Statistic Package for Sozial Sciences

TNM-Klassifikation: T: Tumor-, N: Nodes-, M: Metastase-Klassifikation

WHO: World Health Organisation

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1: Risikofaktoren zur Entstehung eines Mammakarzinoms

Abb. 2: Tumor-Immunsystem Kreislauf

Abb. 3: Immunhistochemische Stärke der Infiltration mit IgκC, Score 0 bis 3

Abb. 4: Fragebogen

Abb. 5: Absolute Häufigkeitsverteilung des Alters bei Diagnosestellung

Abb. 6: Anteil der Patientinnen mit BRCA-Mutation in Prozent

Abb. 7: Anteil der IgκC-positiven triple-negativen Mammakarzinome in Prozent (0: geringe, 1: starke Infiltration)

Abb. 8: Anteil der CD38-positiven triple-negativen Mammakarzinome in Prozent (0: geringe, 1: starke Infiltration)

Abb. 9: Status zum letzten Beobachtungszeitraum mit Anteilen in Prozent

Abb. 10: Anteil der Patientinnen in absoluten Zahlen mit/ohne adjuvante Chemotherapie

Abb. 11: Anteil der Patientinnen in Prozent mit/ohne Metastasen

Abb. 12: Anteil der Patientinnen in Prozent mit/ohne Rezidiv

Abb. 13: Kaplan-Meier Darstellung. Gesamtüberlebenszeit in Monaten, Überlebenszeitwahrscheinlichkeit. Patientinnen mit geringen/starken Infiltration der Tumoren mit IgκC-positiven Plasmazellen

Abb. 14: Kaplan-Meier Darstellung. Gesamtüberlebenszeit in Monaten, Überlebenswahrscheinlichkeit.

Patientinnen mit geringen/starken Infiltration der Tumoren mit CD38-positiven Plasmazellen

Abb. 15: Kaplan-Meier Darstellung. Metastasenfreie Überlebenszeit in Monaten, Metastasenfreie Überlebenswahrscheinlichkeit.

Patientinnen mit geringen/starken Infiltration der Tumoren mit IgκC-positiven Plasmazellen

Abb. 16: Kaplan-Meier Darstellung. Metastasenfreie Überlebenszeit in Monaten, Metastasenfreie Überlebenswahrscheinlichkeit.

Patientinnen mit geringen/starken Infiltration der Tumoren mit CD38-positiven Plasmazellen

Abb. 17: Effektstärke von CD38-positiven triple-negativen Mammakarzinomen Score 0 bis 3 auf den Proliferationsmarker Ki67 in Prozent

Tabellen

Tabelle 1: Patientenkollektiv mit Merkmalen (absolute und relative Häufigkeiten)

Tabelle 2: Reagenz und Materialien

Tabelle 3: Cox Regression Univariate Analyse Gesamtüberleben

Tabelle 4: Cox Regression Multivariate Analyse Gesamtüberleben mit IgκC

Tabelle 5: Cox Regression Multivariate Analyse Gesamtüberleben mit CD38

Tabelle 6: Cox Regression Univariate Analyse metastasenfreies Überleben

Tabelle 7: Cox-Regression Multivariate Analyse metastasenfreies Überleben mit IgκC

Tabelle 8: Cox-Regression Multivariate Analyse metastasenfreies Überleben mit CD38

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Die internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) gehört zu der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und veröffentlichte im Jahre 2018 die sogenannte GLOBACAN mit Zahlen zur Inzidenz und Mortalität von 36 Karzinomen in 185 Ländern.

Bei den Frauen dominierte in 154 Ländern der Brustkrebs und in 28 Ländern das Zervixkarzinom (z.B. in Bolivien). In 103 Ländern starben die meisten Frauen an den Folgen von Brustkrebs. In 42 Ländern war das Zervixkarzinom (z.B. Südafrika) und in 28 Ländern der Lungenkrebs (z.B. Kanada) die häufigste Todesursache unter den Karzinomen bei Frauen. Die weltweite Prävalenz von Brustkrebserkrankungen lag bei 2.26 Millionen im Jahr 2020 (www.who.int. am 15.08.2021). Bray et al. berechneten in Australien und Neuseeland die höchste Inzidenz mit 94.2 pro 100.000 für Brustkrebs gefolgt von West- und Nord-Europa. Dabei zeigte sich in West-Europa eine auffallend hohe Inzidenz in Belgien. Bei der Mortalität fällt eine geringe Schwankungsbreite in den Zahlen auf. Die höchste Anzahl von Frauen, die an Brustkrebs verstarben, findet sich im Fidschi Staat im Südpazifik [1].

In Deutschland ist Brustkrebs mit ca. 69 000 Neuerkrankungen jährlich ebenfalls die häufigste Krebserkrankung bei der Frau. Im Vergleich zu anderen Ländern steht Deutschland an achter Stelle. Das Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch Instituts in Berlin veröffentlichte dazu eine zuletzt im Jahr 2020 korrigierte Version mit statistischen Daten zum Brustkrebs bezogen auf Deutschland von 1999 bis 2016/2017 mit einer Prognose bis 2020 (krebsdaten.de. am 07.07.2021). Stützend auf diesen Daten erkrankt jede 8. Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Bei den gesamten Neuerkrankungen jährlich betrifft etwa 1% das männliche Geschlecht. Je älter der Mann ist, umso häufiger tritt der Brustkrebs auf und das Risiko erreicht im Alter von über 85 Jahren seinen Höhepunkt.

Das Alter der Frau bei Auftreten der Erkrankung ist vorwiegend über 55 Jahre, ca. drei von zehn Frauen sind jünger.

Zwischen 2005 und 2009 nahm die Inzidenz aufgrund der Einführung des Mammographie-Screenings erstmal deutlich zu. Dabei werden Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr alle zwei Jahre zur Mammographie geladen. Anschließend fiel die Inzidenzkurve wieder

etwas ab. Die konkreten Auswirkungen des Mammographie-Screenings auf die Mortalität werden erst in einigen Jahren sichtbar. Eine Tendenz ist jedoch bereits erkennbar, es werden mittlerweile weniger Neuerkrankungen im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (krebsdaten.de. am 07.07.2021).

1.2 Maligne Tumoren der Mamma

Das Mammakarzinom wird nach dem Ort seiner Entstehung in duktales oder lobuläres Karzinom eingeteilt. Man unterteilt zwei histomorphologische Typen. Dabei entstehen ca. 80% aller Tumoren in den Epithelzellen der Milchgänge (duktales Karzinom), sie sind invasiv und zeigen ein Mischbild aus soliden Anteilen und drüsenbildenden Tumorzellen. Häufig entwickeln sie sich aus einem vorbestehenden duktalem Carcinoma in situ (Gynäkologie und Geburtshilfe, 5. Auflage, Breckwoldt und Co, 2008, S. 243). In 10% der Fälle entsteht das Mammakarzinom kleinzellig in den Drüsenläppchen (lobuläres Karzinom). Sonderformen finden sich in den restlichen 10% als tubuläre, medulläre oder muzinöse Karzinome, wobei der Morbus Paget (M. Paget) als Sonderform gilt. Typische klinische Zeichen des M. Paget sind eine Rötung der Brustwarze, wobei diese nässend und entzündlich, teils mit krustigen Auflagerungen imponiert. Begleitet wird der M. Paget sehr häufig von einem invasiven duktalem Mammakarzinom (Gynäkologie und Geburtshilfe, 5. Auflage, Breckwoldt und Co, 2008, S. 243).

Die Internationale Brustkrebskonferenz aus dem Jahr 2013 in St. Gallen veröffentlichte eine alternative Einteilung der Mammatumoren. Hierbei stehen die molekularen Subtypen im Fokus. Es handelt es sich um die Formen: Luminal A, Luminal B, Her2neu Überexpression und Basal-like Mammakarzinome. Bei Luminal A und B handelt es sich um Karzinomsubtypen, die jeweils einen positiven Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptor) besitzen und kein Her2neu exprimieren. Luminal A unterscheidet sich dabei von Luminal B anhand der Stärke des Proliferationsmarkers Ki67, wobei der Luminal A Tumor einen Anteil Ki67 von weniger als 20% aufweist und der Luminal B Tumor somit einen Anteil von mehr als 20% zeigt. Die Her2neu Tumoren präsentieren sich mit

einer Überexpression des Wachstumsfaktors Her2neu und mit negativem Hormonrezeptorstatus. Darüber hinaus wird die Gruppe der Basal-Like Tumore definiert, wozu auch die triple-negativen Mammakarzinome gezählt werden, die durch das Fehlen aller oben genannter Merkmale gekennzeichnet sind. Es handelt sich dabei um einen Subtyp der Basal-Like Tumoren, jedoch überschneiden sich ca. 56% dieser Tumoren mit ihrem genetischen Profil [2].

1.3 Pathogenese des Mammakarzinoms

Derzeit existieren in der Forschung zwei Theorien zur Entstehung der Mammakarzinome. Es handelt sich hierbei um die Stammzellhypothese und die Zufallshypothese.

Bei der Stammzellhypothese wird angenommen, dass durch Mutation von Vorläuferzellen von ein und derselben Brustkrebsstammzelle alle Brustkrebsformen durch karzinogene Faktoren bedingt und je nach genetischer oder epigenetischer¹ Gegebenheit eine Brustkrebszellform aktiviert wird.

Bei der Zufallshypothese hingegen wird diskutiert, dass mehrere Arten von zufällig mutierten unterschiedlichen Stammzellen in die Brustkrebszellart umgewandelt werden, die später die jeweilige Brustkrebsform bilden. Auch hier spielen die Genetik und epigenetische Prägung eine Rolle bei der tatsächlichen Ausbildung einer Form [3].

1.4 Risikofaktoren

Sun und Kollegen definierten 2017 in einem Review das Alter, die familiäre Vorbelastung, reproduktive Faktoren, das Hormon Östrogen und den Lebensstil als Risikofaktoren in Form einer Pyramide (Abb. 1).

¹ Epigenetik: Durch Mechanismen, wie z.B. die DNA-Methylierung, werden genetische Informationen modifiziert und vererbt. Eine Veränderung der nukleotiden Abfolge findet dabei nicht statt. Umwelteinflüsse wie Lebensstil und Schadstoffe können die epigenetischen Mechanismen beeinflussen (Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik, S. 795, Spinger Verlag, 3. Auflage 2019).



Abbildung 1: Risikofaktoren zur Entstehung eines Mammakarzinoms [3]

Das weibliche Geschlecht ist das größte Risiko im Laufe des Lebens an Brustkrebs zu erkranken. Gleichauf bildet den breitesten Sockel der Pyramide das Alter. Zwischen 40 und 60 Jahren steigt das Risiko an [3].

Findet sich Brustkrebs in der Familienanamnese steigt das Risiko um das 1.75 fache als Frau selbst zu erkranken, wenn die Mutter oder Schwester erkrankt waren. Waren zwei Verwandte ersten Grades und mehr erkrankt, steigt das Risiko um das 2.5 fache an [4]. Die familiäre Häufung wird auf eine genetische Komponente mit Vorhandensein einer Mutation im Gen Breast Cancer 1 oder 2 (BRCA1/BRCA2) zurückgeführt. Durch diese Mutation werden die körpereigenen DNA-Reparaturmechanismen ausgeschaltet, die normalerweise entartete Tumorzellen erkennen und zerstören [5].

Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologischer Onkologie (AGO) teilt die Keimbahnmutationen als Erkrankungsrisiko in hoch penetrante und niedrig penetrante Risikogene ein. Mutationen in BRCA1 und BRCA2 gehören zu den hoch penetranten Risikogenen. Zu den niedrig penetranten zählen CHEK2, BARD1, ATM, RAD51C, RAD51D (https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/_leitlinien/kommission_mamma/2020/PDF_DE/2020D%2002_Brustkreb_srisiko%20und%20Praevention.pdf am 07.08.2022).

Es existieren viele weitere Mutationen. Ein Beispiel für das metastasierte triple-negative Mammakarzinom ist die aktivierende Mutation in der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PIK3CA) oder Serin/Threoninkinase AKT1 und die inaktivierende Mutation von PTEN (Phosphatase and Tensin homolog). Die Serin/Threoninkinase (AKT 1) spielt eine entscheidende Rolle bei Signalwegen, die das Wachstum und das Überleben von Zellen fördern. Die PTEN funktioniert als Tumorsuppressor. Sind diese Signalwege durch Mutationen verändert, kann der Tumor uneingeschränkt wachsen. Die Prognose der Tumorerkrankung ist somit ungünstiger und gegenüber einer Chemotherapie werden Resistenzen beobachtet [6].

An dritter Stelle der Risikofaktorpyramide sind alle Umstände beschrieben, die einen lange währenden Einfluss von Östrogenen auf den weiblichen Körper ausüben. Hierzu gehört zum Beispiel eine späte Schwangerschaft oder keine Schwangerschaft, eine kurze oder keine Stillzeit, die frühe Menarche und eine späte Menopause. Je länger Östrogene im Laufe des Lebens einer Frau auf den Körper einwirken, desto höher ist das Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Dabei handelt es sich um Tumoren, die Östrogenrezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen [7].

Das Hormon Östrogen wird unter anderem in den Ovarien gebildet, womit die Entfernung der Ovarien sich protektiv auf eine Brustkrebserkrankung auswirken kann. Ethinylestradiol als synthetisch hergestelltes Östrogen wird als sogenannte Anti-Baby-Pille zur Verhütung oder bei klimakterischen Beschwerden als Hormonersatztherapie eingesetzt. Wenn eine Frau die Pille weniger als 10 Jahre einnimmt, steigt das Risiko an Brustkrebs zu erkranken nicht an. Der Einfluss einer Hormonersatztherapie auf die Entstehung von Brustkrebs in der Meno- oder Postmenopause wurde im Jahr 2003 in der „Million Women Study“ untersucht. Das relative Risiko betrug 1.66 für Frauen mit Hormonersatztherapie im Vergleich zu Frauen, die ohne Hormonersatztherapie durch die Menopause gekommen sind [8].

Der Lebensstil steht an der Spitze der Pyramide und ist ein geringer Risikofaktor für Brustkrebs. Alkohol, Rauchen und eine fettreiche Ernährung werden von Sun und Kollegen zusammengefasst. Das Risiko steigt um 32% an, wenn täglich zwischen 35 und 44 g Alkohol konsumiert werden [9]. Eine fettreiche Ernährung mit überwiegend gesättigten Fettsäuren führt zu einer schlechteren Prognose bei erkrankten Patientinnen und damit auch zu einer

höheren Mortalität mit einem relativen Risiko von 1.3 [10]. Das Rauchen ist ebenfalls ein risikoreicher Faktor durch die mutagenen Stoffe im Tabak. Diese Stoffe wurden im Brustsekret nachgewiesen und erhöhen das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, vor allem, wenn bereits in jungen Jahren begonnen wurde [11].

Eine alternative Einteilungsmethode der Risikofaktoren besteht aus der Einteilung zwischen beeinflussbar und nicht beeinflussbar (Lehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe Bernhard Uhl, 6. Auflage, Thieme 2018, Seite 656). Nicht beeinflussbare Risikofaktoren sind das fortgeschrittene Alter, ein Mammakarzinom in der Familienanamnese und z.B. die BRCA-Mutation als genetische Voraussetzung. Als reproduktive Faktoren werden alle Gegebenheiten im Leben einer Frau beschrieben, die einen Einfluss auf die Anzahl der Menstruationszyklen im Laufe des Lebens haben. Dazu zählen beispielsweise eine frühe Menarche und späte Menopause. Ebenfalls wird das höhere Alter bei der ersten Schwangerschaft und keine Schwangerschaft bzw. geringe Kinderanzahl im Laufe des Lebens einer Frau als Risikofaktor genannt. Außerdem wird die Dichte der Brust aufgeführt. Je dichter das Brustgewebe, desto höher das Risiko.

Zu den beeinflussbaren Umweltfaktoren zählt insbesondere der individuelle Lebensstil. Schätzungsweise 25% aller Brustkrebserkrankungen bei Frauen nach der Menopause sind auf den Lebensstil zurückzuführen. Dazu gehören fett- und kohlenhydratreiche Ernährung mit wenig Ballaststoffen, Bewegungsmangel und die dadurch bedingte Adipositas sowie Alkohol- und Nikotinabusus. Rauchen über eine Zeitspanne von 10 Jahren vor der ersten Schwangerschaft erhöhe das Risiko an Brustkrebs zu erkranken um 60% im Vergleich zu Nichtraucherinnen.

