

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Vergleichende Analyse von tumorassoziierten Makrophagen und PD-L1 in  
Primärtumoren und Hirnmetastasen des Mammakarzinoms**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des

Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Yannik Nicola Zimmer

aus Saarlouis

Magdeburg 2025

## **Bibliographische Beschreibung**

Zimmer, Yannik Nicola:

Vergleichende Analyse von tumorassoziierten Makrophagen und PD-L1 in Primärtumoren und Hirnmetastasen des Mammakarzinoms.

- 2025. - 90 Blatt., 10 Abb., 27 Tab.

## **Kurzreferat**

Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) beeinflussen das Tumormikromilieu und können zur Tumorprogression beitragen. Sie polarisieren in M1 (klassisch aktiviert) und M2 (alternativ aktiviert), erkennbar an den Markern CD68 (allgemeiner Makrophagenmarker), CD86 (M1) und CD163 (M2). Diese Studie verglich die Infiltration von TAMs in Primärtumoren von Mammakarzinomen und den korrespondierenden Hirnmetastasen anhand der Marker CD68, CD86, CD163 und PD-L1 in 27 gepaarten Proben sowie 26 weiteren Hirnmetastasen. CD68 wurde in den Hirnmetastasen stärker exprimiert, CD86 und CD163 ähnlich stark. Makrophagen wurden stets häufiger im Tumorstroma festgestellt. Die Überlebenszeitanalyse der Primärtumoren ergab, dass eine hohe Expression von CD163 mit einem kürzeren Intervall bis zur Diagnose der Hirnmetastase korreliert. Eine hohe CD86-Expression in den Hirnmetastasen war hingegen mit einem längeren Gesamtüberleben verbunden. CD68 und CD163 zeigten eine inverse Korrelation mit dem Vorliegen einer Meningeosis carcinomatosa. Weiterhin war CD86 mit einem höheren Grading und CD163 mit hormonrezeptornegativen Tumoren assoziiert. PD-L1 wurde vor allem in HER2/neu-positiven und triple-negativen Primärtumoren sowie Hirnmetastasen exprimiert, ohne Einfluss auf die Überlebenszeit. Es zeigte sich, dass die PD-L1-Expression im Primärtumor nicht zwangsläufig den Status der Hirnmetastase determiniert. Die Ergebnisse dieser Arbeit heben den zum Teil ambivalenten Einfluss von TAMs auf die Tumorprogression in Primärtumoren und in den Hirnmetastasen hervor. Angesichts der diskordanten PD-L1-Expression in Primärtumoren und Hirnmetastasen stellt sich die Frage nach einer standardisierten Analyse der PD-L1-Expression in cerebralen Metastasen.

## **Schlüsselwörter**

TAMs, Tumorassoziierte Makrophagen, Mammakarzinom, Brustkrebs, Hirnmetastasen, Cerebrale Metastasen, CD68, CD86, CD163, PD-L1

## **Wissenschaftliche Leistungen**

### **Publikation**

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Zimmer, Y. N., Hanke, B., Neyazi, B., Rashidi, A., Schaufler, A., Dumitru, C. A., Ignatov, A., Mawrin, C., Sandalcioglu, I. E., Stein, K.-P.: **The landscape and clinical impact of tumor-associated macrophages and PD-L1 in primary breast cancers and their brain metastases.** *Front. Immunol.* 16, (2025).

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Epidemiologische Bedeutung des Mammakarzinoms .....                     | 1         |
| 1.2      | Klassifikation und molekulare Subtypen des Mammakarzinoms .....         | 1         |
| 1.3      | Das metastasierte Mammakarzinom.....                                    | 3         |
| 1.4      | Cerebrale Metastasen.....   | 3         |
| 1.5      | Makrophagen-Polarisation.....   | 4         |
| 1.6      | Tumorassoziierte Makrophagen.....                                       | 5         |
| 1.7      | Tumorassoziierte Makrophagen und PD-L1 .....                            | 7         |
| 1.8      | CD68 .....  | 9         |
| 1.8.1    | Allgemeiner Makrophagenmarker .....                                     | 9         |
| 1.9      | CD86 .....  | 9         |
| 1.9.1    | M1-Makrophagenmarker .....  | 9         |
| 1.10     | CD163 .....   | 10        |
| 1.10.1   | M2-Makrophagenmarker .....  | 10        |
| 1.11     | Zielsetzung der Studie.....   | 11        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden.....</b>                                       | <b>12</b> |
| 2.1      | Studienaufbau .....   | 12        |
| 2.2      | Material.....   | 12        |
| 2.3      | Herstellung der TMA.....  | 12        |
| 2.4      | Immunhistochemische Färbung .....                                       | 13        |
| 2.5      | Quantifizierung der Immunhistochemie.....                               | 15        |
| 2.5.1    | Immunhistochemische Analyse von CD68, CD86 und CD163 .....              | 15        |
| 2.5.2    | Immunhistochemische Analyse von PD-L1 .....                             | 16        |
| 2.5.3    | Immunhistochemische Analyse von Ki-67 .....                             | 18        |
| 2.6      | Quantifizierung des peritumoralen Hirnödems .....                       | 18        |
| 2.7      | Statistische Auswertung.....  | 19        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>   | <b>20</b> |
| 3.1      | Patientinnenkollektiv und deskriptive Statistik .....                   | 20        |
| 3.2      | Makrophageninfiltration.....  | 23        |
| 3.2.1    | Expressionsunterschiede zwischen Tumornest und Tumorstroma.....         | 23        |
| 3.2.2    | Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen ..... | 24        |
| 3.3      | CD68 .....  | 26        |
| 3.3.1    | Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) .....     | 26        |
| 3.3.2    | Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor - Tod) .....         | 27        |
| 3.3.3    | Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase - Tod) .....             | 28        |
| 3.3.4    | Assoziationen mit klinischen Parametern der Primärtumoren .....         | 29        |
| 3.3.5    | Assoziationen mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen .....        | 30        |
| 3.4      | CD86 .....  | 32        |
| 3.4.1    | Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) .....     | 32        |
| 3.4.2    | Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor - Tod) .....         | 33        |
| 3.4.3    | Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase - Tod) .....             | 33        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 3.4.4      | Assoziationen mit klinischen Parametern der Primärtumoren .....  | 35        |
| 3.4.5      | Assoziationen mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen .....   | 37        |
| <b>3.5</b> | <b>CD163 .....</b>   | <b>38</b> |
| 3.5.1      | Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor- Hirnmetastase) .....   | 38        |
| 3.5.2      | Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor - Tod) .....  | 39        |
| 3.5.3      | Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) .....  | 40        |
| 3.5.4      | Assoziationen mit klinischen Parametern der Primärtumoren .....  | 41        |
| 3.5.5      | Assoziationen mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen .....   | 43        |
| <b>3.6</b> | <b>PD-L1 .....</b>   | <b>44</b> |
| 3.6.1      | Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen .....  | 44        |
| 3.6.2      | Regressionsanalyse der PD-L1-Expression .....  | 45        |
| 3.6.3      | Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) .....  | 46        |
| 3.6.4      | Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor - Tod) .....  | 48        |
| 3.6.5      | Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) .....  | 48        |
| 3.6.6      | Assoziationen mit klinischen Parametern der Primärtumoren .....  | 49        |
| 3.6.7      | Assoziationen mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen .....   | 51        |
| <b>4</b>   | <b>Diskussion.....</b>   | <b>52</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>   | <b>52</b> |
| 4.1.1      | Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen .....  | 52        |
| 4.1.2      | Expressionsunterschiede zwischen Tumornest und Tumorstroma.....  | 55        |
| 4.1.3      | Einfluss der Ergebnisse auf die Länge des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) und das Gesamtüberleben ..... | 56        |
| 4.1.4      | Einfluss der Ergebnisse auf die Länge des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) .....                                 | 58        |
| 4.1.5      | Ergebnisse und klinische Parameter der Primärtumoren.....  | 59        |
| 4.1.6      | Ergebnisse und Meningeosis carcinomatosa .....   | 61        |
| 4.1.7      | Ausblick: TAMs als therapeutisches Ziel in der Krebstherapie .....   | 63        |
| <b>4.2</b> | <b>Diskussion der Methodik .....</b>   | <b>64</b> |
| 4.2.1      | Patientinnenkollektiv .....  | 64        |
| 4.2.2      | Tissue Microarray .....  | 65        |
| 4.2.3      | Immunhistochemie.....  | 65        |
| 4.2.4      | Immunreaktiver Score .....   | 66        |
| 4.2.5      | PD-L1 -Scoring .....   | 66        |
| 4.2.6      | Statistische Auswertung .....  | 67        |
| <b>5</b>   | <b>Zusammenfassung.....</b>  | <b>68</b> |
| <b>6</b>   | <b>Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>69</b> |
| <b>7</b>   | <b>Danksagung .....</b>  | <b>78</b> |
| <b>8</b>   | <b>Anhang.....</b>   | <b>79</b> |
| <b>8.1</b> | <b>Materialien .....</b>   | <b>79</b> |
| <b>9</b>   | <b>Ehrenerklärung .....</b>  | <b>81</b> |
| <b>10</b>  | <b>Darstellung des Bildungsweges .....</b>   | <b>82</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|               |  |
|---------------|--|
| $\mu$ l       | Mikroliter   |
| $\mu$ m       | Mikrometer   |
| AJCC          | American Joint Commission on Cancer  |
| BET           | Brusterhaltende Therapie   |
| CCL           | C-C Motif chemokine Ligand   |
| CD            | Cluster of Differentiation   |
| CO            | Kohlenmonoxid  |
| COX-2         | Cyclooxygenase-2   |
| CPS           | Combined Positive Score  |
| CTLA-4        | Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4                                      |
| CYT           | Zytologischer Aktivitätswert   |
| DA            | Dalton   |
| DAB           | 3,3'-Diaminobenzidin   |
| ED            | Erstdiagnose   |
| EGF           | Epidermal Growth Factor  |
| EMAP-II       | Endothelial monocyte-activating polypeptide-II                                   |
| ER            | Estrogen receptor (Östrogenrezeptor)   |
| ERK           | Extracellular-signal regulated kinase  |
| F(ab)2-Teil   | Fragment Antigen Binding   |
| F(c)-Teil     | Fragment Crystalline   |
| FLAIR         | Fluid attenuated inversion recovery  |
| HbSR          | Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor  |
| HER2/neu      | Human epidermal growth factor receptor 2   |
| HIER          | Heat induced epitope retrieval   |
| HIF           | Hypoxie-induzierter Faktor   |
| HM            | Hirnmetastase  |
| HR            | Hormonrezeptor   |
| HRP           | Horseradish Peroxidase   |
| IC            | Immune Cell Score  |
| ICD           | International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems |
| IDH           | Isocitrat-Dehydrogenase  |
| IFN- $\gamma$ | Interferon-gamma   |
| IHC           | Immunhistochemie   |
| IL            | Interleukin  |