Auch das Schlafverhalten wird genannt. Explizit die Schicht- und Nachtarbeit wird deutlich hervorgehoben. Außerdem eine kurze Stillzeit und eine Hormonersatztherapie bei Wechseljahresbeschwerden oder Kontrazeptiva zählen hier zu beeinflussbaren Risikofaktoren. Eine Zeit lang wurde das Aluminium in Deodorants verdächtigt die Entstehung von Brustkrebs zu begünstigen, diese Annahme hat sich jedoch bisher wissenschaftlich nicht bestätigt (Lehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe Bernhard Uhl, 6. Auflage, Thieme 2018, Seite 656).

1.5 Die Rolle des Immunsystems in Tumoren

1.5.1. Die Rolle der B-/Plasma-Zellen

B-Zellen haben in unserem Immunsystem als Plasmazellen die Funktion der Bildung von spezifischen Antikörpern gegen körperfremde Strukturen und damit potenziell auch gegen Tumorzellen. Zudem schütten sie Entzündungsmediatoren aus, regulieren die Bildung von Antikörpern und interagieren mit T-Zellen [12]. Über den Fc-Rezeptor treten sie in Kommunikation mit beispielsweise dendritischen Zellen² oder den zytotoxischen T-Zellen. Im Mikromilieu des Tumors findet sich eine große Bandbreite an B-Zell Funktionen und je nachdem, welche Funktionen überwiegen, können B-Zellen den Tumor bei seinem Wachstum unterstützen oder aber den Tumor zerstören. Unterstützen B-Zellen das Tumorstadium, hemmen sie die Funktion zytotoxischer T-Zellen, helfen durch Mediatoren bei der Bildung von neuen Gefäßen und führen damit zur vermehrten Durchblutung des Tumors. Sie schaffen ein entzündliches Milieu. Zytokine wie z.B. das Interleukin-10 (IL-10) und die Bildung von Immunglobulin-G (IgG) durch die B-Zellen lösen im Knochenmark die Bildung von myeloiden Supressorzellen aus, die die T-Zell vermittelte Immunreaktionen im Körper hemmen [14]. Außerdem exprimieren B-Zellen den sogenannten programmed cell death Liganden 1 (PD-L1), binden damit an das zugehörige programmed cell death Protein 1 (PD1) und hemmen die natürliche Immunabwehr des Körpers [15].

Mechanismen von B-Zellen gegen den Tumor erfolgen vor allem über die Ausschüttung von Zytokinen und Verstärkung des Effektes von zytotoxischen T-Zellen gegen den Tumor oder durch die Bildung von spezifischen Antikörpern. In Lymphknoten werden vermehrt Antigen präsentierende Zellen, vor allem die dendritischen Zellen produziert, die T-Zellen aktivieren und zur Vermehrung anregen. In einer Studie von Nielsen et al. konnte beim Ovarialkarzinom ein längeres Überleben bei Patientinnen beobachtet werden, die in ihrem

² Dendritische Zellen: Ubiquitär vorkommende antigenpräsentierende Zellen. Monozyten aus dem peripheren Blut sind die hauptsächlichen Vorläuferzellen. Die unreifen dendritischen Zellen weisen eine Phagozytoseaktivität auf. Eine Aktivierung durch beispielsweise den Tumornekrosefaktor (TNF) zu reifen dendritischen Zellen führt zur spezifischen Antwort mit der antigenpräsentierenden Funktion (13. Lutz, M.B. and G. Schuler, *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* Trends Immunol, 2002. **23**(9): p. 445-9.)

Tumor immunhistochemisch CD20+ B-Zellen und CD8+ T-Zellen aufwiesen im Vergleich zu Tumoren mit CD8+ T-Zellen ohne eine Infiltration mit B-Zellen [16] [15].

Im Jahr 1992 beobachteten als Pioniere Aaltomaa et al. die Lymphozyteninfiltration als möglichen prognostischen Faktor beim Brustkrebs. Die Forscher analysierten tumorinfiltrierende Immunzellen im schnell wachsenden Mammakarzinom und postulierten einen entscheidenden Einfluss einer starken Infiltration im Tumor auf die Prognose. Die Tumorgröße war kleiner, die Lymphknoten nicht befallen und das rezidivfreie Überleben war verlängert, wenn der Brustkrebs eine starke Infiltration mit Immunzellen zeigte [17].

Schmidt und Kollegen wiesen im Rahmen von Genexpressionsanalysen in schnell wachsenden Mammatumoren B-Zell Metagene nach. Ein Bestandteil davon ist unter anderem das Immunglobulin-Kappa C (Ig κ C) bei tumorinfiltrierenden B-Zellen. Das metastasenfremie Überleben war länger bei schnell wachsendem Brustkrebs ohne Lymphknotenbefall und mit höherer Expression von B-Zell Metagenen [18].

Mahmoud und Kollegen nutzten in ihrer Studie den Biomarker CD20 für B-Zellen als immunhistochemischen Nachweis für tumorinfiltrierende Plasmazellen im invasiven Brustkrebs. Hier wurde ebenfalls ein längeres Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben postuliert, wenn Tumore mit entsprechenden B-Zellen infiltriert waren [19].

1.5.1.1 Immunglobulin kappa C (Ig κ C) als B-Zell-Marker

Die Expression von Immunglobulin-Kappa chain (Ig κ C) als ein Bestandteil des B-Zell Metagens wurde, wie bereits genannt, bei der Suche nach Biomarkern für B-/Plasmazellen von Schmidt und Kollegen in einer Genexpressionsanalyse gefunden. Ig κ C war einer der am häufigsten vorkommenden Biomarker in den untersuchten Tumoren und ermöglicht als Antikörper den Einsatz in der immunhistochemischen Markierung von B-/Plasmazellen in Tumorschnitten, die als Paraffinblöcke konserviert werden. Das metastasenfremie Überleben war statistisch signifikant verlängert bei einer starken Infiltration des Tumors

mit IgκC-positiven Plasmazellen. Außerdem postulierten die Autoren ein besseres Ansprechen des Brusttumors auf eine neoadjuvante Chemotherapie [18] [20].

1.5.1.2 CD38 als Plasmazell-Marker

Unter anderen Forschern untersuchten als Beispiel Yeong et al. in ihrer im Jahr 2018 veröffentlichten retrospektiven Studie den Antikörper CD38 als Plasmazellmarker bei 269 triple-negativen Mammakarzinomen. Zusätzlich wurden die B-Zell Marker IgκC, Immunglobulin Heavy Constant Mu (IGHM) und Immunglobulin Heavy Constant Gamma 1 (IGHG1) in der immunhistochemischen Untersuchung eingesetzt. Eine hohe Infiltration mit CD38-positiven Plasmazellen zeigte ein statistisch signifikant längeres krankheitsfreies Überleben [21].

1.5.2. Die Rolle Zytotoxischer T-Zellen

Krebszellen liefern durch eine hohe Anzahl somatischer Genmutationen unserem Immunsystem eine Vielzahl an tumorspezifischen Antigenen und somit eine Möglichkeit darauf mit z.B. zytotoxischen T-Zellen zu antworten, den Tumor zu erkennen und zu zerstören. Das Mikromilieu im Tumor kann dabei eine Immunsuppression auslösen und begrenzt somit die Immunantwort des Körpers auf den Tumor limitierend. Dabei nutzen die Tumorzellen den Liganden PD-L1 und inhibieren durch die Bindung an zytotoxische T-Zellen in Lymphknoten oder im Mikromilieu des Tumors die Zerstörung der Tumorzellen. Therapeutische Angriffspunkte bilden bereits sogenannte PD-L1 Inhibitoren, die diese Inhibition blockieren und somit die natürliche Abwehr des Immunsystems wieder aktivieren [22] [23]. Die Forschung bedient sich an dem im Folgenden beschriebenen Tumor-Immunsystem Kreislauf, um weitere Therapien zu entwickeln (Abb. 2) [24].

Der Tumor-Immunsystem Kreislauf besteht aus sieben Schritten. Im ersten Schritt werden Neoantigene von dendritischen Zellen unseres Immunsystems erkannt und proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet. Im zweiten Schritt präsentieren die dendritischen Zellen diese Antigene auf ihrem major histocompatibility complex I (MHC-I) oder MHC-II den T-Zellen. Somit werden im dritten Schritt die T-Zellen aktiviert und wandern im vierten Schritt zum Tumor an den Ort des Geschehens. Dort angelangt

infiltrieren die T-Zellen den Tumor und binden im sechsten Schritt an das passende Antigen am Tumor. Im siebten und letzten Schritt wird die Tumorzelle in diesem Komplex zerstört. Es handelt sich hierbei um einen sich selbst verstärkenden Prozess. Durch den Tumorzelltod wird der Zyklus wieder erneut aktiviert.

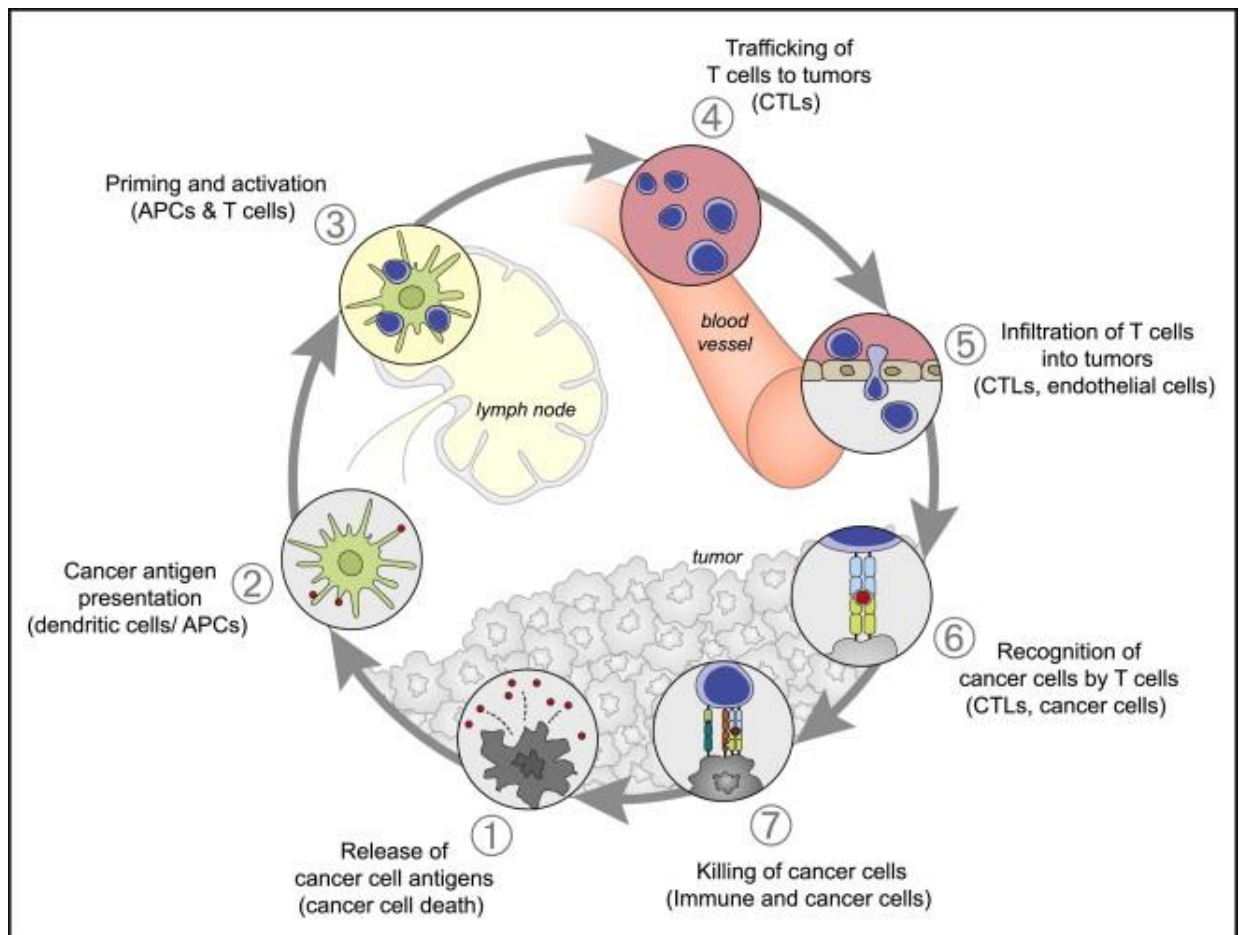


Abbildung 2: Tumor-Immunsystem Kreislauf [24]

Bei Tumorpatienten ist dieser natürliche Tumor-Immunsystem Zyklus gestört. Antigene auf der Tumoroberfläche werden von unserem Immunsystem nicht erkannt oder als körpereigen missverstanden. Die aktivierten T-Zellen auf dem Weg zum Tumor werden bei der Infiltration in den Tumor behindert. Ebenfalls können sich Tumoren mit bestimmten Faktoren im Mikromilieu vor dem Immunsystem verstecken [24].

1.6 Therapiemöglichkeiten beim triple-negativem Mammakarzinom

Mammakarzinome können chirurgisch brusterhaltend mit anschließender Radiatio behandelt werden. Eine Mastektomie wird empfohlen beim inflammatorischen Mammakarzinom, bei Zustand nach nicht kompletter Tumorentfernung, auf Wunsch der Patientin oder wenn Kontraindikationen für eine Bestrahlung bestehen (https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2021-07.pdf am 24.05.2022).

Der Unterschied der Therapie der Subtypen besteht in zusätzlichen Optionen, die die jeweilige Prognose verbessern können. Die immunhistochemische Festsetzung des molekularen Subtyps bestimmt die Therapieoptionen. Im Gegensatz zu anderen Subtypen bietet das triple-negative Mammakarzinom keine Angriffspunkte für die Antihormontherapie oder z.B. Trastuzumab als Antikörper und somit als Blockade des epidermalen Wachstumsfaktors Her2neu. Damit sind die Möglichkeiten begrenzt. Als Chemotherapie der Wahl gelten Anthrazykline oder Taxane (Gynäkologie und Geburtshilfe, Uhl, 2018, 6. Auflage, Thieme Verlag, Seite 684-686) (https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2021-07.pdf am 30.08.2021).

In einem Review aus 2020 werden als Chemotherapeutika der Wahl ebenfalls Anthrazykline und Taxane genannt [2]. Anthrazykline sind antibiotisch wirksame Chemotherapeutika, die von der Gattung Streptomyces isoliert werden. Eine sechsmonatige Behandlung mit einem Anthrazyklin senkt die Mortalität bei 50-69-jährigen um ca. 20% und bei unter 50-jährigen Patientinnen um ca. 38%, unabhängig davon um welchen Subtyp des Mammakarzinoms es sich handelt [25]. Taxane sind Mitosehemmstoffe und blockieren den Abbau des Spindelapparates in Krebszellen, diese können sich dann nicht mehr teilen. Eine zusätzliche Funktion ist die Einleitung des Zelltodes namens Apoptose. Hier ist das Ansprechen auf Taxane abhängig vom Subtyp, ein triple-negatives Mammakarzinom vom basal-like Typ

zeigt eine vierfache Remission im Unterschied zu anderen Subtypen des Mammakarzinoms [26] [27].

Neben dieser bisher eingesetzten Chemotherapie wird unter anderem die Immuntherapie als vielversprechender Kombinationspartner vorgestellt. Wie bereits unter Kapitel 1.5.2 erläutert, reagiert unser Immunsystem auf körperfremde Zellen wie die Tumorzellen mit Bildung von zytotoxischen T-Zellen. Das Protein PD-1 bindet an sein Gegenstück, den Liganden namens PD-L1 an T-Zellen, blockiert die Bildung von zytotoxischen T-Zellen und programmiert sie zur Selbstzerstörung. Sun et al. konnten an triple-negativen Mammakarzinomen von 218 Patientinnen mit immunhistochemischen Verfahren eine Expression von PD-L1 in den Tumorzellen nachweisen [28]. Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung von PD-L1 Inhibitoren [2]. Ein Beispiel ist der dazu entwickelte monoklonale Antikörper namens Atezolizumab. Der genannte Immuncheckpoint-Inhibitor in Kombination mit nab-Paclitaxel durchlief eine Phase III Studie als Erstlinientherapie bei Patientinnen mit einem metastasiertem unbehandeltem triple-negativem Mammakarzinom. Das Gesamtüberleben von Patientinnen mit PD-L1 positiven Tumoren war mit 25 Monaten deutlich länger im Vergleich zu 15 Monaten. Das progressionsfreie Überleben bei PD-L1 positiven Tumoren war ebenfalls mit 7.5 Monaten länger im Vergleich zu 5.5 Monaten beim Placebo plus Chemotherapie [29].