|                  |   |
|------------------|---|
| iNOS             | Induzierbare NO-Synthase                                |
| IRS              | Immunreaktiver Score                                    |
| Itga4            | Integrin Subunit Alpha 4                                |
| LPS              | Lipopolsaccharide                                       |
| M-CSF            | Macrophage colony-stimulating factor                    |
| MCP-1            | Monocyte chemoattractant protein-1                      |
| MHC              | Major Histocompatibility Complex                        |
| MMP9             | Matrix-Metalloprotease 9                                |
| mPGES1           | Microsomal prostaglandin E synthase-1                   |
| MRT              | Magnetresonanztomographie                               |
| nCTX             | Neoadjuvante Chemotherapie                              |
| NSCLC            | Non-small-cell lung cancer                              |
| PD-1             | Programmed Cell Death Protein 1                         |
| PD-L1            | Programmed Death-Ligand-1                               |
| PGE2             | Prostaglandin E <sub>2</sub>                            |
| PR               | Progesteronrezeptor                                     |
| ROS              | Reaktive Sauerstoffspezies                              |
| RTX              | Radiotherapie   |
| STAT3            | Signal transducer and activator of transcription 3      |
| TAMs             | Tumorassoziierte Makrophagen                            |
| TBS              | Tris-buffered saline                                    |
| TGF-β            | Transforming Growth Factor β                            |
| TLR              | Toll-like receptor                                      |
| TMA              | Tissue microarray                                       |
| TN               | Tumornest   |
| TNBC             | Triple negative breast cancer                           |
| TNF-α            | Tumornekrosefaktor-alpha                                |
| TPS              | Tumor Proportion Score                                  |
| T <sub>reg</sub> | Regulatorische T-Zellen                                 |
| TS               | Tumorstroma   |
| UICC             | Union for international cancer control                  |
| VEGF             | Vascular Endothelial Growth Factor                      |
| VEGFR-2          | Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2           |
| VISTA            | V-domain immunoglobulin suppressor of T-cell activation |
| WHO              | World Health Organization                               |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1: Funktion von Tumorassoziierten Makrophagen .....  | 8  |
| Abb. 2: Färbeverhalten von CD68, CD163, CD86 in den Gewebebeschnitten.....                                  | 16 |
| Abb. 3: Scoring und Färbeverhalten von PD-L1.....   | 17 |
| Abb. 4: Quantifizierung des peritumoralen Ödems .....   | 18 |
| Abb. 1: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD68 .....                        | 26 |
| Abb. 2: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für CD86 .....                                | 34 |
| Abb. 3: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD163 .....                       | 38 |
| Abb. 8: Flussdiagramm der Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen für PD-L1 ..... | 44 |
| Abb. 4: Korrelation der PD-L1-Expression zwischen Primärtumor und Hirnmetastase .....                       | 46 |
| Abb 5: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für PD-L1 .....                        | 47 |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tab. 1: UICC/AJCC-Klassifikation und TNM-Staging des Mammakarzinoms.....  | 2  |
| Tab. 2: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms.....   | 3  |
| Tab. 3: Charakteristika der Primärtumoren.....  | 21 |
| Tab. 4: Charakteristika der Hirnmetastasen .....  | 22 |
| Tab. 5: Ergebnisse der Expressionsunterschiede zwischen TN und TS für CD68, CD86 und CD163 .....                        | 23 |
| Tab. 6: Ergebnisse der Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen für CD68, CD86 und CD163 ..... | 25 |
| Tab. 7: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD68 .....                                    | 27 |
| Tab. 1: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor – Tod) für CD68 .....  | 28 |
| Tab. 9: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für CD68 .....  | 29 |
| Tab. 10: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Primärtumoren für CD68.....                                  | 30 |
| Tab. 11: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen für CD68 .....                                | 31 |
| Tab. 12: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD86 .....                                   | 32 |
| Tab. 13: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor – Tod) für CD86 .....                                       | 33 |
| Tab. 14: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für CD86 .....   | 35 |
| Tab. 15: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Primärtumoren für CD86.....                                  | 36 |
| Tab. 16: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen für CD86 .....                                | 37 |
| Tab. 17: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD163 .....                                  | 38 |
| Tab. 18: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor – Tod) für CD163 .....                                      | 40 |
| Tab. 19: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für CD163 .....  | 41 |
| Tab. 20: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Primärtumoren für CD163.....                                 | 42 |
| Tab. 21: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen für CD163 .....                               | 43 |
| Tab. 22: Ergebnisse der PD-L1-Expression in Primärtumoren und Hirnmetastasen.....                                       | 45 |
| Tab. 23: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor – Hirnmetastase) für PD-L1 .....                                  | 47 |
| Tab. 24: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor – Tod) für PD-L1 .....                                      | 48 |
| Tab. 25: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für PD-L1 .....  | 49 |
| Tab. 26: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Primärtumoren für PD-L1 .....                                | 50 |
| Tab. 27: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen für PD-L1.....                                | 51 |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1: Funktion von Tumorassoziierten Makrophagen .....  | 8  |
| Abb. 2: Färbeverhalten von CD68, CD163, CD86 in den Gewebebeschnitten.....                                  | 16 |
| Abb. 3: Scoring und Färbeverhalten von PD-L1.....   | 17 |
| Abb. 4: Quantifizierung des peritumoralen Ödems .....   | 18 |
| Abb. 6: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD68 .....                        | 26 |
| Abb. 7: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für CD86 .....                                | 34 |
| Abb. 8: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD163 .....                       | 38 |
| Abb. 8: Flussdiagramm der Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen für PD-L1 ..... | 44 |
| Abb. 9: Korrelation der PD-L1-Expression zwischen Primärtumor und Hirnmetastase .....                       | 46 |
| Abb 10: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für PD-L1 .....                       | 47 |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tab. 1: UICC/AJCC-Klassifikation und TNM-Staging des Mammakarzinoms.....  | 2  |
| Tab. 2: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms.....   | 3  |
| Tab. 3: Charakteristika der Primärtumoren.....  | 21 |
| Tab. 4: Charakteristika der Hirnmetastasen .....  | 22 |
| Tab. 5: Ergebnisse der Expressionsunterschiede zwischen TN und TS für CD68, CD86 und CD163 .....                        | 23 |
| Tab. 6: Ergebnisse der Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen für CD68, CD86 und CD163 ..... | 25 |
| Tab. 7: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD68 .....                                    | 27 |
| Tab. 2: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor – Tod) für CD68 .....  | 28 |
| Tab. 9: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für CD68 .....  | 29 |
| Tab. 10: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Primärtumoren für CD68.....                                  | 30 |
| Tab. 11: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen für CD68 .....                                | 31 |
| Tab. 12: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD86 .....                                   | 32 |
| Tab. 13: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor – Tod) für CD86.....  | 33 |
| Tab. 14: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für CD86 .....   | 35 |
| Tab. 15: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Primärtumoren für CD86.....                                  | 36 |
| Tab. 16: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen für CD86.....                                 | 37 |
| Tab. 17: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD163 .....                                  | 38 |
| Tab. 18: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor – Tod) für CD163 .....                                      | 40 |
| Tab. 19: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für CD163 .....  | 41 |
| Tab. 20: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Primärtumoren für CD163.....                                 | 42 |
| Tab. 21: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen für CD163 .....                               | 43 |
| Tab. 22: Ergebnisse der PD-L1-Expression in Primärtumoren und Hirnmetastasen.....                                       | 45 |
| Tab. 23: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor – Hirnmetastase) für PD-L1 .....                                  | 47 |
| Tab. 24: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor – Tod) für PD-L1 .....                                      | 48 |
| Tab. 25: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für PD-L1 .....  | 49 |
| Tab. 26: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Primärtumoren für PD-L1 .....                                | 50 |
| Tab. 27: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen für PD-L1.....                                | 51 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologische Bedeutung des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist mit einer Inzidenz von 2,26 Millionen im Jahr 2020 erstmals das am häufigsten diagnostizierte Malignom weltweit<sup>1,2</sup>. Mit 684.996 Todesfällen ist das Mammakarzinom global betrachtet die häufigste Krebstodesursache der weiblichen Bevölkerung<sup>2</sup>. Gemäß einer gemeinsamen Publikation des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. wurde im Jahr 2018 in der Bundesrepublik Deutschland bei 69.900 Frauen sowie 720 Männern eine Brustkrebsdiagnose gestellt<sup>3</sup>. Basierend auf den aktuellen Inzidenzraten erkrankt somit statistisch gesehen etwa eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs<sup>4</sup>. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt 64 Jahre<sup>3</sup>.

Seit Einführung des Mammographie-Screenings im Jahr 2005 wurde zunächst ein erwarteter Anstieg an Neudiagnosen verzeichnet, gefolgt von einem allmählichen Rückgang<sup>3</sup>. Unabhängig von der Altersgruppe konnte in randomisierten kontrollierten Studien bei regelmäßiger Teilnahme über zehn Jahre eine Senkung der Mortalität um 20 % nachgewiesen werden<sup>5,6</sup>. Darüber hinaus zeigen die brustkrebsassoziierten Sterberaten seit Ende der 1990er Jahre einen kontinuierlichen Rückgang, was auf verbesserte diagnostische Verfahren und Therapieoptionen zurückzuführen ist.<sup>3,7</sup> Die relative 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland betrug 2017 zwischen 86-89 % und wird insbesondere durch das Auftreten von Rezidiven und Metastasen begrenzt<sup>3,8</sup>.

## 1.2 Klassifikation und molekulare Subtypen des Mammakarzinoms

Als maligne epitheliale Tumore des Brustdrüsengewebes sind Mammakarzinome durch eine hohe Heterogenität gekennzeichnet. Ein entscheidender Aspekt dieser Vielfalt ist die Einteilung in folgende molekulare Subtypen, basierend auf der Expression verschiedener Rezeptoren: Luminal A, Luminal B, HER2/neu-positiv und Triple-negativ<sup>6,9</sup>. Diese Subtypen beeinflussen die biologischen Eigenschaften der Tumore, deren Verlauf, Prognose sowie das Ansprechen auf verschiedene Therapieformen<sup>6</sup>. Tumore mit positiven Hormonrezeptoren (HR)

exprimieren Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren (ER/PR) und haben in der Regel die beste Prognose unter den Brustkrebstypen <sup>10</sup>. Eine Überexpression des HER2/neu-Rezeptors findet sich in etwa 20 % der Mammakarzinome <sup>11</sup>. Diese Tumore neigen zu einem aggressiveren Verlauf und sind mit einer schlechteren Prognose verbunden. Allerdings konnten die Überlebenschancen von Frauen mit HER2/neu-positivem Brustkrebs durch die Einführung zielgerichteter Therapien wie Trastuzumab in den letzten Jahren erheblich verbessert werden <sup>12</sup>. Tumore, die weder Hormonrezeptoren noch HER2/neu exprimieren, werden als „triple-negativ“ bezeichnet. Diese Tumore haben insgesamt die schlechteste Prognose, zeigen eine höhere Rezidivrate und gehen mit weniger therapeutischen Optionen einher <sup>13,14</sup>.

Die Klassifikation des Brustkrebses erfolgt nach dem TNM-System, das die Tumogröße (T), den Lymphknotenstatus (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) berücksichtigt. Diese Parameter sind in der aktuellen UICC/AJCC-Klassifikation zusammengefasst und dienen der Kategorisierung des Tumors in verschiedene Schweregrade. Die gängige Klassifikation sowie die Einteilung der molekularen Subtypen sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt <sup>6</sup>:

**Tab. 3: UICC/AJCC-Klassifikation und TNM-Staging des Mammakarzinoms**

| <b>UICC/AJCC-Stadium</b> |      | <b>TNM-Klassifikation</b> |
|--------------------------|------|---------------------------|
| <b>0</b>                 |      | Tis, N0, M0               |
| <b>I</b>                 | IA   | T1, N0, M0                |
|                          | IB   | T0–T1, pN1mi, M0          |
| <b>II</b>                | IIA  | T0–T1, N1, M0             |
|                          |      | T2, N0, M0                |
| <b>III</b>               | IIB  | T2, N1, M0                |
|                          |      | T3, N0, M0                |
|                          | IIIA | T0–T2, N2, M0             |
| <b>IV</b>                |      | T3, N1–N2, M0             |
|                          | IIIB | T4, N0–N2, M0             |
|                          | IIIC | Jedes T, N3, M0           |
| <b>IV</b>                |      | Jedes T, jedes N, M1      |

**Tab. 4: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms**

| Subtyp                | Biomarker               |                         |          |                   |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|----------|-------------------|
|                       | ER                      | PR                      | HER2/neu | Ki-67             |
| <b>Luminal A</b>      | ER- und/oder PR-positiv |                         | Negativ  | Niedrig           |
|                       | HER2/neu-               | ER- und/oder PR-positiv | Negativ  | Hoch              |
| <b>Luminal B</b>      | HER2/neu-               | ER- und/oder PR-positiv | Positiv  | Hoch oder Niedrig |
|                       | HER2/neu+               | Negativ                 | Negativ  | -                 |
| <b>HER2/neu+</b>      |                         |                         |          |                   |
| <b>Triple-negativ</b> | Negativ                 | Negativ                 | Negativ  | -                 |

### 1.3 Das metastasierte Mammakarzinom

Etwa 20-30 % der Frauen mit früh diagnostiziertem Brustkrebs entwickeln im Verlauf Metastasen, während bei 6-10 % der Erkrankten bereits initial die Diagnose eines Stadium IV gestellt wird<sup>15</sup>. Der Zeitpunkt des Rezidivs variiert abhängig vom molekularen Subtyp: Triple-negative Tumore neigen beispielsweise innerhalb der ersten zwei Jahre zu einem Rückfall, während luminales Karzinome bis zu 25 Jahre später rezidivieren können<sup>16</sup>. Nach stattgefunder Fernmetastasierung sinkt die relative 5-Jahres-Überlebensrate rapide auf 27 % mit einer medianen Überlebenszeit von zwei bis drei Jahren. Hinsichtlich der Lokalisation sind ossäre Metastasen die häufigste Form, gefolgt von pulmonalen und hepatischen Absiedlungen<sup>15</sup>.

### 1.4 Cerebrale Metastasen

Hirnmetastasen treten vorwiegend im Rahmen fortgeschrittener Krebserkrankungen auf und stellen die häufigste Form intracerebraler Tumoren dar<sup>17</sup>. Die Symptome können die Lebensqualität erheblich beeinträchtigen und umfassen insbesondere Kopfschmerzen, fokal neurologische Defizite, Krampfanfälle sowie neuropsychologische Störungen<sup>18</sup>. Studien zufolge entwickeln zwischen 10-30 % der Krebspatienten im Verlauf eine cerebrale Manifestation<sup>19,20</sup>. Zu diesem Zeitpunkt bestehen bei 60-80 % der Betroffenen bereits synchrone Metastasen. Während singuläre Hirnmetastasen bevorzugt von Brust-, Darm- und

Nierenkrebs ausgehen, neigen das maligne Melanom sowie Lungenkarzinome eher zu multiplen Läsionen<sup>21,22</sup>.

Ursächlich für 67-80 % der Hirnmetastasen sind insbesondere Lungenkarzinome, Mammakarzinome sowie das maligne Melanom. Weitere Tumorentitäten mit einer Tendenz zur cerebralen Metastasierung sind vor allem kolorektale Karzinome sowie Nierenzellkarzinome<sup>21</sup>. Während der größte Anteil an Hirnmetastasen von Lungenkarzinomen stammt, weist das maligne Melanom offenbar die höchste cerebrale Metastasierungstendenz auf<sup>20,22</sup>.

Mammakarzinome bilden über alle Tumorstadien gemittelt in etwa 5,1 % der Fälle cerebrale Metastasen. Dennoch ist Brustkrebs, aufgrund der hohen Inzidenz, nach Lungenkarzinomen das am zweithäufigsten ursächliche Malignom<sup>20,21</sup>. Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung cerebraler Metastasen bei Brustkrebs zählen insbesondere HER2/neu-positive und triple-negative Subtypen sowie das Vorliegen weiterer extrakranieller Metastasen<sup>20,23,24</sup>. In der Metaanalyse von Kuksis et al. wurde die gepoolte Inzidenz von Hirnmetastasen bei Frauen mit metastasiertem Brustkrebs folgendermaßen geschätzt: 31 % (HER2/neu+, HR-), 32 % (Triple-negativ) und 15 % (HR+, HER2/neu-)<sup>24</sup>.

Die Prognose der Betroffenen ist schlecht und das Gesamtüberleben unterscheidet sich in Abhängigkeit von der betrachteten Studie. Neben einem erhöhten Risiko für das Auftreten von cerebralen Metastasen, geht eine HER2/neu-Überexpression jedoch mit einer im Vergleich besseren Prognose einher. In einer großen multizentrischen Studie aus 2019 von Darlix et al. betrug das mediane Gesamtüberleben nach Hirnmetastasierung 7,9 Monate. Betrachtet man die Subgruppen, zeigte sich folgendes medianes Überleben: 18,9 Monate (HER2/neu+, HR+), 13,1 Monate (HER2/neu+, HR-), 4,4 Monate (Triple-negativ) und 7,1 Monate (HER2/neu-, HR+)<sup>25</sup>.

## 1.5 Makrophagen-Polarisation

Makrophagen zeichnen sich durch eine hohe Plastizität aus und können abhängig von lokalen Signalen zu verschiedenen funktionellen Subtypen polarisiert werden<sup>26</sup>. Aus einem großen Spektrum an Differenzierungszuständen lassen sie sich anhand ihres Arginin-Metabolismus in

zwei Hauptformen unterscheiden: Klassisch aktivierte M1-Makrophagen und alternativ aktivierte M2-Makrophagen<sup>27-29</sup>

Die klassische Aktivierung erfolgt in der Gegenwart von antimikrobiellen Lipopolysacchariden, TNF- $\alpha$  sowie durch Th1-Zellen via IFN- $\gamma$ . Dies geht mit einer erhöhten Expression von Antigenen und proinflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einher<sup>29,30</sup>. Bezuglich des Arginin-Stoffwechsels zeichnen sich M1-Makrophagen durch eine erhöhte Aktivität der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) aus. Dadurch werden antimikrobielle und zytotoxische Effekte vermittelt<sup>27,29,31</sup>.

Alternativ aktivierte Makrophagen werden durch Th2-Zellen mittels IL-4 und IL-13 induziert. Darüber hinaus kann beispielsweise auch eine Aktivierung durch Glukokortikoide erfolgen<sup>32</sup>. Dieser Phänotyp zeichnet sich durch die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und den TGF- $\beta$  aus<sup>26,33</sup>. Der Arginin-Metabolismus ist durch eine erhöhte Expression der Arginase gekennzeichnet, welche die Umsetzung von Arginin zu Ornithin katalysiert. Ornithin kann hingegen entweder zu Polyaminen (Spermidin, Putrescin, Spermin) oder Prolin umgewandelt werden. Polyamine spielen eine entscheidende Rolle bei der Regeneration und Proliferation von Gewebe, während Prolin essenziell für die Kollagensynthese ist<sup>27,29</sup>. Insgesamt sind M2-Makrophagen an Prozessen des Gewebeumbaus, der Angiogenese, der Parasitenabwehr sowie an der antiinflammatorischen Immunmodulation beteiligt<sup>28,29,34</sup>.

## 1.6 Tumorassoziierte Makrophagen

Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) sind eine spezifische Population von Makrophagen und beeinflussen als infiltrierende Immunzellen das Tumormikromilieu maßgeblich. Die Mikroumgebung des Tumors ist ein hochkomplexes und dynamisches Zusammenspiel zwischen Tumorstroma, extrazellulärer Matrix und Tumorzellen. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Progression, Metastasierung sowie Modulation der Immunantwort<sup>35</sup>. TAMs werden mithilfe von Chemokinen wie beispielsweise dem Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor (M-CSF) und dem Monozyten-chemotaktischen Protein-1 (MCP-1/CCL2) in die Mikroumgebung des Tumors rekrutiert<sup>36-39</sup>. Sowohl M1- als auch M2-Makrophagen sind als TAMs in Tumoren präsent und können bis zu 50 % der Tumormasse ausmachen<sup>35</sup>.

Durch das hypoxische Tumormikromilieu und die dort vorherrschenden Zytokine erfolgt dann zumeist die alternative Aktivierung zu M2-Makrophagen<sup>40,41,42</sup>. Der immunsuppressive und protumorale M2-Typ trägt auf verschiedene Art und Weise zur Tumorprogression bei:

Zu Beginn einer Tumorerkrankung können TAMs mithilfe von Matrixmetalloproteasen eine Kollagendegradierung der Basalmembran bewirken. Durch die Verletzung der Integrität der Basalmembran wird die Invasion und Metastasierung gefördert<sup>43,44</sup>. Eine Studie von Condeelis und Segal aus dem Jahr 2003 konnte mittels Multiphotonenmikroskopie eine Wechselwirkung zwischen Tumorzellen, Makrophagen und Blutgefäßen nachweisen. Dies stützt den Einfluss von TAMs bei der Invasion<sup>45</sup>.

Eine weitere Schlüsselfunktion scheinen TAMs beim sogenannten „Angiogenic Switch“ zu spielen<sup>46</sup>. Darunter versteht man den Übergang eines Tumors von einem Stadium ohne oder mit eingeschränkter Blutversorgung zu einem Zustand, in dem der Tumor eigenständig die Bildung neuer Blutgefäße anregt<sup>47</sup>. Eine besondere Rolle hierbei spielt die Induktion von VEGF und MMP-9 durch TAMs. Mittels MMP-9 tragen TAMs zur Freisetzung von VEGF aus seiner an die extrazelluläre Matrix gebundenen Form bei<sup>48,49</sup>. Die chemokine Wirkung von VEGF auf Makrophagen resultiert in einem positiven Feedback-Mechanismus, der eine schnelle Vaskularisation des Tumors gewährleistet<sup>50</sup>. Abgesehen von der Angiogenese kann VEGF zur Bildung von lymphatischen Gefäßen im peritumoralen Gewebe beitragen und dadurch eine lymphogene Metastasierung fördern<sup>51</sup>. Ferner können TAMs über den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) die chemotaktische Migration von Tumorzellen zu Blutgefäßen fördern<sup>52,53</sup>.

In einer Studie mit dem Titel „Macrophages, estrogen and the microenvironment of breast cancer“ wiesen Mor et al. eine Östrogenproduktion durch TAMs in Mammakarzinomen nach<sup>54</sup>. Östrogen wird aus Androgenen mit Hilfe des Enzyms Aromatase synthetisiert und ist ein wichtiger proliferationsfördernder Stimulus sowie Risikofaktor für Brustkrebs<sup>54,55</sup>.

Insgesamt produzieren TAMs vielfältige immunmodulatorische Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF-β, wodurch eine antiinflammatorische Immunantwort induziert und dadurch zytotoxische Reaktionen gehemmt werden<sup>26,56</sup>.

## 1.7 Tumorassoziierte Makrophagen und PD-L1

Das Zusammenspiel zwischen PD-1 (Programmed Cell Death Protein 1) und PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) dient der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase durch Hemmung einer überschießenden Immunantwort<sup>57</sup>. Im Tumormikromilieu kann PD-L1 von Tumorzellen sowie TAMs exprimiert werden und durch Interaktion mit PD-1 auf T-Zellen zu deren Hemmung führen<sup>58,59</sup>. Durch den Einsatz sogenannter Immuncheckpoint-Inhibitoren konnten bei einer Vielzahl von Tumorentitäten bemerkenswerte Ergebnisse erzielt werden. Diese Antikörper blockieren die Wechselwirkung zwischen PD-1 und PD-L1, was zu einer gesteigerten T-Zell-Aktivität führt<sup>58</sup>. Basierend auf den Ergebnissen der KEYNOTE-522-Studie wurde der PD-1-Antikörper Pembrolizumab im Jahr 2022, zur Behandlung des frühen oder lokal fortgeschrittenen triple-negativen Mammakarzinoms von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) zugelassen. Die Indikation erstreckt sich auf die neoadjuvante Anwendung in Verbindung mit einer Chemotherapie, sowie postoperativ als adjuvante Monotherapie<sup>60,61</sup>.

Leider sprechen einige Patientinnen nicht auf die Immuntherapie an oder erleiden nach erfolgreicher Remission ein Tumorrezipidiv<sup>62,63</sup>. Im klinischen Alltag sind Arzneimittelresistenzen gegen Checkpoint-Inhibitoren ein entscheidender Faktor, der die Wirksamkeit limitiert. Ursächlich dafür sind insbesondere eine geringere Infiltration von T-Zellen, deren Dysfunktion und Erschöpfung sowie Veränderungen in der Expression von PD-L1 durch den Tumor<sup>64</sup>. Ferner konnte eine Korrelation zwischen der Infiltration von TAMs und Resistenz gegenüber PD-1/PD-L1-Antikörpern nachgewiesen werden<sup>65</sup>. TAMs verfügen über verschiedene Mechanismen, welche die Resistenzbildung begünstigen:

Wie zuvor erwähnt sind M2-Makrophagen in der Lage TGF-β zu sezernieren<sup>26</sup>. Dies führt zur Rekrutierung regulatorischer T-Zellen und hemmt durch die verringerte Expression von IFN-γ und Granzym B die Aktivität von T-Lymphozyten<sup>66,67</sup>. Darüber hinaus können TAMs über den COX-2/mPGES1/PGE2-Signalweg die Expression von PD-L1 auf tumorinfiltrierenden myeloischen Zellen erhöhen und somit die Immunantwort von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen abschwächen<sup>68</sup>.