Eine weitere wichtige Medikamentengruppe beim triple-negativem Mammakarzinom sind die PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) -Inhibitoren, die bei einer nachgewiesenen BRCA-Mutation auf Keimbahnebene als zielgerichtete Therapie eingesetzt werden können. Ein Vertreter der PARPi ist Olaparib. In der OlympiA Phase III Studie wurden Patientinnen eingeschlossen, deren Karzinom eine BRCA-Mutation aufwies und deren Her2neu Status negativ war. Außerdem war die Karzinomerkrankung fortgeschritten und ein Rezidivrisiko hoch. Etwa 20% der Teilnehmer hatten einen positiven Hormonrezeptorstatus, ca. 80% waren triple-negativ. Eine Gruppe erhielt das Medikament Olaparib, die andere ein Placebo. Nach einer Einnahmezeit von ca. 3 Jahren konnte ein um 8.8% verbessertes krankheitsfreies längeres Überleben im Olaparib Arm statistisch signifikant nachgewiesen werden (p -Wert < 0.0001). Auch das metastasenfreie Überleben zeigte sich im Olaparib Arm signifikant länger (87.5% vs. 80.4%, p -Wert < 0.00019). Das Gesamtüberleben war jedoch nicht eindeutig verbessert mit 88.3% Placebo und 92% unter Olaparib [30].

1.7 Aktueller Forschungsstand zu prognostischen Faktoren

Das Alter bei Erkrankung als unbeeinflussbarer Risikofaktor zeigt eine ungünstige Prognose, wenn Patientinnen unter 35 Jahre alt sind. Dafür reagiert der Tumor bei jüngeren Menschen besser auf eine adjuvante Chemotherapie (Gynäkologie und Geburtshilfe, Bernhard Uhl, 6. Auflage, Thieme Verlag 2018, Seite 665-669)(https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2021-07.pdf am 30.08.2021).

Ein weiterer bekannter Prognosefaktor ist die Tumorgröße: je größer der Tumor, desto geringer ist die 5-Jahres-Überlebensrate. Ein Tumor kleiner als 1 cm Größe zeigt eine Überlebenswahrscheinlichkeit von über 95%, ein Tumor über 5 cm Größe zeigt hingegen eine 5-Jahres-Überlebensrate von noch 63%.

Bei der Mammachirurgie ist eine komplette Entfernung des Tumors und somit die R0 Resektion prognostisch günstig (https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2021-07.pdf am 30.08.2021).

Als weiterer wichtiger Prognosefaktor gilt der Nodalstatus: je mehr Lymphknoten mit Tumorzellen detektiert werden, desto geringer ist die 10-Jahres-Überlebensrate. Ist kein Lymphknoten befallen, liegt die absolute 10-Jahres-Überlebensrate bei 77%. Wenn 5 Lymphknoten befallen sind, liegt die Rate bei 51% und sind mehr als 10 Lymphknoten befallen, liegt die absolute 10-Jahres-Überlebensrate nur noch bei 16%.

Beim Grading³ (G) des Tumors von G1 bis G3 wird die Bewertung nach Elston und Ellis angewandt, um die Reproduzierbarkeit zu erhalten

³ Grading: Einstufung in Grad (G) 1-3 von einer Stanz- oder Vakuumbiopsie und operativen Präparaten eines Mammakarzinoms. Beurteilt werden die Tubulusausbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate mittels eines festgelegten Scores. Die Summe des Scores bestimmt das Grading in G1-G3, von gut, über mäßig bis schlecht differenziert bzw. geringerem über mäßigem bis hohem Malignitätsverdacht 31. 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.

(https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2021-07.pdf am 30.08.2021). Ein als G1 klassifizierter Tumor hat eine 10-Jahres-Überlebensrate von mehr als 80%, ein G3-Tumor eine 10-Jahres-Überlebensrate von noch 45%.

Der Hormonrezeptorstatus ist sowohl ein prognostischer als auch ein prädiktiver Faktor: auf der Oberfläche des Mammakarzinoms lässt er sich immunhistochemisch bereits bei einer kleinen Menge an Gewebe aus einer diagnostischen Stanze bestimmen und liefert Informationen bezüglich des Ansprechens einer endokrinen Therapie, zudem ist eine höhere Expression des Östrogenrezeptors mit einer günstigeren Prognose assoziiert. Sind mehr als 1% der Tumorzellen immunhistochemisch Östrogenrezeptor-positiv (ER positiv), gilt der Rezeptorstatus als Östrogen positiv. Bei dem Progesteronrezeptor (PR) Status liegt die Positivität vor, wenn sich über 10% der Zellen Progesteron positiv zeigen. Sind beide Rezeptoren positiv, spricht der Tumor am besten auf eine endokrine (antihormonelle) Therapie an. Eine ungünstige Prognose hat ein negativer ER- und PR-Status, da dementsprechend keine Angriffspunkte bestehen. Der Her2neu Status wird in der Pathologie zunächst immunhistochemisch bestimmt und in unklaren Fällen mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ergänzt. Bei positivem Status kann die Anti-Her-2-Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (oder anderen anti-HER2 gerichteten Therapien) angewandt werden und ist somit prädiktiv im Hinblick auf die anti-Her2 gerichteten Therapien. Die Durchführung einer neoadjuvanten Therapie, d.h. einer Chemotherapie vor der chirurgischen Tumorentfernung bei als G3 eingestuften Tumoren, bei positivem Her-2 Status oder bei triple-negativen Tumoren ist prognostisch günstig. Der Proliferationsmarker Ki67 zeigt die Stärke der Aggressivität eines Tumors an und korreliert mit der Prognose. Jedoch ist die Bewertung der Stärke subjektiv und nicht reproduzierbar, da die immunhistochemisch bearbeiteten Tumorpräparate per Auge ausgewertet werden (Gynäkologie und Geburtshilfe, Bernhard Uhl, 6. Auflage, Thieme Verlag 2018, Seite 665-669, https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2021-07.pdf am 30.08.2021).

Die aktuelle Forschung beschäftigt sich mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten aus dem Immunsystem. Diese Lymphozyten befinden sich gehäuft im Brustkrebs, besonders im triple-negativen Tumor, aber auch in anderen Tumorarten wie z.B. Nicht-kleinzelligem

Lungenkarzinom und in Kolorektalen Karzinomen [33][32][31][30]. Je stärker das Immunsystem den Tumor angreift, d.h. je höher die Infiltration mit Lymphozyten, desto besser ist die Prognose.

Auf das triple-negative Mammakarzinom bezogen veröffentlichten Adams et al. im Jahr 2014 und Loi et al. im Jahr 2019 jeweils eine Studie.

Adams et al. konzentrierten sich zur Validierung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) als unabhängigen prognostischen Faktor auf das Tumorkollektiv von 506 Patientinnen aus zwei großen klinischen Studien der „Eastern Cooperative Oncology Group“ (ECOG). In 481 Tumoren wurden per Hämatoxylin- und Eosin-Färbung tumorinfiltrierende Lymphozyten nachgewiesen. Eine bessere Prognose war nach einem durchgeführten Follow-Up bei einer hohen Infiltration ersichtlich. Mit einer statistischen Signifikanz von p-Wert=0.02 war das Risiko für das Auftreten eines Rezidivs oder der Tod um 14% geringer für jede Erhöhung der Stärke der Infiltration mit TILs um 10% [33].

Aus insgesamt 9 Studien analysierten Loi und Kollegen die prognostische Relevanz von tumorinfiltrierenden Lymphozyten anhand von 2148 Patienten. Auch hier wurden zur Detektion von tumorinfiltrierenden Lymphozyten hauptsächlich die Hämatoxylin- und Eosin-Färbung angewandt. Hauptergebnis war das niedrigere Risiko für Rezidive und den Tod durch die Erkrankung drei Jahre nach der Therapie mit Anthracyclinen vor allem bei triple-negativen Tumoren mit hohem Gehalt an tumorinfiltrierende Lymphozyten, ohne Lymphknotenbefall und in frühen Stadien [34].

Weitere Arbeiten untersuchten den Einfluss von TILs als möglicher prädiktiver Faktor: so zeigten Denkert und Kollegen, dass das Vorhandensein von TILs mit einer höheren pCR-Rate (pathologische Komplettremission) bei neoadjuvant behandelten Patientinnen mit frühem Mammakarzinom einherging [35]. Auch Schmidt et al. postulierten ein statistisch signifikant besseres Ansprechen von nodal-negativen Mammakarzinomen auf eine anthracyclinbasierte Chemotherapie, wenn der Plasmazellmarker IgκC immunhistochemisch nachgewiesen wurde [18] [20].

1.8 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, exprimiert das triple-negative Mammakarzinom weder Östrogen- und Progesteron Rezeptoren noch den Wachstumsfaktor-Rezeptor Her-2neu auf seiner Tumoroberfläche, ist mit ca. 10-15% der Mammakarzinome selten und aufgrund der fehlenden Angriffspunkte durch eine zielgerichtete Therapie bekannt für eine schlechte Prognose. Somit sind prognostische Faktoren bei diesem Tumor von großer wissenschaftlicher Bedeutung. Durch die Entwicklung spezifischer Therapiemöglichkeiten kann die Prognose, d.h. Vorhersage des wahrscheinlichen Krankheitsverlaufs beeinflusst werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erfassung und Untersuchung der Infiltration der triple-negativen Tumoren mit Plasmazellen als Prognosefaktor. Dazu wurden die Biomarker IgκC und CD38 genutzt. Eine immunhistochemische Markierung von Plasmazellen im triple-negativem Brustkrebs erfolgte in früheren Arbeiten mittels CD4-, CD8- und FOXP3-Antikörper [36]. In dieser Arbeit wurde der bereits bei einer experimentellen Arbeit an der Uniklinik Mainz angewandte B-Zell Marker Immunglobulin kappa chain (Igκc) angewandt. Chen und Kollegen stellten die Stärke der Infiltration mit Igκc als prognostischen Faktor beim Brustkrebs ohne Lymphknotenbefall dar [37]. Diese bereits erprobte Methode inklusive Auswertungsmaßstab wurde in der vorliegenden Untersuchung auf den triple-negativen Brustkrebs übertragen. Der Marker CD38, der ebenfalls bereits als Plasmazellmarker genutzt wurde [21], wurde hier zusätzlich zur Verstärkung der Ergebnisse ergänzend untersucht.

Das Kollektiv bestand aus 107 Patientinnen. An den in Paraffin konservierten Tumorschnitten wurde immunhistochemisch im Labor das Vorhandensein von tumorinfiltrierenden Plasmazellen mittels IgκC und CD38 überprüft. Anhand eines Fragebogens im Follow-Up wurde der klinische Zustand der Patientinnen nach einem bestimmten Zeitraum nach der Operation festgehalten.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Stärke der Infiltration mit Plasmazellen im triple-negativem Mammakarzinom einen Einfluss auf die Prognose der Erkrankung hat, erfolgte die statistische Erfassung der Prognose mittels der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier in Form des Gesamtüberlebens (OVS, overall survival) und dem Zeitraum ohne

Auftritt einer Metastase (MFS, metastasis free survival). Die prognostische Relevanz von IgκC- und CD38-positiven Plasmazellen auf das Gesamtüberleben und das metastasenfreie Überleben wurde mit Hilfe der univariaten Cox-Regression untersucht. Im Rahmen der multivariaten Analyse wurde zudem die prognostische Bedeutung der Faktoren Alter, Tumorgröße, Grading und Nodalstatus analysiert.

Als Nebenfragestellung wurde die Abhängigkeit der Stärke der Infiltration mit Plasmazellen im triple-negativem Mammakarzinom von der Stärke des Proliferationsmarkers Ki-67 und vom Grading des Tumors untersucht.

2 Methodik

2.1 Patientenkollektiv

Das Kollektiv bestand aus 107 Patientinnen, die wegen eines triple-negativen Mammakarzinoms von 2009 bis 2016 an der Frauenklinik des Universitätsklinikum Mainz behandelt wurden und eine brusterhaltende Therapie oder Mastektomie erhielten. Der Ethikantrag für die Tumorschnitte der Pathologie der Universitätsmedizin Mainz erfolgte als Sammelantrag der Labore der Frauenklinik Uniklinik Mainz.

Merkmal	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
Alter bei Diagnose		
<50	44	41%
>50	63	59%
Tumorgröße		
pT1	49	46%
pT2-4	58	54%
Nodalstatus		
pN0	68	64%
PN1-3	39	36%
Grading		
1-2	28	26%
3	79	74%
Ki67		
<20%	7	6.5%
>20%	54	50.5%
Fehlend	46	43%

IgκC positiv		
Gering (Score 0/1)	59	55%
Stark (Score 2/3)	48	45%
CD38 positiv		
Gering (Score 0/1)	60	56%
Stark (Score 2/3)	47	44%

Tabelle 1: Patientenkollektiv mit Merkmalen (absolute und relative Häufigkeiten)

2.2 Ablauf

Im ersten Schritt fand im Labor an Paraffinschnitten die immunhistochemische Färbung der IgκC-positiven und CD38-positiven Immunzellen im Tumor statt. Die Bestimmung der Stärke der Infiltration erfolgte anhand eines bereits bestehenden Scores durch zwei unabhängig voneinander arbeitende Auswerter am Lichtmikroskop.

Im zweiten Schritt wurde im Follow-Up anhand eines Fragebogens die Erfassung der Prognose bezüglich des Auftretens von Metastasen und dem Gesamtüberleben durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode und Cox Regression.

Als Nebenfragestellung wurde die Abhängigkeit der Stärke der Infiltration von Plasmazellen im Tumor von der Stärke des Proliferationsmarkers Ki67 und vom Grading mit Hilfe der ordinalen Regression betrachtet.

2.3 Reagenz und Materialien

Reagenz/Material	Ursprung/Firma
Paraffinschnitte nativ auf Objektträgern	In Paraffin konservierte triple-negative Mammatumore aus der Pathologie der Uniklinik Mainz
Anti-CD38 Antibody produced in rabbit	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ig kappa chain Antibody SC59264	KP-53 Santa Cruz Biotechnologie Inc.
Xylol	AppliChem Panreac, Darmstadt (Deutschland), Cas-No.: 1330-20-70
Ethanol 100%/96%	AppliChem, Darmstadt (Deutschland)
Ethanol 70%	Aus 99% Ethanol und Aqua dest. (destilliertes Wasser) gemischt
Aqua dest.	„Ampuwa Spüllösung“ Fresenius Kabi, Bad Homburg (Deutschland), Code: 30-29-256
Target Retrieval Solution, high ph	DAKO, Glostrup (Dänemark)

Peroxidaseblock 30% H ₂ O ₂	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland), Art. 8070.2
AK-dil-Puffer Puffer PBS	DAKO, Glostrup (Dänemark)
DAKO REAL EnVision HRP Rabbit/Mouse als AK II	DAKO, Glostrup (Dänemark)
DAB und Chromosom 1:50 in Substratpuffer	DAKO, Glostrup (Dänemark)
Mayers Hämalan Verdünnung 1:5 mit Aqua dest.	Merck
Hico-Mic (Harzlösung)	(Hirtz & Co., Köln, Deutschland)
Positivkontrolle: Tonsille, medulläres Mammakarzinom	Pathologie der Uniklinik Mainz
Lichtmikroskop	

Tabelle 2: Reagenz und Materialien

2.4 Immunhistochemie

Die Methode des experimentellen Anteils wurde bereits unter anderen in einer Arbeit an der Uniklinik Mainz angewandt, bei der der Einfluss der Stärke der Infiltration mit dem Plasmazellmarker IgκC bei lymphknotennegativen Mammakarzinomen auf das Überleben untersucht wurde [37]. Die zusätzliche Untersuchung mit dem Plasmazellmarker CD38 erfolgte nach der gleichen Methode.

Als Positivkontrolle wurde bei jedem experimentellen Durchgang jeweils ein Präparat mit einer Tonsille und mit einem medullären Mammakarzinom mitgeführt, da diese bekannterweise besonders viele Plasmazellen enthalten.

Nach der Entparaffinierung der Präparate in Xylol und anschließend in absteigender Ethanolstärke erfolgte die Demaskierung in einem Steamer mit den Schnitten in einem Bad aus dem Puffer von DAKO namens Target Retrieval Solution.

Dabei verwendet man einen Puffer mit high ph für den Antikörper IgκC und einen Puffer mit low ph für den Antikörper CD38.

Anschließend wurden die mit einem Fettstift zur Begrenzung der Chemikalien markierten Präparate mit H₂O₂ frisch angesetzt in H₂O als Peroxidaseblock behandelt.

Der Antikörper I IgκC wird im Verhältnis 1:100 frisch angesetzt in AK-dil Puffer (DAKO) und nach Zugabe auf die Präparate und nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS nachbehandelt. Der Antikörper CD38 wird im Verhältnis 1:1000 frisch angesetzt. Die anschließende Behandlung der Präparate erfolgt für IgκC und CD38 jeweils mit dem Antikörper II DAKO REAL EnVision HRP (Rabbit/Mouse) ebenfalls 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend in PBS.

Durch Zugabe von DAB und Chromogen (DAKO) frisch angesetzt im Verhältnis 1:50 in Substratpuffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur gefolgt von einem 10minütigen Waschgang mit Leitungswasser findet die Visualisierung der Verbindung der Plasmazellen im Präparat mit den Antikörpern statt.

Nach der Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (Merck) zum Lokalisieren der positiven Reaktion und der Entwässerung der Schnitte mit Ethanol in aufsteigender Reihe und Xylol am Ende wurden die Präparate mit Nico-Mic zur Konservierung eingedeckelt.

Die Bewertung der Präparate fand in einer unabhängig voneinander zweifachen Beurteilung anhand des Scores von 0 bis +3 unter dem Lichtmikroskop statt. Als Vorlage zur Bestimmung der Stärke der Tumorinfiltration mit Ig κ C und CD 38 dienen die Abbildungen aus der Arbeit „Immunglobulin Kappa C Predict Overall Survival in Node Negative Breast Cancer“ von Schmidt et al aus dem Jahr 2012 (Abb. 3).

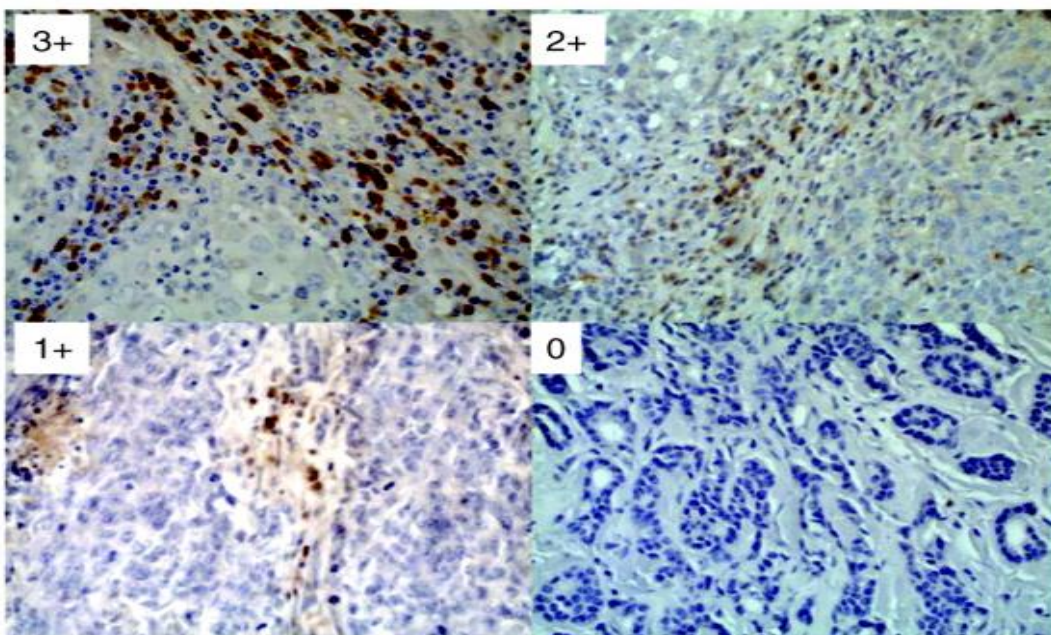


Abbildung 3: Immunhistochemische Stärke der Infiltration mit Ig κ C, Score 0 bis 3 [18]

2.5 Follow-Up

Die parallel zur experimentellen Arbeit im Labor an die dazugehörigen Patientinnen per Post verschickten Fragebögen enthalten ja/nein Antwortmöglichkeiten zum Thema Rezidiv und Metastasen, Ankreuzvarianten zur durchgeführten Therapie und der aktuellen Therapiebedürftigkeit mit der Auswahl ja/nein (Abb.4).

Name:

Geb.-Datum: _____

Ist die Brustkrebs Erkrankung bei Ihnen wieder aufgetreten?

ja

nein

wenn ja angekreuzt :

Rezidiv (Wachstum an der gleichen Stelle), wann: _____(Datum)

Metastase, wann: _____(Datum) und wo: _____

Wie wurden sie behandelt:

Therapie	Dauer (in Monaten) und wenn bekannt welche:
<input type="radio"/> endokrine Therapie (Hormone)	
<input type="radio"/> Strahlentherapie	
<input type="radio"/> Chemotherapie	
<input type="radio"/> Immuntherapie	
<input type="radio"/> keine	

Befinden Sie sich zur Zeit in Therapie?

ja, welche: _____

nein

Datum: _____

Unterschrift: _____

Abbildung 4: Fragebogen

2.6 Statistische Methoden

Alle notwendigen Daten wurden in einer Excel Tabelle gesammelt und in das Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Programm übertragen. Mit dem SPSS-Programm erfolgte die statistische Auswertung der deskriptiven Statistik mittels Balkendiagrammen. Bei der Gesamtüberlebenszeitanalyse sowie der Analyse des metastasenfremen Überlebens wurde die Kaplan-Meier Methode angewandt. Dabei wurde die Stärke von IgκC und CD38 in geringe (Score 0 und 1) und starke Infiltration (Score 2 und 3) eingeteilt.

Um den prognostischen Einfluss der Infiltration mit IgκC- und CD38-positiven Plasmazellen auf das Gesamtüberleben und das metastasenfreme Überleben zu untersuchen, wurde eine Cox Regression angewandt. Zusätzlich zu IgκC oder CD38 wurden in die Analyse Prognosefaktoren wie Alter, Grading, Tumorgröße und Nodalstatus eingefügt. Hierbei handelte es sich bei den Kovariaten IgκC und CD38 um stetige Merkmale, während die Kovariaten Alter, Tumorgröße, Nodalstatus und Grading des Tumors als kategorial betrachtet wurden.

Uni- und multivariate Cox Regressionsanalysen lieferten mittels der Hazard Ratio und dem 95% Konfidenzintervall Aussagen bezüglich der Effektstärke und der Signifikanz. Das Signifikanzniveau wurde definiert als p-Wert kleiner als 0.05.

Zur Beantwortung der Nebenfragestellung, ob die Stärke der Infiltration mit Plasmazellen abhängig von der Stärke des Proliferationsmarkers Ki67 oder vom Grading des Tumors ist, wurde die ordinale Regression als Methode genutzt. Das Ki67 in Prozent von 0 bis 100 und das Grading von G1-G3. Als statistisches Signifikanzniveau galt der p-Wert unter 0.05.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Das Patientenkollektiv bestand aus 107 Patientinnen, die wegen eines triple-negativen Mammakarzinoms im Zeitraum von 2009 bis 2016 an der Frauenklinik der Uniklinik Mainz behandelt wurden und eine brusterhaltende Operation oder Mastektomie erhielten. Zum Zeitpunkt der Diagnose lag das mittlere Alter bei 55 Jahren (Abb. 5). 41% der Patientinnen waren jünger als 50 Jahre und 59% älter als 50 Jahre. Der Anteil der BRCA-Mutation-assoziierten triple-negativen Mammakarzinome betrug 15.9%, davon 14.02% mit BRCA-1-Mutation und 1.88% mit BRCA-2-Mutation (Abb.6). Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Tumorschnitte zeigten sich 55.1% der Schnitte gering, 44.9% stark IgκC positiv und 56.1% gering und 43.9% stark CD38 positiv (Abb. 7 und 8).

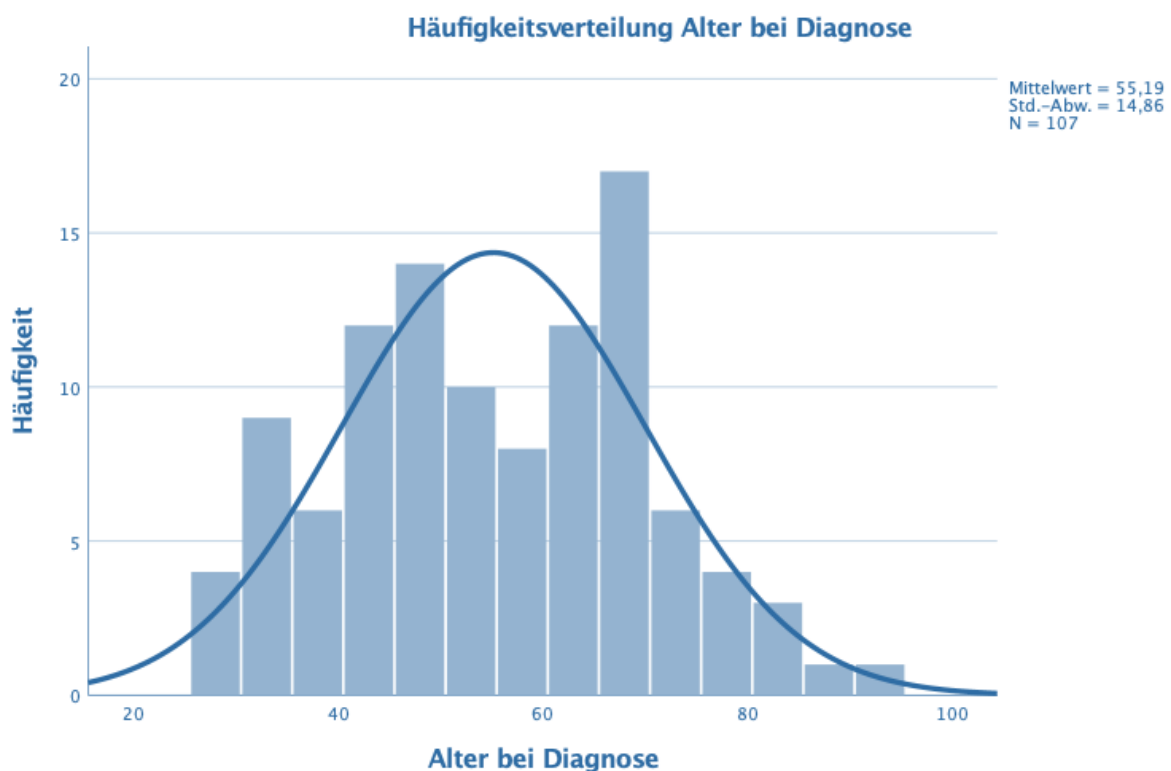


Abbildung 5: Absolute Häufigkeitsverteilung des Alters bei Diagnosestellung. Die Linie in der Graphik gibt bei 55 Jahren den Mittelwert an.

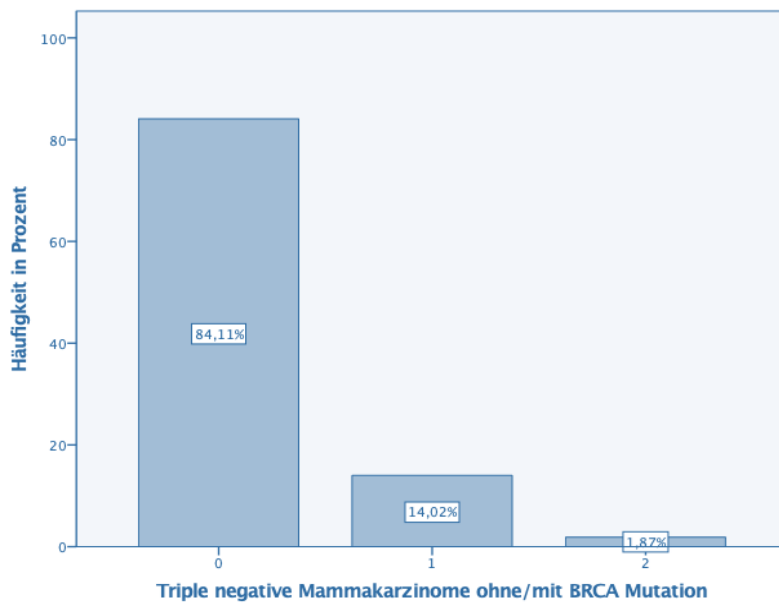


Abbildung 6: Anteil der Patientinnen mit BRCA-Mutation in Prozent (0: keine BRCA-Mutation, 1: BRCA-1-Mutation, 2: BRCA-2-Mutation)

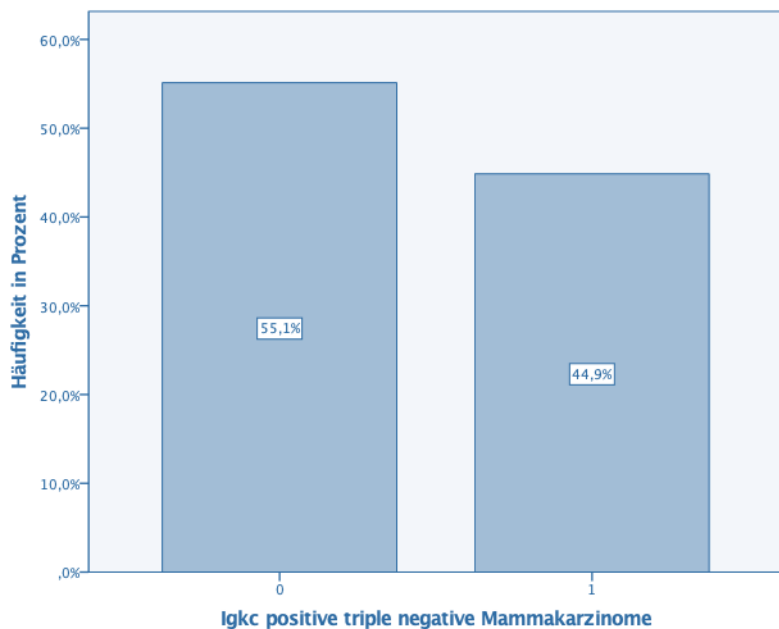


Abbildung 7: Anteil der IgκC-positiven triple-negativen Mammakarzinome in Prozent (0: geringe, 1: starke Infiltration)

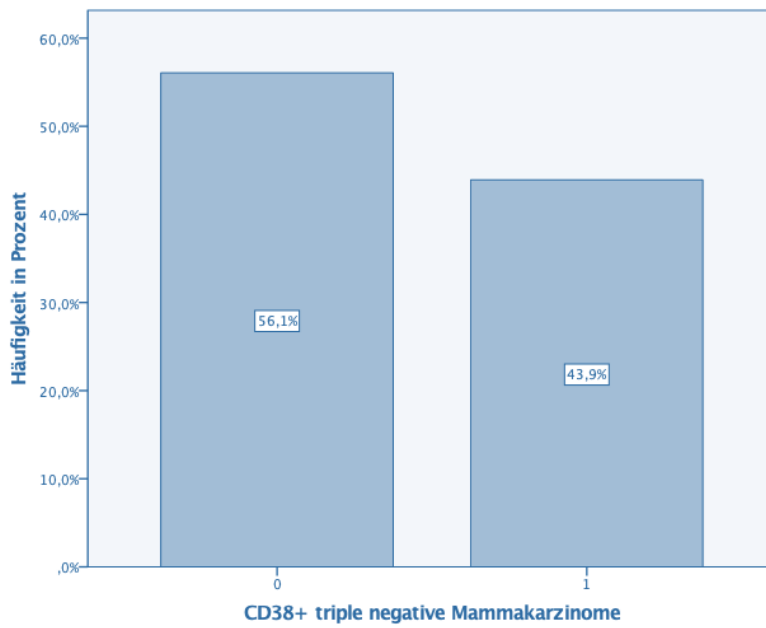


Abbildung 8: Anteil der CD38-positiven triple-negativen Mammakarzinome in Prozent

(0: geringe, 1: starke Infiltration)

3.2 Krankheitsverlauf

Die mediane Beobachtungszeit betrug ca. 5 Jahre. Zum Zeitpunkt der letzten Beobachtung waren 14% der Patientinnen verstorben, 81,3% lebten und 4,7% befanden sich im unbekanntem Status (Abb. 9).