Das Transmembranprotein VISTA (V-domain immunoglobulin suppressor of T-cell activation) ist ebenfalls ein negativer Regulator der Immunantwort und kann die T-Zell-Aktivierung unterdrücken. Außerdem kann VISTA die Bildung der Zytokine IL-10, TNF-α und IFN-γ

durch T-Zellen hemmen<sup>69</sup>. In Mammakarzinomen konnte beispielsweise eine Expression von VISTA durch TAMs in der Tumormikroumgebung nachgewiesen werden<sup>70</sup>.

Eine entscheidende Rolle spielt auch die Expression von PD-L1 auf TAMs<sup>71</sup>. In verschiedenen Tumorentitäten wie beispielsweise dem hepatozellulären Karzinom oder dem Urothelkarzinom konnte eine höhere Expression von PD-L1 auf Immunzellen als auf Tumorzellen selbst nachgewiesen werden<sup>72,73</sup>. Mithilfe eines myeloid-spezifischen PD-L1-Knockout-Mausmodells konnten Petty et al. im Jahr 2021 eindeutig nachweisen, dass die Expression von PD-L1 auf TAMs von entscheidender Bedeutung für die Unterdrückung von intratumoralen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ist. Eine Schlüsselrolle bei der Regulation der PD-L1-Expression auf TAMs spielt hierbei der in Tumoren vorkommende Sonic-Hedgehog-Signalweg. Durch die Hemmung der zytotoxischen T-Zellen können TAMs somit zur Tumorprogression beitragen<sup>71</sup>. Darüber hinaus konnte in der Studie von Gómez et al. nachgewiesen werden, dass TAMs die Expression von PD-L1 im Mammakarzinom vermitteln können<sup>74</sup>. In Abbildung 1 sind die gängigsten Funktionen von TAMs visualisiert:

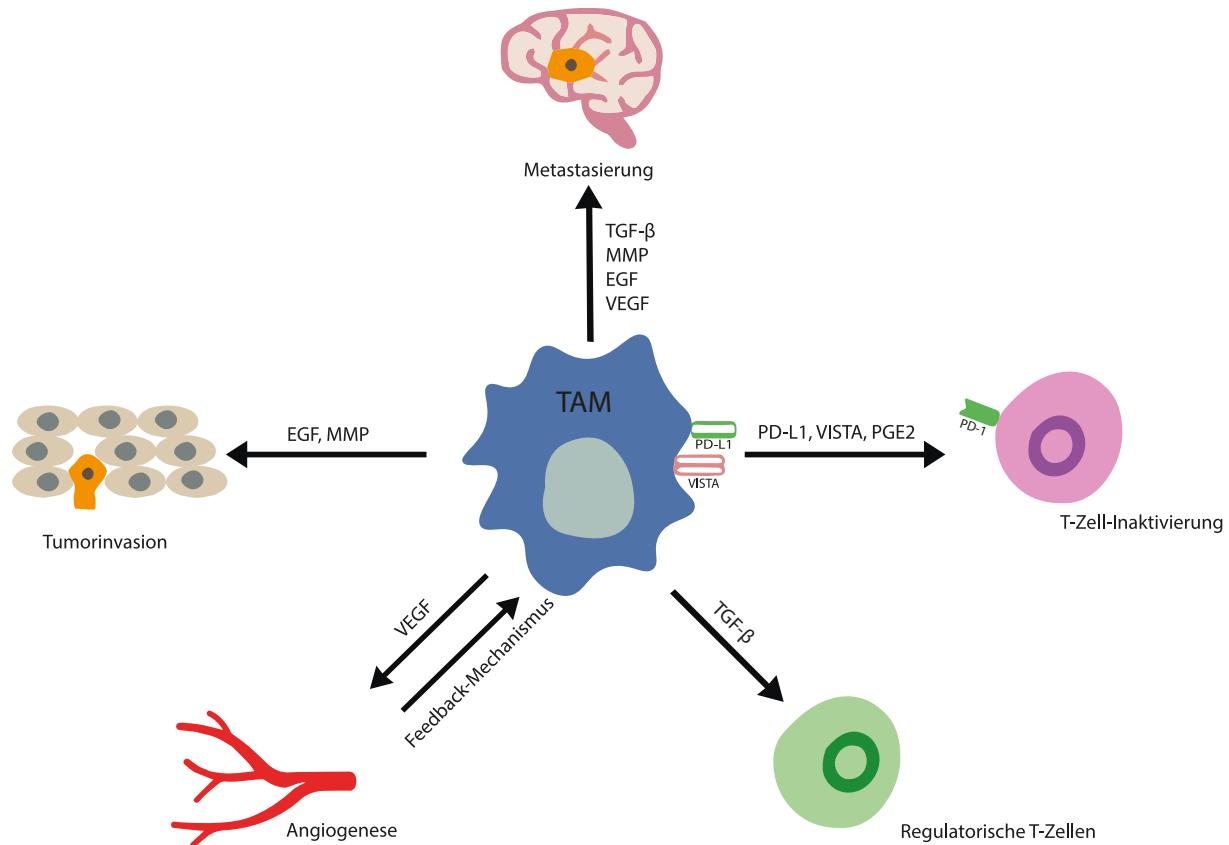


Abb. 11: Funktion von tumorassoziierten Makrophagen.

## 1.8 CD68

### 1.8.1 Allgemeiner Makrophagenmarker

Das Oberflächenantigen CD68 ist ein lysosomal assoziiertes Glykoprotein mit einem Gewicht von 110 kDa<sup>75,76</sup>. CD68 ist stark exprimiert auf Zellen des mononuklear-phagozytären Systems, wozu mobile und ortsständige Makrophagen zählen. Zu den ortsständigen Makrophagen zählen beispielsweise Mikroglia, Kupffer-Zellen, Histiozyten und Osteoklasten<sup>77-79</sup>. Weiterhin konnte eine vergleichbare Expression in Endothelzellen und Fibroblasten nachgewiesen werden. Daher spielt bei der Interpretation der Immunhistochemie die Zellmorphologie eine wichtige Rolle<sup>80-82</sup>. Eine niedrigere Expression findet sich hingegen in einer Vielzahl von Zellen, darunter neutrophile Granulozyten, aktivierte B- und T-Zellen sowie NK-Zellen<sup>80,83</sup>. Das Antigen CD68 dient in der Immunhistochemie als Standardmarker für die Detektion von Makrophagen beispielsweise in entzündetem Gewebe oder in Tumoren. CD68 dient in gleichem Maße der Färbung von M1- und M2-Makrophagen<sup>84-86</sup>. Die Funktion von CD68 ist noch nicht hinreichend geklärt. Allerdings nimmt CD68 Einfluss auf physiologische und pathologische Prozesse. Dazu zählen unter anderem die Entstehung von Arteriosklerose, Entzündungsreaktionen sowie die Tumorprogression<sup>87-90</sup>.

## 1.9 CD86

### 1.9.1 M1-Makrophagenmarker

Das Oberflächenantigen CD86, auch bekannt als B7-2, wird auf antigenpräsentierenden Zellen wie beispielsweise B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Seine Hauptfunktion besteht in der Kostimulation von T-Zellen und in der Regulierung der Immunantwort<sup>91,92</sup>. Daher werden M1-Makrophagen antitumorale Eigenschaften zugesprochen<sup>93</sup>. In der Literatur wird CD86 als Marker für klassisch aktivierte M1-Makrophagen beschrieben<sup>94</sup>. CD86 kann mit den auf T-Zellen vorkommenden Proteinen CD28 und CTLA-4 interagieren und dadurch ambivalente Immunreaktionen bewirken<sup>92</sup>:

Nachdem eine antigenpräsentierende Zelle ein fremdes Antigen aufgenommen hat, präsentiert sie es via MHC-Komplex. Dabei kommt es zur Expression von CD86/CD80 auf ihrer

Zelloberfläche. Eine naive T-Zelle erkennt den MHC-Antigen-Komplex und bindet diesen mittels des passenden T-Zell-Rezeptors. Anschließend bindet das auf T-Zellen vorkommende Rezeptorprotein CD28 an CD86/CD80. Diese Interaktion führt zur vollständigen Aktivierung und Proliferation der T-Zelle <sup>92,95</sup>.

CTLA-4 ist ein weiteres Oberflächenprotein, welches auf T-Zellen exprimiert wird. Es hat eine gegenteilige Wirkung im Vergleich zu CD28 und bindet CD86 und CD80 mit höherer Affinität. Die Bindung von CTLA-4 an CD86/CD80 verringert die T-Zell-Aktivierung <sup>92,96</sup>. Dadurch wird eine überschüssige Immunantwort begrenzt und Autoimmunreaktionen verhindert <sup>97</sup>. Eine Blockade von CTLA-4 führt dagegen zu einer gesteigerten Immunantwort und wird in der Therapie von Malignomen genutzt <sup>98</sup>.

## 1.10 CD163

### 1.10.1 M2-Makrophagenmarker

CD163 ist ein Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor (HbSR) mit einem Molekulargewicht von 130 kDa und wird ausschließlich auf Zellen monozytärer Abstammung exprimiert <sup>99–102</sup>. Im Jahr 2001 wurde durch die Arbeit von Kristiansen et al. der Einfluss von CD163 auf die Hämostase bekannt. Bei intravasaler Hämolyse entsteht freies Hämoglobin, welches mittels nicht kovalenter Bindung an das Akut-Phase-Protein Haptoglobin bindet. Aufgrund der oxidativen und toxischen Eigenschaften des eisenhaltigen Hämoglobins ist ein effizienter Abbau essenziell. CD163 vermittelt die calciumabhängige Endozytose von Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexen in Makrophagen und die Konvertierung von Häm in Bilirubin, Eisen und Kohlenmonoxid <sup>101,103,104</sup>. Darüber hinaus führen Glukokortikoide, IL-10 und IL-6 insbesondere zur Aktivierung von M2-Makrophagen, die durch eine erhöhte Expression von CD163 gekennzeichnet sind. Diese vermitteln über IL-10 sowie die antioxidativen Abbauprodukte des Hämoglobins eine entzündungshemmende Regulierungsfunktion und sind an der Angiogenese und Wundheilung beteiligt <sup>103,105–107</sup>. Zusätzlich kann die Interaktion zwischen CD163 und verschiedenen Bakterien jedoch mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine einhergehen <sup>108</sup>.

## 1.11 Zielsetzung der Studie

Ziel dieser Arbeit war es, die Infiltration tumorassozierter Makrophagen sowie die damit assoziierte PD-L1-Expression in Primärtumoren des Mammakarzinoms und den korrespondierenden Hirnmetastasen vergleichend zu analysieren:

1. Gibt es Expressionsunterschiede zwischen den Primärtumoren und Hirnmetastasen?
2. Gibt es Expressionsunterschiede zwischen Tumornest und Tumorstroma?
3. Unterscheiden sich die Subtypen der Primärtumoren bezüglich ihrer Expression von CD68, CD86, CD163 und PD-L1?
4. Wie korrelieren TAMs und PD-L1 mit klinischen Parametern der Primärtumoren und Hirnmetastasen?
5. Welchen Einfluss haben TAMs und PD-L1 auf die Überlebenszeiten?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studienaufbau

In dieser Studie wurde die Infiltration tumorassozierter Makrophagen in Primärtumoren von Mammakarzinomen und ihren jeweiligen cerebralen Metastasen untersucht. Die Analyse erfolgte an zuvor in Paraffin eingebettetem Gewebe. Das Kollektiv umfasst 53 Patientinnen, die zwischen 2008 und 2021 an der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Magdeburg operiert wurden. Aufgrund der häufig extern durchgeführten Tumorresektion des Primärtumors wurde in Zusammenarbeit mit anderen pathologischen Instituten zunächst das fehlende Tumorgewebe akquiriert. Insgesamt konnten 27 gepaarte Proben sowie 26 weitere cerebrale Metastasen untersucht werden. Die Oberflächenproteine CD68, CD86 und CD163 und PD-L1 wurden mittels immunhistochemischer Färbung dargestellt. Anschließend wurde analysiert, ob sich das Expressionsverhalten zwischen den Primärtumoren und Hirnmetastasen unterscheidet und inwiefern eine Assoziation mit dem Krankheitsverlauf gegeben ist. In der Analyse der molekularen Subgruppen wurden die HER2-neu-positiven Primärtumoren aufgrund der geringen Stichprobengröße zusammengefasst. Die Datengenerierung erfolgte mittels ICD-Klassifizierung in der Datenbank CGM MEDICO sowie anhand von Daten des Krebsregisters Sachsen-Anhalt. Fehlende Informationen des Kollektivs wurden mithilfe anderer Behandler ergänzt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg genehmigt und im Einklang mit dem Votum durchgeführt (Studien-Nr. 146/19).

### 2.2 Material

Die vollständige Liste der verwendeten Materialien ist als Anhang in Kapitel 8.1 beigefügt.

### 2.3 Herstellung der TMA

Das Tissue Microarray (TMA) ist eine Technik, die in der Pathologie verwendet wird, um die Analyse von Gewebeproben effizienter zu gestalten. Ein TMA besteht aus mehreren Gewebeproben, die aus verschiedenen Spenderblöcken entnommen und anschließend in einen gemeinsamen Empfängerblock eingebettet werden. Das TMA umfasst bis zu 35 Biopsien und

kann dann wie eine einzige Gewebeprobe verarbeitet und analysiert werden. Diese Methodik ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Gewebeproben unter identischen experimentellen Bedingungen und schont zudem Ressourcen. Zunächst wurden HE-Übersichtsfärbungen angefertigt und anschließend geeignete Tumorregionen mittels Lichtmikroskopie markiert. Dabei wurden, sofern möglich, folgende Areale unterschieden: Tumornest und Tumorstroma. Das Tumornest wurde definiert als zellreicher Tumorzellverband, der von bindegewebigem Tumorstroma umgeben ist. Das bindegewebige Tumorstroma beinhaltet insbesondere Immunzellen, Fibroblasten sowie Endothelzellen und Gefäße. Unter Zuhilfenahme des Arraymold-Kit E wurden Empfängerblöcke für die Tissue Microarrays hergestellt. Aus den markierten Regionen wurden Stanzzyylinder aus den Spenderblöcken entnommen und in die Empfängerblöcke übertragen. Anschließend wurden die fertigen TMAs mit einer Stärke von 2 µm geschnitten, auf einen Objektträger aufgezogen und bei 37 °C über Nacht im Wärmeschränk getrocknet.

## 2.4 Immunhistochemische Färbung

Anschließend wurden die TMAs mit Antikörpern gegen CD68, CD86, CD163, PD-L1 und Ki-67 immunhistochemisch gefärbt. Bei einzelnen Proben war der Ki-67-Proliferationsstatus unbekannt, weshalb eine Nachbestimmung erfolgte. Bei diesem Verfahren bindet ein primärer Antikörper das Zielantigen mit seinem spezifischen F(ab')<sub>2</sub>-Fragment. Ein sekundärer Antikörper bindet dann das unspezifische Fc-Fragment des primären Antikörpers. Durch die Kopplung des sekundären Antikörpers mit einer Peroxidase und die anschließende Benetzung mit einem zusätzlichen Substrat entsteht ein Farbsignal, dessen Intensität mit der Menge des gebundenen Proteins im Gewebe korreliert.

Zu diesem Zweck wurden die Objektträger mit den TMAs jeweils zweimal für zehn Minuten in RotiClear entparaffiniert. Im Anschluss wurden die Schnitte für jeweils fünf Minuten einer absteigenden Alkoholreihe ausgesetzt, die zweimal 100 % Isopropanol und einmal 70 % Isopropanol umfasste. Danach erfolgte die Rehydrierung zweimal für jeweils fünf Minuten in destilliertem Wasser. Zur Demaskierung der Antigene erfolgte ein Heat-induced Epitope Retrieval (HIER): Dazu wurden die Schnitte in einen sauren Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6 überführt, welcher zuvor im Verhältnis 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt worden war. Im Anschluss wurden die Proben im Puffer für 90 Sekunden in der Mikrowelle erhitzt und

anschließend weitere sechsmal für jeweils 10 Sekunden erhitzt. Zwischen jedem der sechs Vorgänge fand eine kurze Unterbrechung von 60 Sekunden statt. Danach kühlten die Proben im Puffer für circa 30 Minuten bei Zimmertemperatur ab. Im Anschluss wurde der Citratpuffer mit destilliertem Wasser ausgespült und die Proben infolgedessen für zehn Minuten in TBS-TWEEN-Wash-Buffer-Lösung (1:20) gewaschen.

Im nächsten Schritt erfolgte eine zehnminütige Behandlung der Proben mit 200 µl Peroxid-Block zur Blockade der im Gewebe vorkommenden endogenen Peroxidasen. Danach wurden die TMAs für jeweils fünf Minuten dreimal in TBS-TWEEN gewaschen. Daraufhin erfolgte für exakt fünf Minuten eine Inkubation mit 200 µl UltraVision Protein-Block, welcher unspezifische Bindungen durch den primären Antikörper verhindert. Dieser Proteinblock ist in der Lage, unspezifische Epitope im Gewebe zu maskieren und sorgt dadurch für eine zielgerichtete Bindung der primären Antikörper. Nach drei weiteren Waschungen in TBS-TWEEN für jeweils fünf Minuten wurden die Proben mit dem primären Antikörper benetzt.

Nachdem zuvor Testfärbungen zur Konzentrationsfindung durchgeführt worden waren, wurde die primären Antikörper mit Antibody Diluent OP Quanto folgendermaßen verdünnt: CD68: 1:4000, CD163: 1:2000, CD86: 1:250, PD-L1: 1:50 und Ki-67: 1:1000. Die Proben wurden mit jeweils 200 µl Antikörperlösung benetzt und ruhten anschließend bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank.

Am nächsten Tag wurden die TMAs erneut dreimal für fünf Minuten in TBS-TWEEN gewaschen. Zur Unterstützung der Bindungsfähigkeit der primären Antikörper erfolgte im nächsten Schritt eine zehnminütige Inkubation mit 200 µl Primary Antibody Amplifier. Es folgten drei weitere Waschgänge mit TBS-TWEEN für jeweils 5 Minuten. Als nächstes wurden 200 µl sekundäre Antikörper mit gekoppelter Horseradish Peroxidase (HRP) hinzugefügt und die TMAs anschließend für 15 Minuten in abgedunkelter Umgebung inkubiert. Dieser Schritt sorgt durch die polymeren Bindungseigenschaften der HRP für eine maximale Bindungsfrequenz, wodurch ein besseres Signal gewährleistet wird. Nach einer erneuten Waschung mit TBS-TWEEN, wurden 200 µl Substrachromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB Substrat Kit) auf die Objektträger pipettiert. Das Mischungsverhältnis betrug 1 Tropfen Chromogen (etwa 30 µl) zu 1 ml DAB-Substrat. Das Substrachromogen wurde enzymatisch durch die HRP gespalten, wodurch eine bräunliche Färbung entstand. Diese ist sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch detektierbar. Die Inkubationsdauer für das

Substratchromogen war antikörperspezifisch und wurde zuvor im Rahmen der Testfärbungen bestimmt. Sie betrug für Ki-67, CD68, CD86 und PD-L1 3 Minuten und für CD163 2 Minuten. Anschließend wurden die Proben für jeweils fünf Minuten dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Proben wurden danach zur Färbung nuklearer Bestandteile für drei Minuten in eine Küvette mit Hämatoxylin überführt. Dem schloss sich eine Waschung unter fließendem, lauwarmem Wasser für fünf Minuten an. Die Proben durchliefen anschließend drei weitere Waschungen mit 100 % Isopropanol für je fünf Minuten. Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit einem Deckglas und dem Eideckmedium Mountex fixiert und anschließend mittels Aperio Versa 8 digitalisiert.

## 2.5 Quantifizierung der Immunhistochemie

### 2.5.1 Immunhistochemische Analyse von CD68, CD86 und CD163

Nach der Digitalisierung der Präparate erfolgte die Auswertung mithilfe des Programms Aperio ImageScope. Trotz strikter Einhaltung der Protokolle wurde ein unterschiedliches Färbeverhalten der Proben bezüglich ihrer Intensität festgestellt. Um diese Tatsache in der Analyse zu berücksichtigen, wurde ein immunreaktiver Score verwendet und auf das Zählen von Makrophagen verzichtet. Dafür wurde für CD68, CD163 sowie CD86 ein modifizierter immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner verwendet. Dieser wurde bereits in einer vereinfachten Version von Wei et al. zur Quantifizierung von TAMs verwendet<sup>109,110</sup>. Das Scoring erfolgte jeweils für die Hot-Spot-Region im Tumornest und Tumorstroma.

Die Intensität der Färbung wurde eingeteilt in: 1 = schwach, 2 = medium, 3 = stark. Der Intensitätsscore wurde aufgrund des unterschiedlichen Färbeverhaltens für CD68, CD163 und CD86 separat evaluiert. Der Reaktivitätsscore wurde quantifiziert, indem der Prozentsatz der positiv gefärbten Bereiche im Verhältnis zur umgebenden Tumorregion bewertet wurde. Unterschieden wurde folgende Einteilung: 1 = <10 %, 2 = 10-25 %, 3 = 26-40 %, 4 = > 40 %. Der endgültige Immunreaktive Score wurde durch Multiplikation der Intensitätspunktzahl mit der Reaktivitätspunktzahl bestimmt. Die erreichbare Mindestpunktzahl beträgt 1 Punkt, die Höchstzahl 12 Punkte. Das Färbeverhalten der Marker ist in Abbildung 2 dargestellt.

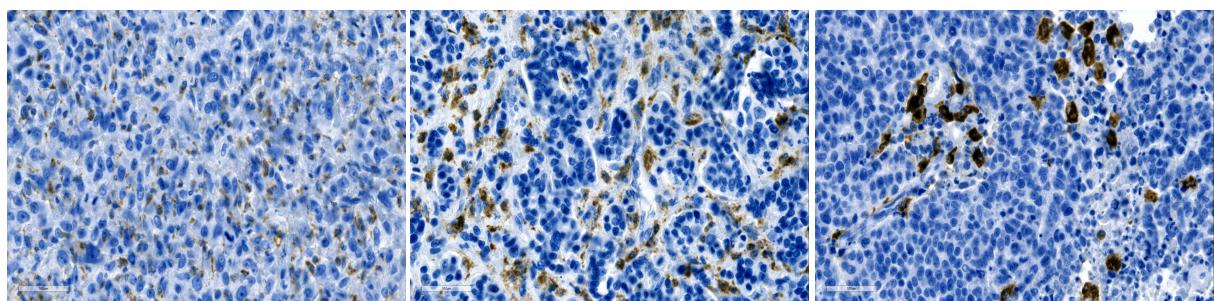
$$\text{Immunreaktiver Score} = \text{Intensität} \times \text{Reaktivität}$$

**A.**

schwach = 1 Pkt.

medium = 2 Pkt.

stark = 3 Pkt.

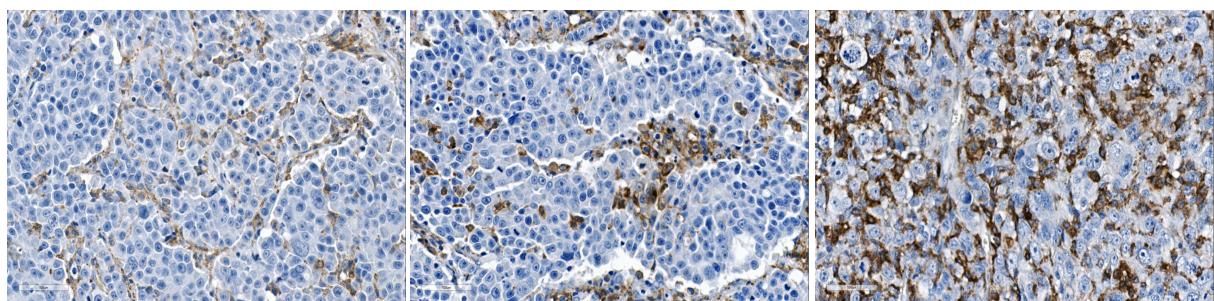


**B.**

schwach = 1 Pkt.

medium = 2 Pkt.

stark = 3 Pkt.