Im Anschluss an die operative Behandlung des Mammakarzinoms erhielten 79 der Patientinnen eine Chemotherapie, 28 von den 107 Patientinnen waren ohne Chemotherapie (Abb. 10). Zum Zeitpunkt der letzten Beobachtung waren 88,8% der Patientinnen ohne Metastasen, 11,2% mit Metastasen (Abb. 11). Ein Rezidiv ihrer Erkrankungen gaben 3,7% der Patientinnen an, somit waren 96,3% ohne Rezidiv (Abb. 12).

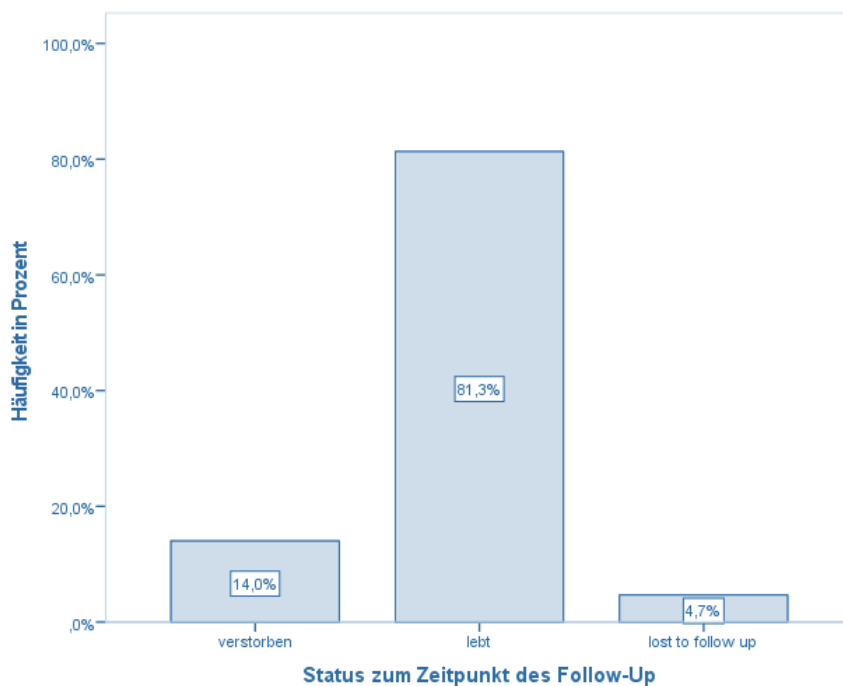


Abbildung 9: Status zum letzten Beobachtungszeitraum mit Anteilen in Prozent (verstorben/lebt/lost to follow up)

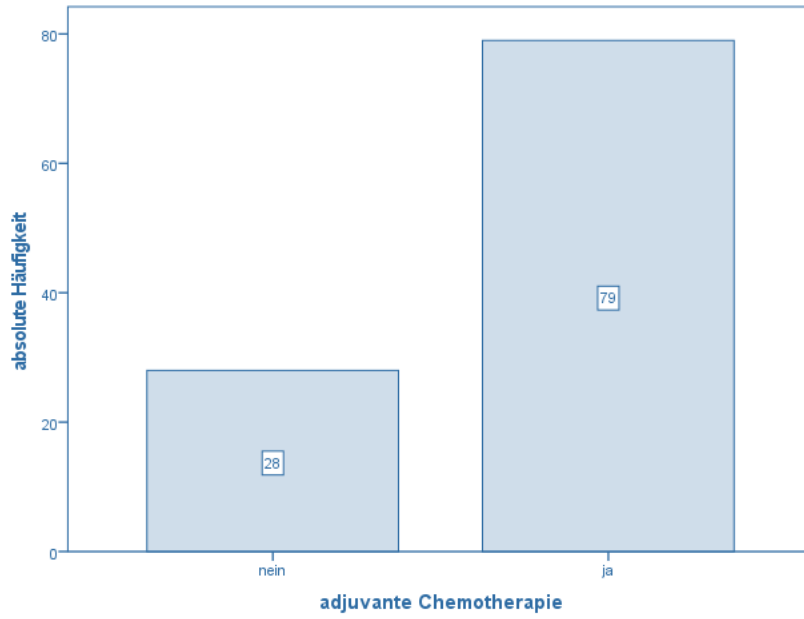


Abbildung 10: Anteil der Patientinnen in absoluten Zahlen mit/ohne adjuvante Chemotherapie (ja/nein)

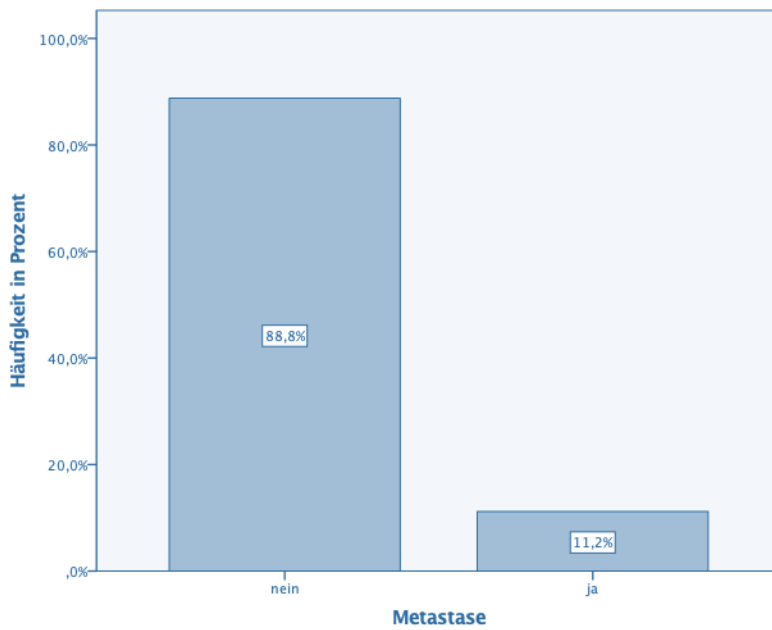


Abbildung 11: Anteil der Patientinnen in Prozent mit/ohne Metastasen (ja/nein)

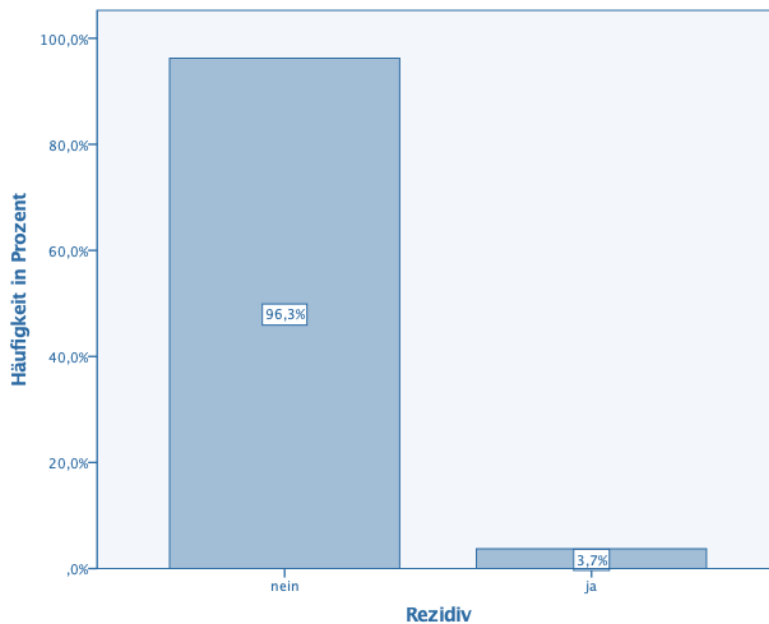


Abbildung 12: Anteil der Patientinnen in Prozent mit Rezidiv (ja/nein)

3.3 Überlebenszeitanalyse mit Kaplan-Meier

Zur Analyse der Prognose von triple-negativen Mammakarzinomen bezogen auf das Gesamtüberleben und das metastasenfreie Überleben eignet sich die Kaplan-Meier Methode in Kombination mit dem Log-Rank Test. Die Tumoren mit hoher IgκC- oder CD38-positiven Immunzellinfiltrationen (Score 2 und 3) wurden gegenüber den Tumoren mit wenig Infiltration (Score 0 und 1) in einer Graphik dargestellt und lassen die Überlebenszeit in Monaten vergleichend ablesen. Das statistische Signifikanzniveau bezogen auf das Patientenkollektiv wurde auf den p-Wert von unter 0.05 im Log Rank Test festgesetzt.

1. Patientinnen aus diesem Kollektiv mit einem Tumor mit starker Infiltration von IgκC-positiven Plasmazellen hatten eine tendenziell längere Gesamtüberlebenszeit. Der p-Wert im Log Rank Test lag bei 0.20 und damit oberhalb des festgelegten Signifikanzniveaus von 0.05. Eine statistische Signifikanz und damit eine Übertragung auf die Gesamtpopulation kann nicht getroffen werden (Abb. 13).

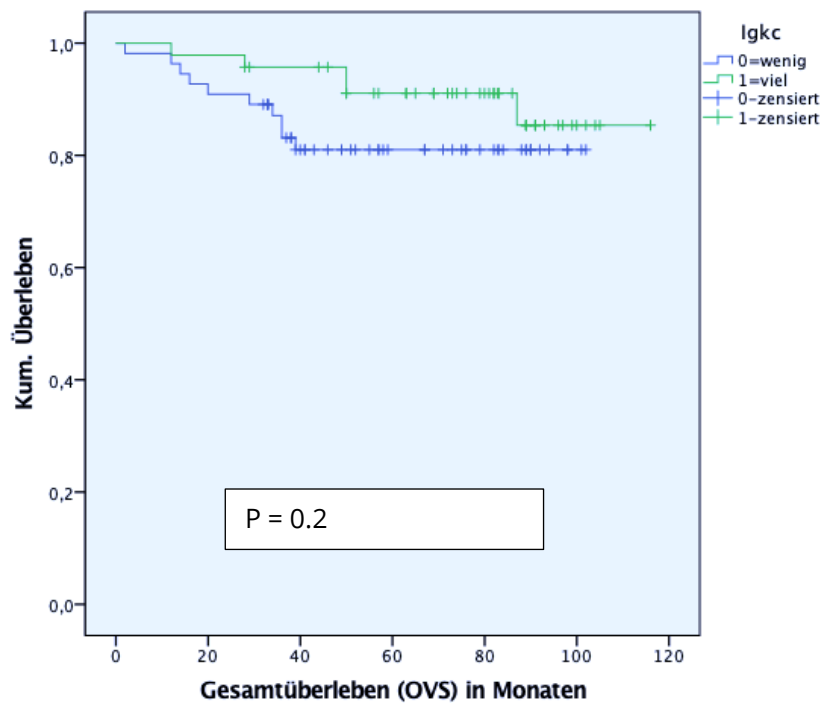


Abbildung 13: Kaplan-Meier Darstellung.

Gesamtüberlebenszeit in Monaten (x-Achse), Überlebenszeitwahrscheinlichkeit (y-Achse).

Patientinnen mit geringen/starken Infiltration der Tumoren mit IgκC positiven Plasmazellen (0: geringe Infiltration, 1: starke Infiltration mit IgκC positiven Plasmazellen)

2. Patientinnen mit Tumoren mit stark infiltrierten CD38-positiven Plasmazellen hatten ein tendenziell längeres Gesamtüberleben innerhalb des beobachteten Kollektivs. Der p-Wert beträgt hier 0.28, eine statistische Signifikanz wird nicht erreicht (Abb. 14).

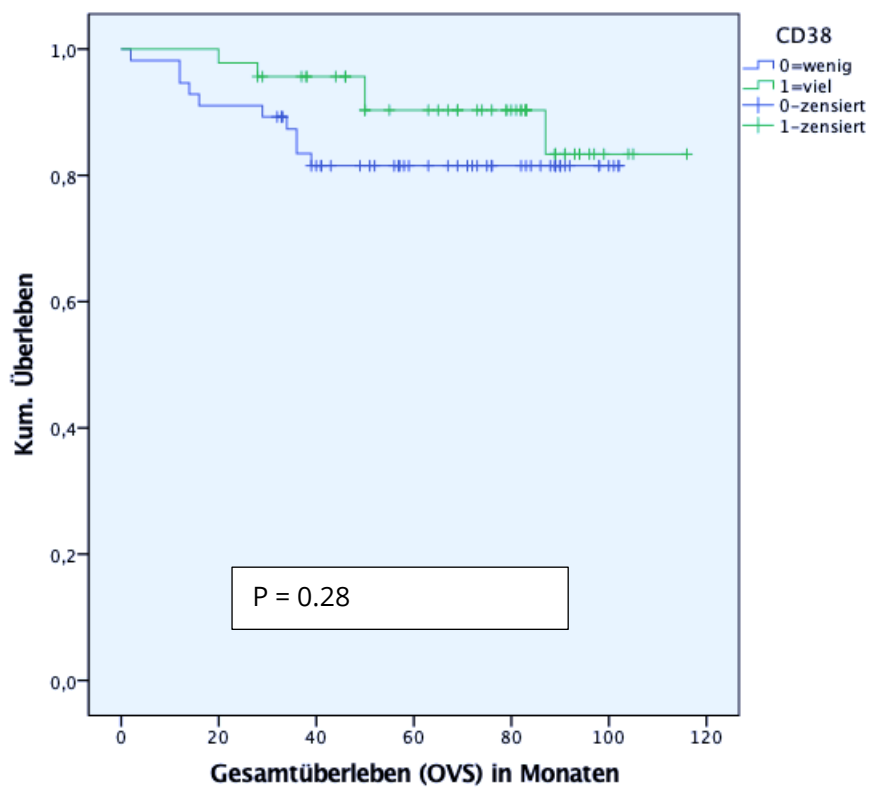


Abbildung 14: Kaplan-Meier Darstellung.

Gesamtüberlebenszeit in Monaten (x-Achse), Überlebenswahrscheinlichkeit (y-Achse).

Patientinnen mit geringen/starken Infiltration der Tumoren mit CD38-positiven Plasmazellen (0: geringe Infiltration, 1: starke Infiltration mit CD38-positiven Plasmazellen)

3. Die untersuchten Tumore von den Patientinnen mit einer starken Infiltration von IgκC-positiven Plasmazellen zeigten ein tendenziell längeres Überleben ohne den Auftritt einer Metastase. Der p-Wert beträgt 0.35. Eine statistische Signifikanz zum Niveau unter 0.05 wird hier nicht erreicht (Abb. 15).