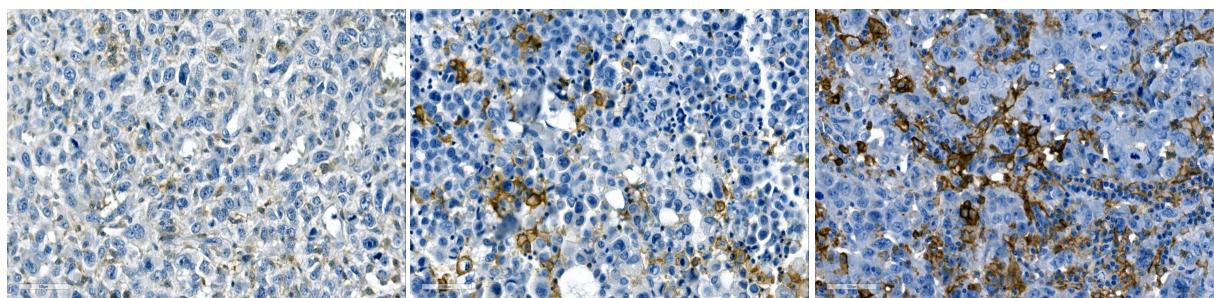


**C.**

schwach = 1 Pkt.

medium = 2 Pkt.

stark = 3 Pkt.



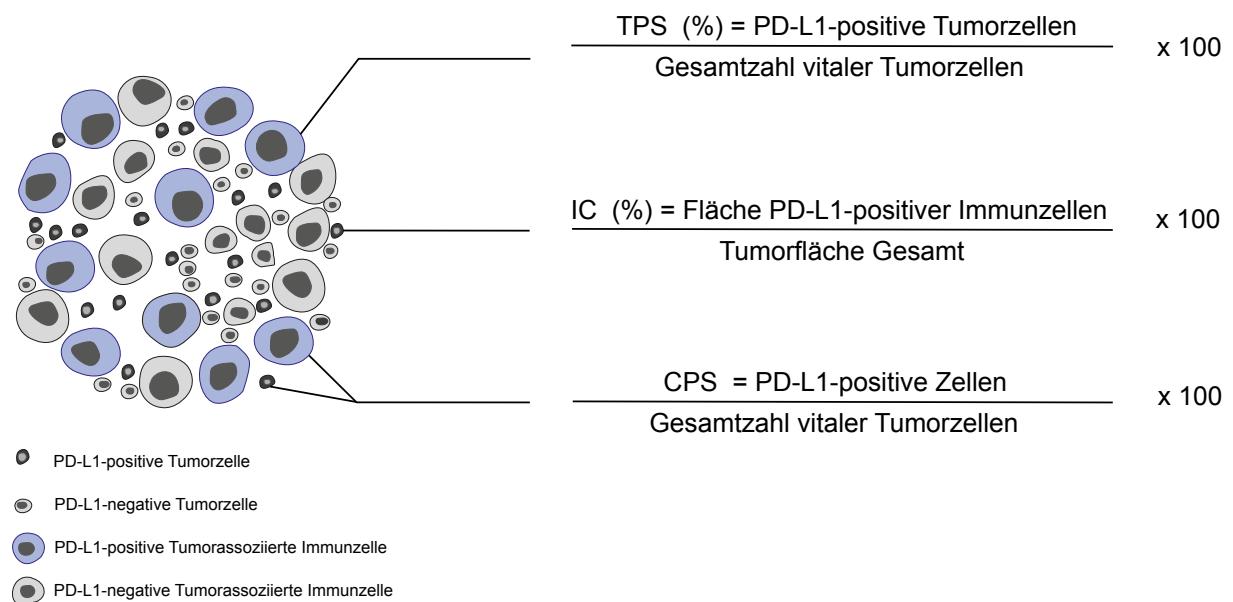
**Abb. 12: Färbeverhalten von CD68, CD163 und CD86 in den Gewebe schnitten.** A. Darstellung der Färbung von CD68. Die Anfärbung des Proteins zeigt ein braunes Kolorit. Als Scoring-System wurde der IRS verwendet. Je nach Ausprägung der Färbung erfolgte eine Zuordnung in die Kategorien schwach = 1 Punkt, medium = 2 Punkte und stark = 3 Punkte. B. Darstellung des Färbeverhaltens von CD163. C. Darstellung der Färbung von CD86. B. und C.: Färbung und Scoring erfolgten wie in A. (Vergrößerung 20x). Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

## 2.5.2 Immunhistochemische Analyse von PD-L1

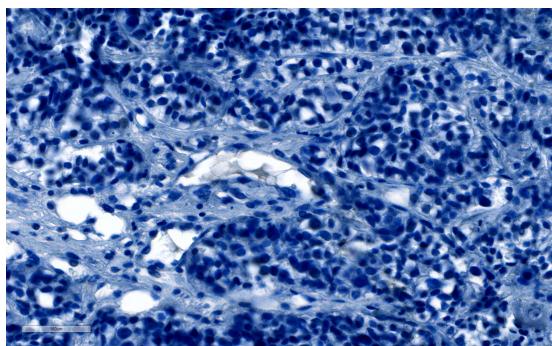
Die Auswertung der PD-L1-Expression erfolgte in Zusammenarbeit mit einem erfahrenen Pathologen (Dr. med B. Hanke) lichtmikroskopisch gemeinsam. In der klinischen Praxis haben sich die folgenden drei Scores etabliert: Tumor Proportion Score (TPS), Immune Cell Score (IC) und Combined Positive Score (CPS). Im Einklang mit der KEYNOTE-522-Zulassungsstudie für den Antikörper Pembrolizumab zur Therapie des triple-negativen

Mammakarzinoms wurde der CPS verwendet. Dieser Ansatz berücksichtigt sowohl die Expression in Tumorzellen als auch in Immunzellen. Beim Auszählen der positiven Zellen wurden ausschließlich solche mit membranständiger Expression berücksichtigt. In Abbildung 3 sind die verwendeten Algorithmen zur Erhebung der jeweiligen Scores verdeutlicht.

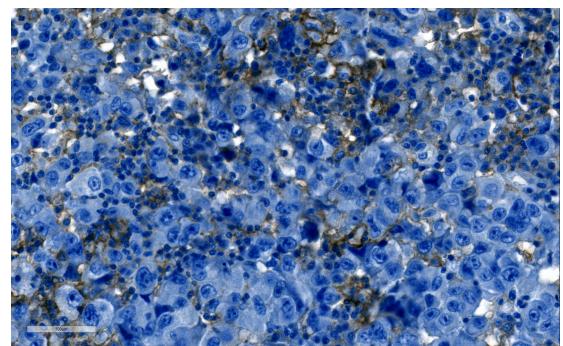
A.



B.



C.



**Abb. : Scoring und Färbeverhalten von PD-L1.** A. Schematische Darstellung der Scores: TPS, IC und CPS. Die Bedeutung der einzelnen Zellen ist in der Legende im unteren linken Bildabschnitt dargestellt. B. Darstellung einer negativen Expression von PD-L1 am Beispiel eines Mammakarzinoms. C. Färbeverhalten einer PD-L1-positiven cerebralen Metastase. (Vergrößerung 20x).

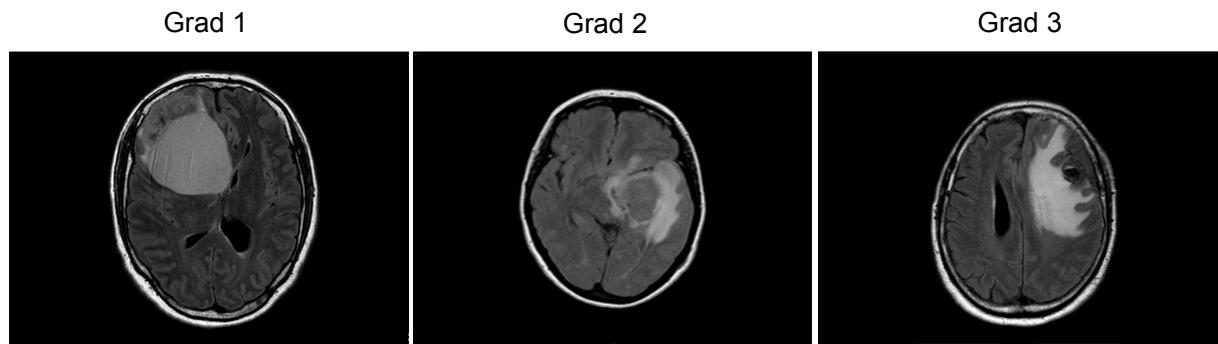
### 2.5.3 Immunhistochemische Analyse von Ki-67

Die Analyse des Ki-67-Proliferationsindex wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit dem oben genannten Pathologen durchgeführt und erfolgte wiederum gemeinsam unter Verwendung des Lichtmikroskops. Da es sich bei Ki-67 um ein nukleäres Protein handelt, wurden nur Kernfärbungen sowie Ki-67-positive mitotische Zellen in den Score einbezogen. Zytoplasmatische und Membranfärbungen von Ki-67, die unter dem verwendeten Antikörper auftreten können, blieben unberücksichtigt. Nach Betrachtung des gesamten Schnittes wurde der Score erhoben. Dieser wurde als Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen an der Gesamtzahl der Tumorzellen definiert.

## 2.6 Quantifizierung des peritumoralen Hirnödems

Zur Quantifizierung des peritumoralen Hirnödems wurde im Einklang mit anderen Studien ein dreistufiger Score verwendet (Abbildung 4). Patientinnen wurden als Grad 1 klassifiziert, wenn die ödematöse Fläche kleiner als das Tumorvolumen war. Eine Einstufung als Grad 2 erfolgte, wenn Ödem- und Tumorvolumen gleich groß waren, und als Grad 3, wenn die ödematöse Fläche das Tumorvolumen überstieg <sup>112</sup>. Die Auswertung erfolgte anhand von MRT-Aufnahmen, bevorzugt in der T2-FLAIR-Sequenz. Diese ermöglicht eine Unterscheidung zwischen freier und gewebegebundener Flüssigkeit.

**A.**



**Abb. 13: Quantifizierung des peritumoralen Ödems:** Darstellung des Scores zur Klassifizierung des Hirnödems. Für die Einteilung wurde ein dreistufiger Score verwendet, der das Verhältnis der Metastase zur Größe des peritumoralen Ödems berücksichtigt.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die Analyse der erhobenen Daten erfolgte mithilfe der statistischen Programmiersprache R. Zunächst wurden die beiden Tumorregionen auf Expressionsunterschiede bezüglich der Marker CD68, CD163 und CD86 untersucht. Im Anschluss wurde der Einfluss von CD68, CD163, CD86 und PD-L1 in den Primärtumoren auf die Länge des Intervalls zwischen der Erstdiagnose des Mammakarzinoms und der cerebralen Manifestation sowie auf das Gesamtüberleben untersucht. Zudem wurde die Expression dieser Marker in den Hirnmetastasen hinsichtlich der Dauer des Intervalls zwischen der Diagnose der Hirnmetastase und dem Tod analysiert. Danach erfolgte die Korrelation mit den klinischen Wachstumsparametern der Primärtumoren und der Hirnmetastasen. Das Signifikanzniveau wurde bei sämtlichen Analysen auf  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientinnenkollektiv und deskriptive Statistik

Die Eigenschaften des Kollektivs sind in den beiden nachfolgenden Tabellen 3 und 4 dargestellt. Diese beziehen sich jeweils auf Fälle, bei denen Tumorgewebe untersucht wurde. Bezuglich der Geschlechterverteilung gab es einen männlichen Fall, von dem sowohl der Primärtumor als auch die cerebrale Metastase untersucht wurden. Da der Rest des Kollektivs weiblich war, wird zur besseren Lesbarkeit im Folgenden das generische Femininum verwendet.

Die Gesamtzahl des Kollektivs umfasst 53 Fälle, wobei das mediane Alter bei der Erstdiagnose des Mammakarzinoms 53 Jahren betrug. Das mediane Alter der Erstdiagnose lag bei Patientinnen mit triple-negativem Brustkrebs ebenfalls bei 53 Jahren. Für den luminalen HER2/neu-negativen Subtyp lag das mediane Erkrankungsalter bei 60 Jahren, während es bei HER2/neu-positiven Tumoren 50 Jahre betrug. Im Gesamtkollektiv lag das mediane Intervall zwischen Erstdiagnose des Primärtumors und Auftreten der cerebralen Manifestation bei 32 Monaten. In den molekularen Subgruppen betrugen die Medianwerte: Triple-negativ 29 Monate, Luminal HER2/neu-negativ 31 Monate und HER2/neu-positiv 37 Monate. Das Gesamtüberleben, definiert als Zeitraum zwischen der Erstdiagnose des Primärtumors und dem Tod, betrug für die gesamte Gruppe im Median 60 Monate. In der Subgruppenanalyse zeigten triple-negative Tumoren mit 40 Monaten und HER2/neu-positive Tumoren mit 61 Monaten eine schlechtere Prognose im Vergleich zu den luminalen HER2/neu-negativen Tumoren, deren Medianüberleben bei 79 Monaten lag. Das mediane Intervall zwischen der Erstdiagnose der Hirnmetastase und dem Tod betrug für das Gesamtkollektiv 13 Monate. In der Subgruppenanalyse betrug dieses Intervall: 8 Monate für triple-negative Tumoren, 23 Monate für luminaler HER2/neu-negative Tumoren und 12 Monate für HER2/neu-positive Tumoren.

**Tab. 5: Charakteristika der Primärtumoren.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

|                              | Triple-negativ |      | Luminal HER2/neu- |      | HER2/neu+  |      |
|------------------------------|----------------|------|-------------------|------|------------|------|
|                              | Häufigkeit     | %    | Häufigkeit        | %    | Häufigkeit | %    |
| Gesamtzahl                   | 9              | 100  | 9                 | 100  | 9          | 100  |
| <b>Alter</b>                 |                |      |                   |      |            |      |
| ≤ 50                         | 3              | 33,3 | 3                 | 33,3 | 4          | 44,4 |
| ≥ 50                         | 6              | 66,7 | 6                 | 66,7 | 5          | 55,6 |
| <b>T-Stage</b>               |                |      |                   |      |            |      |
| T1 & T2                      | 4              | 44,4 | 5                 | 55,6 | 7          | 77,8 |
| T3 & T4                      | 5              | 55,6 | 3                 | 33,3 | 1          | 11,1 |
| Unbekannt                    | 0              | 0,0  | 1                 | 11,1 | 1          | 11,1 |
| <b>N-Stadium</b>             |                |      |                   |      |            |      |
| N0                           | 3              | 33,3 | 1                 | 11,1 | 4          | 44,4 |
| N+                           | 6              | 66,7 | 8                 | 88,9 | 5          | 55,6 |
| <b>M-Stadium</b>             |                |      |                   |      |            |      |
| M0                           | 6              | 66,7 | 5                 | 55,6 | 6          | 66,7 |
| M+                           | 3              | 33,3 | 4                 | 44,4 | 3          | 33,3 |
| <b>Grading</b>               |                |      |                   |      |            |      |
| G1                           | 0              | 0,0  | 0                 | 0,0  | 0          | 0,0  |
| G2                           | 2              | 22,2 | 7                 | 77,8 | 4          | 44,4 |
| G3                           | 7              | 77,8 | 2                 | 22,2 | 5          | 55,6 |
| <b>Histologischer Subtyp</b> |                |      |                   |      |            |      |
| Non Special Type             | 7              | 77,8 | 6                 | 66,7 | 8          | 88,9 |
| Lobulär                      | 1              | 11,1 | 3                 | 33,3 | 0          | 0,0  |
| Anderer Typ                  | 1              | 11,1 | 0                 | 0,0  | 1          | 11,1 |
| <b>Ki-67-Index</b>           |                |      |                   |      |            |      |
| ≤ 25%                        | 3              | 33,3 | 5                 | 55,6 | 3          | 33,3 |
| ≥ 25%                        | 6              | 66,7 | 4                 | 44,4 | 6          | 66,6 |
| <b>BRCA1</b>                 |                |      |                   |      |            |      |
| Positiv                      | 1              | 11,1 | 0                 | 0,0  | 1          | 11,1 |
| Negativ                      | 8              | 88,9 | 9                 | 100  | 8          | 88,9 |
| <b>nCTX</b>                  |                |      |                   |      |            |      |
| Ja                           | 4              | 44,4 | 2                 | 22,2 | 4          | 44,4 |
| Nein                         | 5              | 55,6 | 7                 | 77,8 | 5          | 55,6 |
| <b>Operative Therapie</b>    |                |      |                   |      |            |      |
| BET                          | 4              | 44,4 | 3                 | 33,1 | 5          | 55,6 |
| Ablatio                      | 3              | 33,3 | 5                 | 55,6 | 4          | 44,4 |
| Keine                        | 2              | 22,2 | 1                 | 11,1 | 0          | 0,0  |
| <b>RTX</b>                   |                |      |                   |      |            |      |
| Ja                           | 7              | 77,8 | 8                 | 88,9 | 8          | 88,9 |
| Nein                         | 2              | 22,2 | 1                 | 11,1 | 1          | 11,1 |

,

**Tab. 6 : Charakteristika der Hirnmetastasen.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

|                                 | Triple-negativ |      | Luminal HER2/neu- |      | HER2/neu+  |      |
|---------------------------------|----------------|------|-------------------|------|------------|------|
|                                 | Häufigkeit     | %    | Häufigkeit        | %    | Häufigkeit | %    |
| <b>Gesamtzahl</b>               | 15             | 100  | 19                | 100  | 19         | 100  |
| <b>Alter</b>                    |                |      |                   |      |            |      |
| ≤ 50                            | 3              | 20   | 5                 | 26,3 | 4          | 21,0 |
| ≥ 50                            | 12             | 80   | 14                | 73,7 | 15         | 79,0 |
| <b>Hirnmetastase</b>            |                |      |                   |      |            |      |
| Primär                          | 2              | 13,3 | 2                 | 10,5 | 0          | 0,0  |
| Sekundär                        | 13             | 86,7 | 17                | 89,5 | 19         | 100  |
| <b>Anzahl HM bei ED</b>         |                |      |                   |      |            |      |
| Solitär                         | 10             | 66,7 | 8                 | 42,1 | 11         | 57,9 |
| Multiple                        | 5              | 33,3 | 10                | 52,6 | 8          | 42,1 |
| Unbekannt                       |                |      | 1                 | 5,3  |            |      |
| <b>Grad des Ödems</b>           |                |      |                   |      |            |      |
| 1                               | 3              | 20,0 | 5                 | 26,3 | 5          | 26,3 |
| 2                               | 5              | 33,3 | 4                 | 21,0 | 4          | 21,0 |
| 3                               | 7              | 46,7 | 8                 | 42,1 | 10         | 52,6 |
| Unbekannt                       |                |      | 2                 | 10,6 |            |      |
| <b>Meningeosis</b>              |                |      |                   |      |            |      |
| Ja                              | 2              | 13,3 | 3                 | 15,8 | 3          | 15,8 |
| Nein                            | 13             | 86,7 | 16                | 84,2 | 16         | 84,2 |
| <b>Dexamethason präoperativ</b> |                |      |                   |      |            |      |
| Ja                              | 8              | 53,3 | 8                 | 42,1 | 6          | 31,6 |
| Nein                            | 7              | 46,7 | 11                | 57,9 | 12         | 63,2 |
| Unbekannt                       |                |      |                   |      | 1          | 5,3  |
| <b>Rezidiv / Neue HM</b>        |                |      |                   |      |            |      |
| Ja                              | 4              | 26,7 | 4                 | 21,1 | 5          | 26,3 |
| Nein                            | 11             | 73,3 | 15                | 78,9 | 14         | 73,7 |

## 3.2 Makrophageninfiltration

### 3.2.1 Expressionsunterschiede zwischen Tumornest und Tumorstroma

Zu Beginn wurde untersucht, ob sich das Expressionsverhalten von CD68, CD86 und CD163 zwischen Tumornest (TN) und Tumorstroma (TS) unterscheidet. Dazu wurde zunächst das Gesamtkollektiv betrachtet und anschließend folgende Subgruppen analysiert: Triple-negativ, Luminal HER2/neu- und HER2/neu+. Die Signifikanz wurde mittels Wilcoxon-Tests überprüft und die Ergebnisse in Tabelle 5 dargestellt.

**Tab. 7: Ergebnisse der Expressionsunterschiede zwischen TN und TS für CD68, CD86 und CD163.**  
Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

|              |                   | Primärtumoren |        |    | Hirnmetastasen |        |    |   |          |
|--------------|-------------------|---------------|--------|----|----------------|--------|----|---|----------|
|              |                   | n             | Median | p  | n              | Median | p  |   |          |
|              |                   |               | TN     | TS |                | TN     | TS |   |          |
| <b>CD68</b>  | Gesamtheit        | 26            | 2      | 4  | < 0.0001       | 44     | 3  | 8 | < 0.0001 |
|              | Triple-negativ    | 9             | 2      | 4  | 0.125          | 12     | 4  | 9 | 0.008    |
|              | Luminal HER2/neu- | 8             | 2      | 4  | 0.094          | 15     | 2  | 8 | 0.0001   |
|              | HER2/neu+         | 9             | 2      | 4  | 0.008          | 17     | 3  | 6 | < 0.0001 |
| <b>CD86</b>  | Gesamtheit        | 26            | 1      | 4  | < 0.0001       | 44     | 2  | 6 | < 0.0001 |
|              | Triple-negativ    | 9             | 1      | 4  | 0.016          | 12     | 1  | 6 | 0.002    |
|              | Luminal HER2/neu- | 8             | 1      | 2  | 0.125          | 15     | 2  | 4 | 0.033    |
|              | HER2/neu+         | 9             | 2      | 4  | 0.016          | 17     | 2  | 6 | < 0.0001 |
| <b>CD163</b> | Gesamtheit        | 26            | 2      | 6  | < 0.0001       | 44     | 2  | 6 | < 0.0001 |
|              | Triple-negativ    | 9             | 2      | 4  | 0.016          | 12     | 2  | 8 | 0.001    |
|              | Luminal HER2/neu- | 8             | 1      | 2  | 0.016          | 15     | 1  | 4 | 0.0001   |
|              | HER2/neu+         | 9             | 2      | 6  | 0.004          | 17     | 2  | 6 | < 0.0001 |

Der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben zeigte im Gesamtkollektiv sowohl in den Primärtumoren als auch in den Hirnmetastasen einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Expression der Marker CD68, CD86 und CD163 zwischen Tumornest und

Tumorstroma. Darüber hinaus konnte in den Hirnmetastasen für alle Subgruppen ein signifikanter Unterschied in der Expression aller Marker festgestellt werden (Tab. 5).

In der Subgruppenanalyse für CD68 in den Primärtumoren konnte lediglich für HER2/neu+ ein signifikanter Unterschied zwischen Tumornest und Tumorstroma nachgewiesen werden ( $p = 0,008$ ). Für CD86 wurde in den Primärtumoren in den Subgruppen Triple-negativ ( $p = 0,016$ ) und HER2/neu+ ( $p = 0,016$ ) eine Signifikanz festgestellt. Der Marker CD163 zeigte in allen Subgruppen im Wilcoxon-Test einen signifikanten Unterschied. Obwohl in der Subgruppenanalyse nicht alle Tests signifikant ausfielen, zeigte die zentrale Tendenz des Medians durchgehend höhere Werte im Tumorstroma. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die Stichprobengröße der Subgruppen in den Primärtumoren deutlich geringer war als in den Hirnmetastasen. Dadurch besteht möglicherweise nicht genügend statistische Power, um kleinere Effekte zu erfassen. In der Subgruppenanalyse der Hirnmetastasen konnte ein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten für alle untersuchten Marker nachgewiesen werden (Tab. 5).