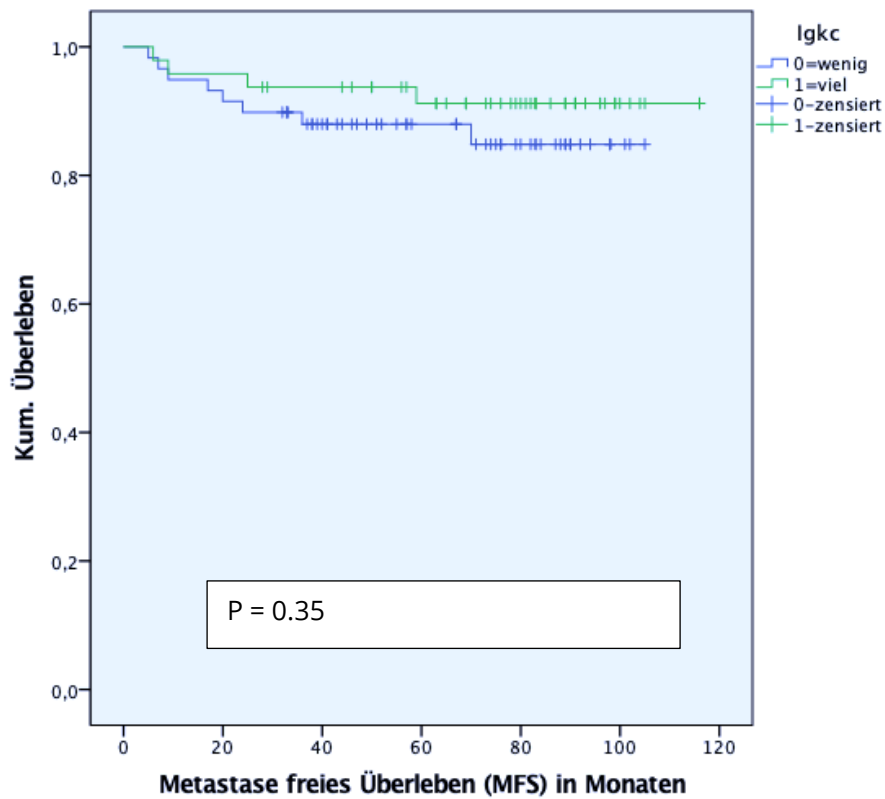


Abbildung 15: Kaplan-Meier Darstellung.

Metastasenfreie Überlebenszeit (MFS) in Monaten (x-Achse), Metastasenfreie Überlebenswahrscheinlichkeit (y-Achse).

Patientinnen mit geringen/starken Infiltration der Tumoren mit IgκC positiven Plasmazellen (0: geringe Infiltration, 1: starke Infiltration mit IgκC positiven Plasmazellen)

4. Das metastasenfreie Überleben bei den untersuchten Patientinnen mit Tumoren mit einer starken Infiltration von CD38-positiven Plasmazellen ist statistisch signifikant länger mit einem p-Wert von 0.039 zum Signifikanzniveau unter 0.05 (Abb. 16).

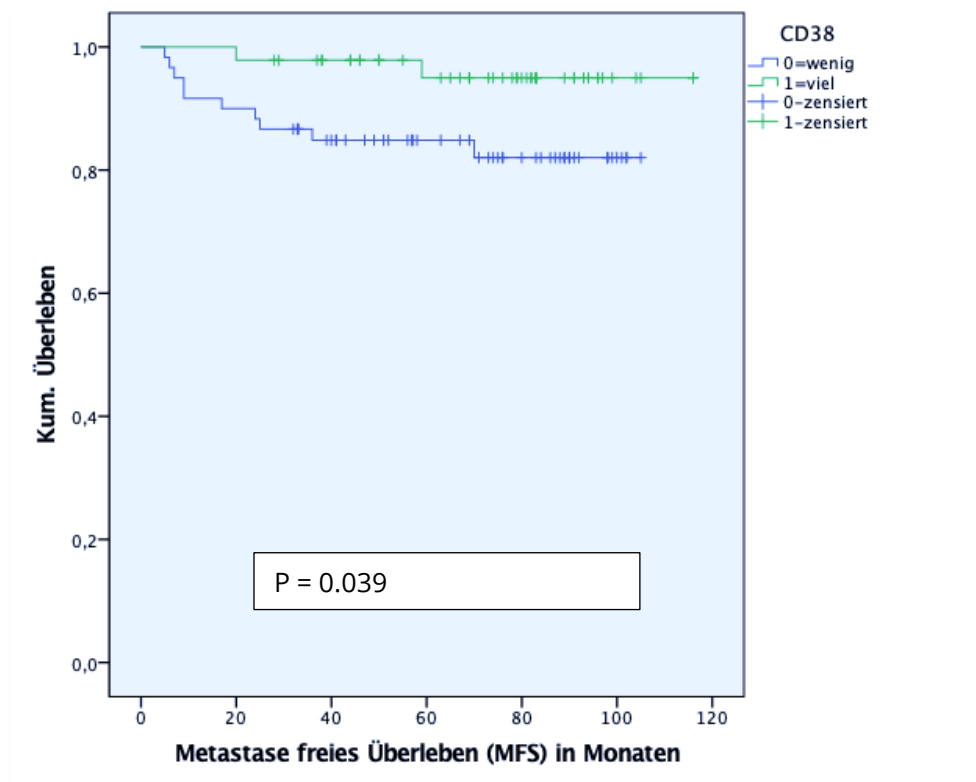


Abbildung 16: Kaplan-Meier Darstellung.

Metastasenfreie Überlebenszeit (MFS) in Monaten (x-Achse), Metastasenfreie Überlebenswahrscheinlichkeit (y-Achse).

Patientinnen mit geringen/starken Infiltration der Tumoren mit CD38-positiven Plasmazellen (0: geringe Infiltration, 1: starke Infiltration mit CD38-positiven Plasmazellen)

3.4 Prognostische Analyse mit Cox Regressionen

Mit Cox Regressionen wird untersucht, ob bestimmte Einflussgrößen eine prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben oder das metastasenfreie Überleben haben. Als Einflussgrößen (Kovariaten) wurde die Infiltration mit IgκC- und CD38-positiven Plasmazellen jeweils als stetige Kovariate für die uni- und multivariate Analyse gewählt. Die weiteren prognostischen Faktoren Alter, Tumorgröße, Nodalstatus und Grading wurden in Kategorien eingeteilt (Alter <50 oder >50 Jahre, Tumorgröße pT1 oder pT2-4, Nodalstatus pN0 oder pN1-3, Grading G1-2 oder G3). Das Signifikanzniveau wurde definiert als $p < 0.05$.

3.4.1 Uni- und multivariate Cox Regression von IgκC und CD38 im Hinblick auf das Gesamtüberleben (OVS)

Die uni- und multivariate Analyse ergab keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Infiltration mit IgκC oder CD38 und Gesamtüberleben der untersuchten Patientinnen. Mit Hilfe der Hazard Ratio ließ sich jedoch eine Tendenz aufzeigen. Die Hazard Ratio ist jeweils in der uni- und multivariaten Analyse niedriger als 1, d.h. je stärker die Infiltration mit IgκC im Tumor, umso geringer ist das Risiko zu versterben während des Beobachtungszeitraumes in der Gruppe der Patientinnen (Tab. 3-4).

Alter, Nodalstatus und Grading waren in der uni- und multivariaten Cox Regression nicht signifikant in dem beobachteten Kollektiv. Die Tendenz beim Alter war ein geringeres Risiko zu versterben in der Gruppe der über 50jährigen Patientinnen. Patientinnen mit dem Nodalstatus pN1-3 nach der TNM-Klassifikation hatten ein tendenziell höheres Risiko innerhalb der Beobachtungsphase zu versterben als Patientinnen mit einem pN0 Tumor. Hinsichtlich des Gradings war innerhalb des Kollektivs der G3 Status gegenüber G1-2 mit einem erhöhten Risiko zu versterben assoziiert (Tab. 3-5).

Statistisch signifikant war die Tumorgröße als Prognosefaktor in der univariaten Analyse. Patientinnen mit einer TNM-Klassifikation von pT2-4 zeigten gegenüber Patientinnen mit einem Tumor pT1 statistisch signifikant ein erhöhtes Risiko frühzeitig zu versterben (HR 3.913, 95% KI 1.104-13.872, $p = 0.035$) (Tab. 3).

Univariate Analyse			
OVS			
Variable	Hazard Ratio	95% KI	p-Wert
IgκC	0.704	0.372-1.335	0.283
CD38	0.749	0.446-1.414	0.434
Alter			
<50			
>50	0.816	0.295-2.2253	0.694
Tumorgröße			
pT1			
pT2-4	3.913	1.104-13.872	0.035
Nodalstatus			
pN0			
pN1-3	1.182	0.420-3.327	0.751
Grading			
G 1-2			
G 3	1.534	0.431-5.452	0.509

Tabelle 3: Cox Regression Univariate Analyse Gesamtüberleben (OVS)

Multivariate Analyse OVS			
Variable	Hazard Ratio	95% KI	p-Wert
IgκC	0.765	0.390-1.500	0.435
Alter			
<50			
>50	0.666	0.237-1.876	0.442
Tumorgröße			
pT1			
pT2-4	3.592	0.955-13.514	0.059
Nodalstatus			
pN0			
pN1-3	1.020	0.341-3.048	0.972
Grading			
G 1-2			
G 3	1.423	0.376-5.387	0.604

Tabelle 4: Cox Regression Multivariate Analyse Gesamtüberleben (OVS) mit IgκC

Multivariate Analyse OVS			
Variable	Hazard Ratio	95% KI	p-Wert
CD38	0.806	0.431-1.507	0.499
Alter			
<50			
>50	0.686	0.245-1.921	0.473
Tumorgröße			
pT1			
pT2-4	3.675	0.987-13.684	0.052
Nodalstatus			
pN0			
pN1-3	1.066	0.343-3.315	0.556
Grading			
G 1-2			
G 3	1.524	0.375-6.196	0.912

Tabelle 5: Cox Regression Multivariate Analyse Gesamtüberleben (OVS) mit CD38

3.4.2 Uni- und multivariate Cox Regression von IgκC und CD38 im Hinblick auf das metastasenfreie Überleben (MFS)

Die uni- und multivariate Untersuchung von IgκC als Prognosefaktor zeigte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das metastasenfreie Überleben in dem beobachteten Kollektiv. Mit Hilfe der Hazard Ratio ließ sich jedoch auch hier eine Tendenz aufzeigen. Die Hazard Ratio war jeweils in der uni- und multivariaten Analyse niedriger als 1, d.h. je stärker die Infiltration mit IgκC im Tumor, umso geringer war das Risiko für eine Metastasierung während des Beobachtungszeitraumes in der Gruppe der Patientinnen (Tab. 6-7).

CD38 zeigte sich als unabhängiger prognostischer Parameter in der multivariaten Cox Regression. Die Hazard Ratio ist niedriger als 1, somit war das Risiko des Auftretens einer Metastase im Laufe des Beobachtungszeitraumes von ca. 5 Jahren in der beobachteten Gruppe geringer, wenn eine Infiltration von CD38-positiven Plasmazellen im Tumor nachgewiesen wurde (HR 0.438, 95% KI 0.195-0.983, $p = 0.045$) (Tab. 8).

Alter, Tumorgröße und Grading waren in der uni- und multivariaten Cox Regression nicht signifikant in dem beobachteten Kollektiv. Die Tendenz beim Alter war ein geringeres Risiko für eine Metastase in der Gruppe der über 50jährigen Patientinnen. Patientinnen mit der Tumorgröße pT2-4 nach der TNM-Klassifikation hatten tendenziell ein höheres Risiko für eine Metastase innerhalb der Beobachtungsphase als Patientinnen mit einem pT1 Tumor (Tab. 6-8).

Der Nodalstatus als prognostischer Einfluss auf die metastasenfreie Überlebenszeit war in dem beobachteten Kollektiv in der uni- und multivariaten Cox Regression deutlich statistisch signifikant. Die Gruppe mit einer pN1-3 TNM-Klassifikation, d.h. mit Befall der Lymphknoten, hatte ein höheres Risiko eine Metastase während des Beobachtungszeitraumes zu bekommen (univariate Analyse: HR 5.572, 95% KI 1.508-20.591, $p=0.010$, multivariate Analyse: HR 6.662, 95% KI 1.639-27.073, $p=0.008$) (Tab. 6-8).

Univariate Analyse			
MFS			
Variable	Hazard Ratio	95% KI	p-Wert
IgκC	0.852	0.415-1.751	0.664
CD38	0.508	0.252-1.027	0.059
Alter			
<50			
>50	0.677	0.218-2.099	0.499
Tumorgröße			
pT1			
pT2-4	2.641	0.715-9.758	0.145
Nodalstatus			
pN0			
pN1-3	5.572	1.508-20.591	0.010
Grading			
G 1-2			
G 3	0.497	0.158-1.566	0.233

Tabelle 6: Cox Regression Univariate Analyse metastasenfrees Überleben (MFS)

Multivariate Analyse MFS			
Variable	Hazard Ratio	95% KI	p-Wert
IgκC	0.910	0.406-2.035	0.818
Alter			
<50			
>50	0.537	0.160-1.802	0.314
Tumorgröße			
pT1			
pT2-4	2.219	0.537-9.168	0.271
Nodalstatus			
pN0			
pN1-3	4.756	1.216-18.601	0.025
Grading			
G 1-2			
G 3	0.494	0.143-1.712	0.266

Tabelle 7: Cox-Regression Multivariate Analyse metastasenfrees Überleben (MFS) mit IgκC

Multivariate Analyse MFS			
Variable	Hazard Ratio	95% KI	p-Wert
CD38	0.438	0.195-0.983	0.045
Alter			
<50			
>50	0.496	0.152-1.619	0.245
Tumorgröße			
pT1			
pT2-4	1.869	0.459-7.603	0.382
Nodalstatus			
pN0			
pN1-3	6.662	1.639-27.073	0.008
Grading			
G 1-2			
G 3	0.875	0.228-3.366	0.846

Tabelle 8: Cox-Regression Multivariate Analyse metastasenfrees Überleben (MFS) mit CD38

3.5 Ist die Stärke der Infiltration von Plasmazellen im Tumor abhängig von der Stärke des Proliferationsmarkers Ki67?

Zur Beantwortung der Nebenfragestellungen wurde die Stärke der Infiltration mit Plasmazellen durch die Stärke der Infiltration mit den Plasmazell-Markern IgκC und CD38 definiert. Der Proliferationsmarker Ki67 wird in Prozent von 0 bis 100 angegeben und das Grading des Tumors von G1 bis G3. Die Stärke der Infiltration mit IgκC und CD38 wird anhand des Scores von 0 bis +3 bewertet.

Wenn man die Plasmazell-Marker CD38 und IgκC unabhängig voneinander betrachtet und den Zusammenhang zwischen der Stärke der Infiltration mit CD38- oder IgκC-positiven Immunzellen im Tumor mit der Stärke des Proliferationsmarkers Ki67 untersucht, dann liefert die ordinale Regression folgende Ergebnisse:

1. Bei den Fällen mit CD38-positiven Nachweis von Plasmazellen im Tumor zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zu der Stärke von Ki67 mit einem p-Wert von 0.024 zum festgelegten Signifikanzniveau unter 0.05. Die Effektstärke war laut Parameterschätzer positiv, d.h. je höher die Infiltration mit CD38 positiven Lymphozyten, desto höher der Proliferationsfaktor Ki67 im Tumor (Abb. 17).

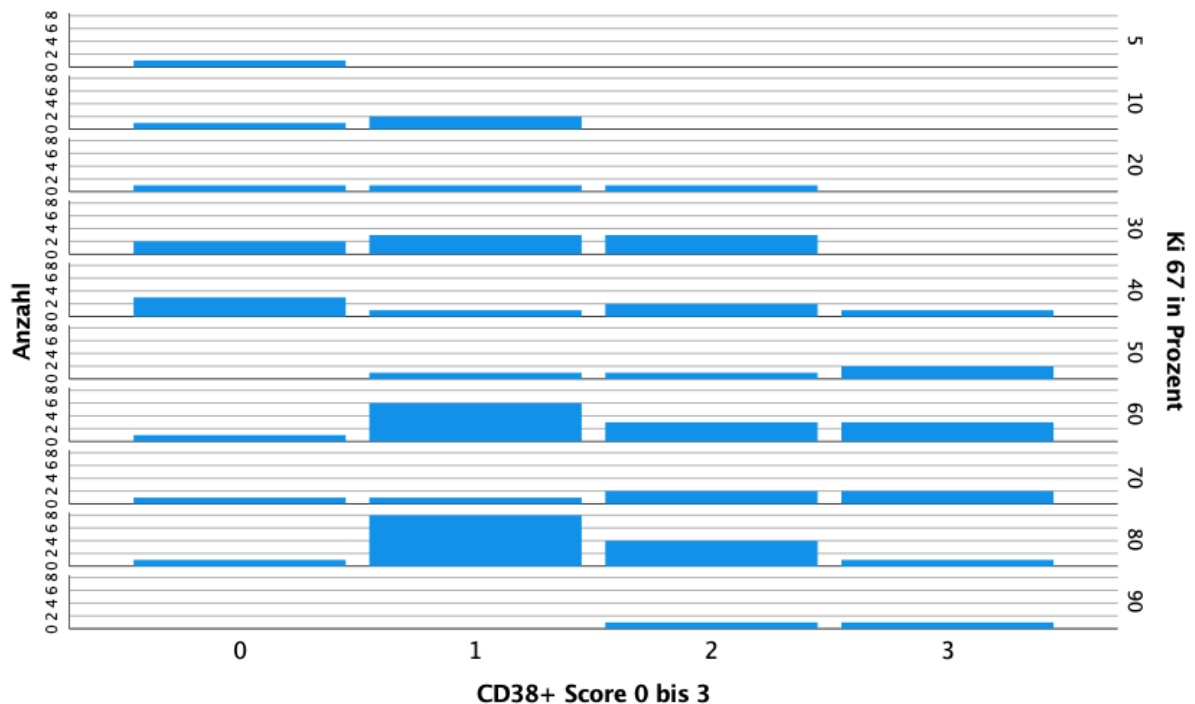


Abbildung 17: Effektstärke von CD38-positiven triple-negativen Mammakarzinomen Score 0 bis 3 auf den Proliferationsmarker Ki67 in Prozent

2. Betrachtet man IgκC als Immunzellmarker ergibt die Berechnung einen p-Wert von 0.36 und somit liegt kein statistischer Zusammenhang bezogen auf den Proliferationsmarker Ki67 vor. Die Tendenz des Parameterschätzers war positiv, d.h. je stärker die Infiltration mit IgκC positiven Lymphozyten, desto höher der Proliferationsmarker Ki67 im Tumor.

3.6 Ist die Stärke der Infiltration von Plasmazellen im Tumor abhängig vom Grading des Tumors?

Wenn man die Plasmazell-Marker CD38 und IgκC unabhängig voneinander betrachtet und den Zusammenhang zwischen der Stärke der Infiltration mit CD38- oder IgκC-positiven Immunzellen mit dem Grading des Tumors untersucht, dann liefert die ordinale Regression folgende Ergebnisse:

1. Betrachtet man CD38 als Plasma-Zellmarker ergab die Berechnung einen p-Wert von 0.059 und somit liegt kein statistischer Zusammenhang bezogen auf das Grading des Tumors vor. Die Tendenz des Parameterschätzers war positiv, d.h. je stärker die Infiltration mit CD38-positiven Lymphozyten, desto höher ist tendenziell das Grading.
2. Betrachtet man IgκC als Immunzellmarker ergab die Berechnung einen p-Wert von 0.437 und somit liegt auch hier kein statistischer Zusammenhang bezogen auf das Grading des Tumors vor. In diesem Fall war die Tendenz der Effektstärke bei dem beobachteten Kollektiv ebenfalls positiv. Das bedeutet, je höher der IgκC Score, desto höher ist tendenziell das Grading des Karzinoms.

4. Diskussion

4.1. Gesamtüberleben (OVS) und das metastasenfrie Überleben (MFS) in Abhängigkeit von der Stärke der Infiltration mit IgκC- und CD38-positiven Plasmazellen

Die Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen und das metastasenfrie Überleben in Abhängigkeit von der Stärke der Infiltration von IgκC- und CD38-positiven Plasmazellen wurde anhand der Kaplan-Meier Methode berechnet.

Die Tendenz zeigte in dem untersuchten Kollektiv ein längeres Gesamtüberleben (OVS) bei Tumoren mit einer starken Infiltration von IgκC- und CD38-positiven Plasmazellen. Eine statistische Signifikanz bezüglich des längeren Gesamtüberlebens konnte jedoch bei der Untersuchung nicht erreicht werden. Ursächlich ist am ehesten das mit 107 Personen eher kleine betrachtete Kollektiv.

IgκC als Biomarker nutzen Chen et al. bereits an 335 Patientinnen mit Brustkrebs ohne Befall der Lymphknoten, die an der Uniklinik Mainz von 1985 bis 2001 behandelt wurden. Davon hatten 160 Patienten eine Infiltration mit IgκC-positiven Lymphozyten, die eine statistisch signifikante längere Überlebenszeit aufwiesen. In Östrogen-Rezeptor negativen Tumoren und in Luminal B Mammakarzinomen war die Signifikanz besonders deutlich. Als Bias für die Bewertung der Prognose in der vorliegenden Arbeit ist die adjuvante Chemotherapie zu betrachten. Bei Chen et al. wurden nur die Patientinnen untersucht, die keine adjuvante Chemotherapie erhielten [37]. In dem betrachteten Kollektiv dieser Arbeit erhielten 79 von den 107 Patientinnen eine adjuvante Chemotherapie. 28 Patientinnen waren ohne adjuvante Therapie, obwohl eine allgemeine Empfehlung zur Chemotherapie bei triple-negativen Tumoren besteht. Laut den Ergebnissen der Befragung der Patientinnen per Fragebogen und nach der Analyse der Datenbank waren die häufigsten Gründe dafür eine allgemeine Ablehnung oder ein Abbruch der Chemotherapie bei Unverträglichkeit durch Nebenwirkungen. Außerdem wurden bei Chen et al. alle Arten von Mammatumoren betrachtet, während in dem untersuchten Kollektiv dieser Arbeit nur triple-negative Mammakarzinome ausgewählt wurden.

Mit dem Biomarker IgκC konnte in dem Kollektiv eine Tendenz zum längeren metastasenfremen Überleben aufgezeigt werden, jedoch wurde die statistische Signifikanz nicht erreicht.

Schmidt et al. untersuchten im Jahre 2012 anhand von Genexpressionsanalysen das metastasenfreme Überleben in Abhängigkeit von der IgκC Expression an 965 Patientinnen mit nodalnegativem, adjuvant unbehandeltem Brustkrebs. In der Studie von Schmidt et al. wurden nicht nur triple-negative Mammakarzinome betrachtet, sondern alle Subtypen des Brustkrebses. Daneben wurde IgκC im Kolonkarzinom und im nichtkleinzelligen Karzinom sowie dem Ovarialkarzinom nachgewiesen. Zusätzlich wurde ein statistisch signifikantes Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie mit Anthrazyklinen festgestellt, wenn eine hohe Anzahl IgκC positiver Plasmazellen im Tumor gefunden wurde (p-Wert<0.001) [18].

Heimes et al. erforschten die prognostische Relevanz von IgκC bei 193 Patientinnen mit Brustkrebs unterschiedlicher Subtypen, die eine adjuvante Chemotherapie erhielten. Dabei postulierten die Autoren im Jahr 2021 ein statistisch signifikant verlängertes metastasenfremes Überleben bei Patientinnen mit einer starken Infiltration von IgκC-positiven Plasmazellen im Tumor (p-Wert=0.02). Unter den Patientinnen befanden sich 20 Patientinnen mit einem triple-negativen Mammakarzinom [38].

In einer ebenfalls aktuellen Studie von Schmidt et al. wurde IgκC unter allen Typen am meisten in triple-negativen Tumoren nachgewiesen. Die Autorinnen und Autoren untersuchten retrospektiv die Rolle von IgκC-positiven Plasmazellen beim Brustkrebs im Frühstadium. Die Wissenschaftler wiesen per PCR (Polymerase-chain-reaction) IgκC nach und nutzten Cox Regressionen und die Kaplan-Meier Methode zur Darstellung des krankheitsfreien Zeitraums (DDFS, distant-disease-free-survival). Der krankheitsfreie Zeitraum war bei triple-negativen Mammatumoren signifikant länger, wenn IgκC in den Tumoren exprimiert war (p-Wert=0.029) [39].

Das hervorzuhebende Ergebnis bei der Untersuchung der Patientinnen aus dem vorliegenden Kollektiv ist ein statistisch signifikantes längeres metastasenfremes Überleben (MFS) bei Patientinnen mit einer starken Infiltration von CD38-positiven Plasmazellen im triple-negativen Mammakarzinom (p-Wert=0,039).

Yeong et al. postulierten im Jahre 2018 bereits ein statistisch signifikant längeres krankheitsfreies Überleben (DFS, disease free survival) bei Patientinnen aus Singapur mit CD38-positiven Plasmazellen im triple-negativem Mammakarzinom (p -Wert=0.004). Das Gesamtüberleben war wie bei dem beobachteten Kollektiv der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht signifikant verlängert. Das Kollektiv mit 269 Patientinnen war mehr als doppelt so groß. In Kombination mit einem IgG Gen wie z.B. den Ig κ C-positiven Plasmazellen im Mikromilieu des triple-negativen Mammakarzinoms wurde eine höhere positive Prognose bezogen auf das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben aufgezeigt. Als Vergleichsparameter betrachteten die Wissenschaftler die etablierten Prognosefaktoren Alter, Tumorgroße, Grading und Nodalstatus [21].

4.2. Prognostische Bedeutung von Ig κ C, CD38, Alter, Tumorgroße, Nodalstatus und Grading

Mit Hilfe der Cox Regression konnte eine starke Infiltration des triple-negativen Mammakarzinoms mit CD38-positiven Plasmazellen in dem beobachteten Kollektiv als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert werden. Patientinnen mit einer stärkeren Infiltration mit CD38-positiven Plasmazellen hatten ein günstigeres Outcome im Hinblick auf das metastasenfreie Überleben (HR 0.438, 95% KI 0.195-0.983, $p=0.045$). Die multivariate Analyse schloss zudem weitere Prognosefaktoren wie Alter, Tumorgroße, Nodalstatus und Grading ein. Neben CD38 war auch der Nodalstatus ein unabhängiger Prognosefaktor, wobei der Lymphknotenbefall bei Erstdiagnose mit einem höheren Risiko einer Fernmetastasierung im weiteren Verlauf einherging (HR 6.662, 95% KI 1.639-27.073, $p=0.008$). Im Gegensatz zu CD38 konnte im Hinblick auf Ig κ C weder in der uni- noch in der multivariaten Analyse hinsichtlich des Gesamtüberlebens und metastasenfreien Überlebens ein signifikanter Effekt gezeigt werden.

Schmidt et al. untersuchten in einer im Jahr 2021 veröffentlichten Studie die prognostische Bedeutung von Ig κ C an Mammatumoren im frühen Stadium. Die Autoren beobachteten das krankheitsfreie Überleben (DDFS=distant disease free survival). Darunter waren 132 Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom vertreten, die als

Kollektiv getrennt von den anderen Mammakarzinom Subtypen betrachtet wurden. IgκC wurde wie auch in der vorliegenden Untersuchung als stetige Kovariate in der Rechnung eingesetzt [39]. Die univariate Cox Regressionsanalyse ergab keine statistische Signifikanz für den Einfluss von IgκC auf das krankheitsfreie Überleben, die Tendenz war jedoch eine günstigere Prognose bei zunehmender Infiltrationsstärke des Tumors mit IgκC-positiven Plasmazellen. Unter dem Einfluss von weiteren Prognosefaktoren wie Alter, Tumorgröße, Nodalstatus und Grading des Tumors in der multivariaten Analyse war der Effekt statistisch signifikant (HR 0.843, 95% KI 0.724–0.983, $p=0.029$). Im Vergleich zu der hier vorliegenden Untersuchung war die Tumorgröße in der Studie von Schmidt et al. nicht signifikant als Einfluss auf die Prognose. Der Nodalstatus jedoch war ebenfalls statistisch signifikant in der uni- und multivariaten Analyse und ist somit auch in der beobachteten Gruppe ein unabhängiger Einflussfaktor auf das krankheitsfreie Überleben. Der Lymphknotenbefall wirkt sich innerhalb des Kollektivs triple-negativer Mammakarzinome negativ auf das krankheitsfreie Überleben aus [39]. Das Ergebnis der Untersuchungen von Schmidt et al. bestärkt die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit.

In der Studie von Chen et al. aus dem Jahre 2012 zeigte IgκC einen unabhängigen statistisch signifikant prognostischen Einfluss auf das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben in der uni- und in der multivariaten Analyse. Jedoch wurden in der Studie alle Subtypen des Mammakarzinoms betrachtet. Histopathologisch wiesen nur 62 der 335 Patientinnen einen triple-negativen Status auf [37].

Eine statistische Signifikanz in der uni- und multivariaten Analyse des prognostisch günstigen Einflusses einer starken Infiltration mit IgκC-positiven Plasmazellen auf ein verlängertes metastasenfreies Überleben postulierten ebenfalls die Autoren Heimes et al. im Jahre 2021, hier wurde ein Kollektiv von knapp 200 adjuvant chemotherapeutisch behandelten Patientinnen untersucht, von denen ca. 10% triple-negative Mammakarzinome aufwiesen (univariate Analyse: HR 1.931, 95% KI 1.087–3.431, $p=0.025$; multivariate Analyse: HR 2.070, 95% KI 1.088–3.938, $p=0.027$) [38]. In der Studie von Heimes et al. war der Nodalstatus unter den Patientinnen bei der univariaten Analyse ein prognostisch signifikanter Faktor im Hinblick auf das metastasenfreie Überleben, wobei bei der hier vorliegenden Untersuchung der triple-negativen Mammatumoren der Effekt in der uni- und multivariaten Cox Regression statistisch signifikant war.

Der Plasmazellmarker CD38 wurde neben anderen Markern für tumorinfiltrierende Lymphozyten in einer retrospektiven Untersuchung an 114 Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom in Japan angewandt. Die Studie erschien im Jahr 2021 und die Wissenschaftler Kuroda et al. postulierten einen signifikant prognostisch günstigen Einfluss von CD38 in Kombination mit TILs für das rezidivfreie Überleben in einer multivariaten Cox Regressionsanalyse (HR = 0.323, 95% KI 0.109–0.960, $p=0.042$) [40]. Das Gesamtüberleben wurde in der beobachteten Gruppe nicht signifikant beeinflusst. Die Tendenz des Effektes war ein geringeres Risiko zu versterben, wenn eine starke Infiltration des Tumors mit CD38 und TILs immunhistochemisch nachgewiesen war. Hier wurde im Vergleich zu der vorliegenden Studie nicht der Marker CD38 allein immunhistochemisch betrachtet, sondern in Kombination mit anderen B-Zell Marker wie CD20, CD138, sowie TILs im Allgemeinen in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung [40].

Yeong et al. veröffentlichten 2018 eine Studie, in der an 269 Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom die prognostische Bedeutung von CD38-positiven Plasmazellen für das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben mit Hilfe von Cox Regressionen analysiert wurde. In der multivariaten Analyse unter Einbezug der Prognosefaktoren Alter, Tumorgröße, Nodalstatus und Grading war CD38 ein unabhängiger Prognosefaktor für das krankheitsfreie Überleben, wenn eine starke Infiltration mit CD38 nachgewiesen wurde (HR 0.44, 95% KI 0.26-0.77, $p=0.004$) [21].

4.3. Abhängigkeit der Stärke der Infiltration mit IgκC- und CD38-positiven Plasmazellen vom Proliferationsmarker Ki67 und vom Grading

Triple-negative Mammakarzinome enthalten, wie bereits dargestellt, eine hohe Anzahl von tumorinfiltrierenden Immunzellen und zeigen eine hohe Expression von PD-L1. Außerdem wachsen sie sehr schnell und sind somit in der Zellteilung sehr rasch. Die schnelle Zellteilung erklärt das gute Ansprechen auf eine Chemotherapie [41].

Die Immunogenität zeichnet sich außerdem durch neu entstandene Angriffspunkte für das Immunsystem in Form von Mutationen aus. Über Mutationen in Tumoren entstehen Neoantigene. In einer Studie aus dem Jahr 2019 wurde unter anderem durch RNA-

Sequenzierung die Mutationsrate im Brustkrebs untersucht. Narang und seine Kollegen postulierten die höchste Mutationsrate im triple-negativen Mammakarzinom [42].

Die Marker CD38 und IgκC repräsentieren in der vorliegenden Arbeit die tumorinfiltrierenden Plasmazellen. Der Proliferationsmarker Ki67 und das Grading eines Tumors geben an, wie aggressiv der Tumor ist und sind bereits etablierte Prognosefaktoren und Entscheidungshilfen für die Therapie.

Inwieweit die Stärke des Proliferationsmarkers Ki67 oder des Grading des triple-negativen Mammakarzinoms einen Einfluss auf die Stärke der Infiltration mit Plasmazellen hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit als Nebenfragestellung untersucht.

In einer Studie, die im Jahr 2019 veröffentlicht wurde, untersuchten Hashimi et al. immunhistochemische die Stärke des Proliferationsmarkers Ki67 in unterschiedlichen Typen des Brustkrebses. In triple-negativen Mammakarzinomen wurde ein medianer Proliferationsindex Ki67 von 50% nachgewiesen. Mit diesem Wert war der höchste Index von Ki67 in triple-negativen Mammakarzinomen nachgewiesen. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch für keinen Subtypen erreicht werden, obwohl die Stichprobe mit fast 2000 Fällen groß genug erscheint [43].

Somit war bei den triple-negativen Mammatumoren der vorliegenden retrospektiven Studie der Proliferationsmarker Ki67 in einer höheren Ausprägungsstärke zu erwarten. Tatsächlich zeigte die ordinale Regression einen positiven Effekt. Das bedeutet, eine Tendenz ist erkennbar. Je höher der Proliferationsmarker Ki67 des Tumors, desto höher der Nachweis von tumorinfiltrierenden CD38- und IgκC-positiven Lymphozyten in dem beobachteten Kollektiv.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang wurde zwischen der Stärke der Infiltration mit CD38-positiven Lymphozyten und der Höhe des Proliferationsmarkers Ki67 berechnet (p-Wert=0.024). Je höher der Proliferationsmarker Ki67 in Prozent, desto stärker der Gehalt an CD38-positiven Lymphozyten im triple-negativen Mammakarzinom bei dem beobachteten Kollektiv. In der Abb.17 ist die Effektstärke anhand des Scores von CD38 in Abhängigkeit von der Stärke des Ki67 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Stärke des Proliferationsmarkers Ki67 bei den Fällen mit zunehmendem Score von 0-3 zunimmt und bei dem stärksten CD38 Score 3 in allen Fällen stets höher als 40% beträgt.

Zwischen dem Grading und der Expression von CD38 und IgκC konnte kein statisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Auch hier war jedoch die Effektstärke positiv. Die Tendenz zeigt eine höhere Infiltration mit Immunzellen mit zunehmendem Grading. Aufgrund der bereits erwähnten Aggressivität des triple-negativen Mammakarzinoms und der hohen Anzahl der Neoantigene durch den starken Mutationsdruck lässt sich dieser Effekt erklären.

Dazu findet sich eine Studie von Li et al. aus dem Jahre 2015. Die Wissenschaftler untersuchten die bereits etablierten Prognosefaktoren an allen Subtypen des Mammakarzinoms. Sie publizierten bei ca. 94% der untersuchten Patientinnen mit einem triple-negativen Mammakarzinom den histologischen Grad 2 oder 3 nach Elston und Ellis [44].

4.4. Stärken und Schwächen der Studie

Das Kollektiv der retrospektiven Studie mit 107 Patientinnen entstand als systematische Auswahl aus 1400 Fällen mit primär operablem Brustkrebs. Es handelte sich dabei um eine Datenbank mit Patienten, die innerhalb eines Zeitraumes von 2009 bis 2016 an der Frauenklinik der Uniklinik Mainz eine brusterhaltende Operation oder Mastektomie erhielten. Die Tumoren wurden als Paraffinschnitte im Institut der Pathologie der Uniklinik Mainz konserviert.

Ein Ethikantrag erfolgte ordnungsgemäß und bestand als Sammelantrag für alle Paraffinschnitte nach Zustimmung der operierten Patientinnen.

Aufgrund der ca. 10-15% aller Mammakarzinome bedingten Seltenheit von triple-negativen Mammakarzinomen erklärt sich die dadurch bedingte geringe Stichprobe.

Als Untersuchungsmethode der Fragestellung wurde die immunhistochemische Färbung der Tumorschnitte der ausgewählten Patientinnen genutzt, um die Stärke der Infiltration mit Immunzellen der triple-negativen Tumoren sichtbar zu machen. Der Antikörper IgκC als Marker der Plasmazellen ist bereits bekannt und die Methode somit zuverlässig. Im Jahr 2012 fanden Schmidt et al. heraus, dass IgκC ein Marker ist, der besonders in Brustkrebs

und nicht kleinzelligem Lungenkarzinom stark ausgeprägt ist [18]. Der Einfluss der Stärke der Infiltration mit dem Plasmazellmarker IgκC bei lymphknotennegativen Mammakarzinomen auf das Überleben wurde von Chen et al. untersucht [37].

Um eine zusätzliche Verstärkung der Untersuchung zu ermöglichen, wurden die Paraffinschnitte in doppelter Ausführung bestellt und neben IgκC zusätzlich mit dem Plasmazellmarker CD38 immunhistochemisch gefärbt. Der Marker CD38 wurde in der Vergangenheit ebenfalls bei triple-negativen Mammakarzinomen als Plasmazell-Marker angewandt. In einer Studie aus dem Jahr 2018 nutzen Yeong et al. unter anderem die Immunhistochemie mit CD38 an über 200 triple-negativen Mammakarzinomen [21]. Außerdem wurde in einer retrospektiven Studie aus dem Jahr 2020 von Seow et al. ebenfalls mittels Immunhistochemie an über 200 triple-negativen Mammakarzinomen, die eine hohe Infiltration mit Plasmazellen aufwiesen, unter anderen Markern statistisch signifikant eine starke Infiltration mit dem Plasmazellmarker CD38 aufgezeigt (p-Wert<0.0001) [45].

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Tumorschnitte erfolgte von zwei unabhängig voneinander arbeitenden Untersuchern unter dem Lichtmikroskop, um eine gewisse Objektivität zu erhalten. Bei Differenzen in der Vergabe der Score Stärke wurde der jeweilige Tumorschnitt erneut gemeinsam betrachtet und bewertet.

Zur Erfassung der Prognose wurde der entwickelte Fragebogen genutzt und erwies sich als erfolgreiche Methode. Die Befragung war dadurch aktuell und freiwillig. Der Fragebogen konnte in Ruhe ausgefüllt werden und portofrei an die Frauenklinik zurückgeschickt werden. Einige Informationen zur Prognose ließen sich in der bereits erwähnten Datenbank der Frauenklinik ablesen und vervollständigten fehlende Antworten. Nur einige wenige Fragebogen kamen nicht zurück. Von einer telefonischen Abfrage des aktuellen Krankheitszustandes wurde abgesehen, um eine möglichst objektive Haltung zu bewahren und die Freiwilligkeit der Angaben zu bewahren.

5. Zusammenfassung

Das triple-negative Mammakarzinom zeichnet sich aufgrund der fehlenden Angriffsmöglichkeiten alternativer Therapiemöglichkeiten mit einer ungünstigen Prognose aus und ist aggressiv im Wachstum. Das wissenschaftliche Interesse erhofft sich durch Forschung an spezifischen Merkmalen des Tumors neue Angriffsmöglichkeiten und Aussagen bezüglich der Prognose des Tumors zu schaffen.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass in dem beobachteten Kollektiv die starke Infiltration mit spezifisch IgκC- und CD38-positiven Immunzellen ein längeres Gesamtüberleben und ein längeres metastasenfreies Überleben bedeutete, somit die Prognose besser war. Eine statistische Signifikanz konnte tatsächlich bei der Untersuchung von CD38 als Biomarker für Plasmazellen in Bezug auf das verlängerte metastasenfreie Überleben erreicht werden. In der multivariaten Analyse mit Hilfe der Cox Regression konnte die Infiltration mit CD38-positiven Plasmazellen als unabhängiger prognostischer Faktor im Hinblick auf das metastasenfreie Überleben in dem beobachteten Kollektiv identifiziert werden. Unter Einbezug der prognostischen Faktoren Alter, Tumorgröße, Nodalstatus und Grading zeigte sich dabei ein geringeres Risiko für das Auftreten einer Metastase in dem Beobachtungszeitraum.

Die Stärke der Infiltration mit CD38-positiven Immunzellen jedoch in Bezug auf das Gesamtüberleben oder IgκC als B-Zell-Marker in Bezug auf das Gesamtüberleben und das metastasenfreie Überleben zeigten eine Tendenz bei dem zugrunde liegenden Kollektiv. Der Effekt wies eine bessere Prognose auf, wenn das Immunsystem den Tumor angriff und infiltrierte. Ein begrenzender Faktor, der vermutlich die Übertragung auf die Allgemeinheit in diesen Punkten verhindert, war die geringe Stichprobe. Aufgrund des mit ca. 10-15% aller Mammatumoren seltenen triple-negativen Mammakarzinoms war in dieser Arbeit keine größere Stichprobe aus den verfügbaren Daten möglich.

Die Beeinflussung des körpereigenen Immunsystems durch die bereits in dieser Arbeit dargestellten Immuncheckpoint-Inhibitoren wurde in klinischen Studien erforscht und Medikamente stehen zur Verfügung. Somit wird eine spezifische Therapiemöglichkeit aus den Erkenntnissen der bisherigen Untersuchungen triple-negativer Mammatumoren angewandt.

Eine zusätzliche Erkenntnis ist aus der Bearbeitung der Nebenfragestellung in dieser Arbeit entstanden. Untersucht wurde die Abhängigkeit der Stärke der Infiltration des Tumors mit Plasmazellen vom Grading des Tumors oder der Stärke des Proliferationsmarkers Ki67. Das Grading aufsteigend von G1 bis G3 und der Proliferationsmarker Ki67 in Prozent von 0 bis 100 geben an, wie aggressiv der Tumor ist. Die Untersuchung zeigte bei dem ausgewählten Kollektiv eine stärkere Infiltration mit Immunzellen, wenn der Tumor ein höheres Grading aufwies oder einen stärkeren Proliferationsmarker Ki67. Statistisch signifikant zeigte sich der Effekt bei CD38-positiven Plasmazellen im Tumor auf die Höhe des Proliferationsmarkers Ki67. Je höher der Proliferationsmarker Ki67, desto stärker die Infiltration mit Immunzellen in dem beobachteten Kollektiv. Somit könnten in der Zukunft bereits etablierte Prognosefaktoren wie das Ki67 einen Rückschluss auf die Infiltration mit Immunzellen geben und die Wirksamkeit einer Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren bewertet werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Yin, L., et al., *Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress*. Breast Cancer Res, 2020. **22**(1): p. 61.
3. Sun, Y.S., et al., *Risk Factors and Preventions of Breast Cancer*. Int J Biol Sci, 2017. **13**(11): p. 1387-1397.
4. Brewer, H.R., et al., *Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure*. Breast Cancer Res Treat, 2017. **165**(1): p. 193-200.
5. Zhang, J. and S.N. Powell, *The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair*. Mol Cancer Res, 2005. **3**(10): p. 531-9.
6. Schmid, P., et al., *Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial*. J Clin Oncol, 2020. **38**(5): p. 423-433.
7. Rosato, V., et al., *Reproductive and hormonal factors, family history, and breast cancer according to the hormonal receptor status*. Eur J Cancer Prev, 2014. **23**(5): p. 412-7.
8. Beral, V. and C. Million Women Study, *Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. Lancet, 2003. **362**(9382): p. 419-27.
9. Hamajima, N., et al., *Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease*. Br J Cancer, 2002. **87**(11): p. 1234-45.
10. Makarem, N., et al., *Dietary fat in breast cancer survival*. Annu Rev Nutr, 2013. **33**: p. 319-48.
11. Gaudet, M.M., et al., *Pooled analysis of active cigarette smoking and invasive breast cancer risk in 14 cohort studies*. Int J Epidemiol, 2017. **46**(3): p. 881-893.
12. Martin, F. and A.C. Chan, *B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 467-96.
13. Lutz, M.B. and G. Schuler, *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* Trends Immunol, 2002. **23**(9): p. 445-9.
14. de Visser, K.E., L.V. Korets, and L.M. Coussens, *De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent*. Cancer Cell, 2005. **7**(5): p. 411-23.
15. Tsou, P., et al., *The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity*. Cancer Res, 2016. **76**(19): p. 5597-5601.
16. Nielsen, J.S., et al., *CD20⁺ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Have an Atypical CD27⁻ Memory Phenotype and Together with CD8⁺ T Cells Promote Favorable Prognosis in Ovarian Cancer*. Clinical Cancer Research, 2012. **18**(12): p. 3281-3292.

17. Aaltomaa, S., et al., *Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer*. Eur J Cancer, 1992. **28A**(4-5): p. 859-64.
18. Schmidt, M., et al., *A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin kappa C as a compatible prognostic marker in human solid tumors*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(9): p. 2695-703.
19. Mahmoud, S.M., et al., *The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **132**(2): p. 545-53.
20. Schmidt, M., et al., *Immunoglobulin kappa chain as an immunologic biomarker of prognosis and chemotherapy response in solid tumors*. Oncoimmunology, 2012. **1**(7): p. 1156-1158.
21. Yeong, J., et al., *High Densities of Tumor-Associated Plasma Cells Predict Improved Prognosis in Triple Negative Breast Cancer*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1209.
22. Chen, D.S., B.A. Irving, and F.S. Hodi, *Molecular pathways: next-generation immunotherapy--inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(24): p. 6580-7.
23. Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll, *Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity*. Curr Opin Immunol, 2012. **24**(2): p. 207-12.
24. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 1-10.
25. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
26. Bauer, J.A., et al., *Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(2): p. 681-90.
27. Juul, N., et al., *Assessment of an RNA interference screen-derived mitotic and ceramide pathway metagene as a predictor of response to neoadjuvant paclitaxel for primary triple-negative breast cancer: a retrospective analysis of five clinical trials*. Lancet Oncol, 2010. **11**(4): p. 358-65.
28. Sun, W.Y., Y.K. Lee, and J.S. Koo, *Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies*. J Transl Med, 2016. **14**(1): p. 173.
29. Schmid, P., et al., *Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer*. N Engl J Med, 2018. **379**(22): p. 2108-2121.
30. Robson, M.E., et al., *OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer*. Ann Oncol, 2019. **30**(4): p. 558-566.
31. 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.*
32. Wouters, M.C.A. and B.H. Nelson, *Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. Clin Cancer Res, 2018. 24(24): p. 6125-6135.*
 33. Adams, S., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. J Clin Oncol, 2014. 32(27): p. 2959-66.*
 34. Loi, S., et al., *Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. J Clin Oncol, 2019. 37(7): p. 559-569.*
 35. Denkert, C., et al., *Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. J Clin Oncol, 2010. 28(1): p. 105-13.*
 36. Jamiyan, T., et al., *Prognostic impact of a tumor-infiltrating lymphocyte subtype in triple negative cancer of the breast. Breast Cancer, 2020. 27(5): p. 880-892.*
 37. Chen, Z., et al., *Immunoglobulin kappa C predicts overall survival in node-negative breast cancer. PLoS One, 2012. 7(9): p. e44741.*
 38. Heimes, A.S., et al., *Prognostic Impact of Immunoglobulin Kappa C in Breast Cancer Patients Treated with Adjuvant Chemotherapy. Breast Care (Basel), 2021. 16(5): p. 444-451.*
 39. Schmidt, M., et al., *Prognostic Impact of Immunoglobulin Kappa C (IGKC) in Early Breast Cancer. Cancers (Basel), 2021. 13(14).*
 40. Kuroda, H., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating B lymphocytes and plasma cells in triple-negative breast cancer. Breast Cancer, 2021. 28(4): p. 904-914.*
 41. Won, K.A. and C. Spruck, *Triplenegative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). Int J Oncol, 2020. 57(6): p. 1245-1261.*
 42. Narang, P., et al., *The neoepitope landscape of breast cancer: implications for immunotherapy. BMC Cancer, 2019. 19(1): p. 200.*
 43. Hashmi, A.A., et al., *Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. BMC Res Notes, 2019. 12(1): p. 605.*
 44. Li, J., et al., *Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. Int J Clin Exp Pathol, 2015. 8(7): p. 8500-5.*
 45. Seow, D.Y.B., et al., *Tertiary lymphoid structures and associated plasma cells play an important role in the biology of triple-negative breast cancers. Breast Cancer Res Treat, 2020. 180(2): p. 369-377.*

7. Danksagung

8. Lebenslauf