### **3.2.2 Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen**

Daraufhin wurde der Wilcoxon-Test angewendet, um festzustellen, ob ein signifikanter Unterschied im IR-Score von CD68, CD86 und CD163 zwischen den Primärtumoren und den korrespondierenden Hirnmetastasen besteht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Dabei zeigte sich lediglich im Tumorstroma für CD68 ein signifikanter Unterschied in den Medianwerten zwischen den Primärtumoren und den Hirnmetastasen mit einem  $p$ -Wert von 0,011. Diese Signifikanz lässt sich insbesondere auf die Expressionsunterschiede HER2/neu-positiver Tumoren zurückführen ( $p = 0,016$ ). Außerdem zeigte sich für CD86 in der Subgruppenanalyse des Tumornests eine signifikant höhere Expression in den Metastasen bei luminal HER2/neu-negativen Tumoren ( $p = 0,031$ ).

**Tab. 8: Ergebnisse der Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen für CD68, CD86 und CD163. Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.**

|              |                   | Tumornest |        |    |       | Tumorstroma |        |    |       |
|--------------|-------------------|-----------|--------|----|-------|-------------|--------|----|-------|
|              |                   | n         | Median |    | p     | n           | Median |    | p     |
|              |                   |           | PT     | HM |       |             | PT     | HM |       |
| <b>CD68</b>  | Gesamtheit        | 27        | 2      | 3  | 0.094 | 21          | 4      | 6  | 0.011 |
|              | Triple-negativ    | 9         | 2      | 4  | 0.344 | 7           | 6      | 9  | 0.25  |
|              | Luminal HER2/neu- | 9         | 2      | 2  | 0.281 | 5           | 6      | 6  | 0.75  |
|              | HER2/neu+         | 9         | 2      | 3  | 0.375 | 9           | 4      | 6  | 0.016 |
| <b>CD86</b>  | Gesamtheit        | 27        | 1      | 2  | 0.104 | 21          | 4      | 6  | 0.377 |
|              | Triple-negativ    | 9         | 1      | 2  | 0.375 | 7           | 6      | 5  | 0.625 |
|              | Luminal HER2/neu- | 9         | 1      | 3  | 0.031 | 5           | 3      | 4  | 0.5   |
|              | HER2/neu+         | 9         | 2      | 2  | 0.797 | 9           | 4      | 8  | 0.5   |
| <b>CD163</b> | Gesamtheit        | 27        | 2      | 2  | 0.548 | 21          | 6      | 6  | 0.576 |
|              | Triple-negativ    | 9         | 2      | 2  | 1     | 7           | 6      | 9  | 0.75  |
|              | Luminal HER2/neu- | 9         | 1      | 1  | 0.375 | 5           | 3      | 6  | 0.75  |
|              | HER2/neu+         | 9         | 2      | 2  | 0.688 | 9           | 6      | 6  | 0.844 |

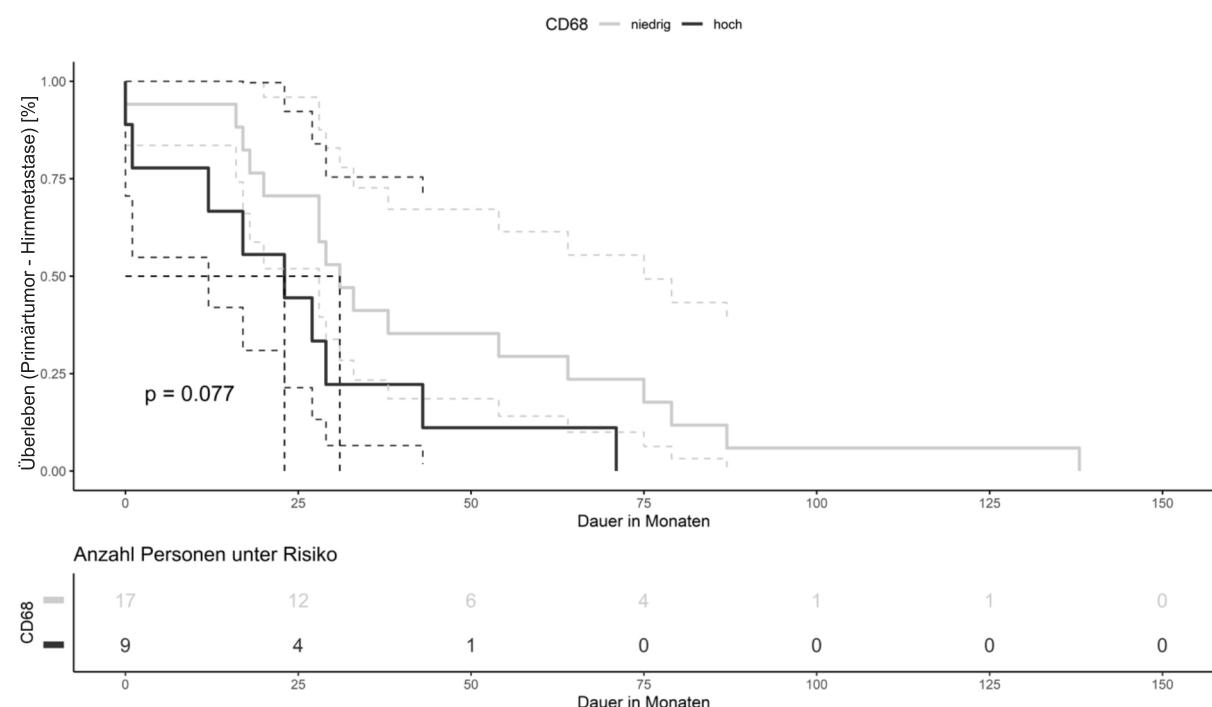
PT = Primärtumoren; HM = Hirnmetastasen

### 3.3 CD68

#### 3.3.1 Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase)

Als Nächstes wurde der Einfluss von CD68-positiven Makrophagen in den Primärtumoren auf die Länge des Intervalls zwischen Erstdiagnose des Primärtumors und der cerebralen Manifestation untersucht. Mit Hilfe der Median-Split-Methode wurde das Kollektiv dichotomisiert in: CD68<sup>hoch</sup> und CD68<sup>niedrig</sup>. Der Zeitraum wurde anhand einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt und die Signifikanz mittels des Log-Rank-Test geprüft (Abb. 5 und Tab. 7).

In keiner der Regionen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (TN:  $p = 0,15$ ; TS:  $p = 0,077$ ; Log-Rank-Test). Das mediane Intervall (Primärtumor - Hirnmetastase) des betrachteten Kollektivs betrug bei hoher Expression im Tumornest 29 Monate und bei niedriger Expression 28 Monate. Betrachtet man das Tumorstroma beträgt das mediane Intervall zwischen Erstdiagnose des Primärtumors und der cerebralen Manifestation bei hoher CD68-Expression 23 Monate und bei geringer Expression 31 Monate.



**Abb. 14: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD68.** A. Kaplan-Meier-Kurve von Patientinnen mit hoher und niedriger Expression CD68-positiver Makrophagen im TS. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und der p-Wert ist in der linken unteren Ecke des Diagramms dargestellt. Modifiziert nach Zimmer et al. 2025 <sup>111</sup>.

**Tab. 9: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD68.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>

|                         | Median   |               |              | n  | p     |  |  |
|-------------------------|----------|---------------|--------------|----|-------|--|--|
|                         | Schätzer | KI [95%]      |              |    |       |  |  |
|                         |          | Untere Grenze | Obere Grenze |    |       |  |  |
| <b>Tumornest</b>        |          |               |              |    |       |  |  |
| CD68 <sup>niedrig</sup> | 29       | 23            | 75           | 27 | 0,15  |  |  |
| CD68 <sup>hoch</sup>    | 28       | 12            | -            |    |       |  |  |
| <b>Tumorstroma</b>      |          |               |              |    |       |  |  |
| CD68 <sup>niedrig</sup> | 31       | 28            | 75           | 26 | 0,077 |  |  |
| CD68 <sup>hoch</sup>    | 23       | 12            | -            |    |       |  |  |

### 3.3.2 Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor - Tod)

Im Anschluss wurde der Einfluss CD68-positiver Makrophagen in den Primärtumoren auf die Länge des Gesamtüberlebens mittels Log-Rank-Test analysiert. Das Gesamtüberleben wurde definiert als Zeitraum zwischen Erstdiagnose des Primärtumors und dem Tod. Diese Definition findet ebenfalls Anwendung auf CD86, CD163 und PD-L1. Die Überlebenszeitanalyse wurde unter Berücksichtigung von drei Patientinnen durchgeführt, welche zum Zeitpunkt der Analyse noch am Leben waren und daher zensiert wurden. Die Resultate sind in Tabelle 8 dargestellt.

Für keine der beiden Tumorregionen konnte ein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden (TN: p = 0,7; TS: p = 0,8; Log-Rank-Test)

**Tab 10: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor – Tod) für CD68.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025 <sup>111</sup>.

|                         | Median   |               |              | n  | p   |  |  |
|-------------------------|----------|---------------|--------------|----|-----|--|--|
|                         | Schätzer | KI [95%]      |              |    |     |  |  |
|                         |          | Untere Grenze | Obere Grenze |    |     |  |  |
| <b>Tumornest</b>        |          |               |              |    |     |  |  |
| CD68 <sup>niedrig</sup> | 66       | 34            | 138          | 27 | 0,7 |  |  |
| CD68 <sup>hoch</sup>    | 69       | 46            | -            |    |     |  |  |
| <b>Tumorstroma</b>      |          |               |              |    |     |  |  |
| CD68 <sup>niedrig</sup> | 66       | 45            | 143          | 26 | 0,8 |  |  |
| CD68 <sup>hoch</sup>    | 46       | 28            | -            |    |     |  |  |

### 3.3.3 Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod)

Im Folgenden wurde der Einfluss der CD68-Expression in den cerebralen Metastasen auf die Länge des Intervalls zwischen der Erstdiagnose der Hirnmetastase und dem Todesdatum untersucht. Die Definition dieses Intervalls gilt auch für CD86, CD163 und PD-L1. Dazu wurde das Kollektiv erneut mittels Median-Split-Methode in die Gruppen CD68<sup>hoch</sup> und CD68<sup>niedrig</sup> unterteilt. In die Analyse wurden sämtliche verfügbaren Proben der Hirnmetastasen miteinbezogen, auch solche, für die kein Primärtumor zur Verfügung stand. Zum Zeitpunkt der Analyse waren sechs Patientinnen noch am Leben und wurden daher zensiert betrachtet. Die Signifikanz wurde anhand des Log-Rank-Tests geprüft und die Resultate in Tabelle 9 visualisiert.

Die Auswertung des Tests ergab für keine Tumorregion einen signifikanten Einfluss CD68-positiver Makrophagen auf das Gesamtüberleben (TN: p = 0,8; TS: p = 0,4; Log-Rank-Test).

**Tab. 9: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für CD68.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

**Tab. 9: Univariatanalyse des Intervalls 1**

|                         | Median   |               |              | n  | p   |  |  |
|-------------------------|----------|---------------|--------------|----|-----|--|--|
|                         | Schätzer | KI [95%]      |              |    |     |  |  |
|                         |          | Untere Grenze | Obere Grenze |    |     |  |  |
| <b>Tumornest</b>        |          |               |              |    |     |  |  |
| CD68 <sup>niedrig</sup> | 13       | 11            | 34           | 52 | 0,8 |  |  |
| CD68 <sup>hoch</sup>    | 12       | 5             | 59           |    |     |  |  |
| <b>Tumorstroma</b>      |          |               |              |    |     |  |  |
| CD68 <sup>niedrig</sup> | 27       | 12            | 53           | 43 | 0,4 |  |  |
| CD68 <sup>hoch</sup>    | 13       | 10            | 32           |    |     |  |  |

### 3.3.4 Assoziationen mit klinischen Parametern der Primärtumoren

Als Nächstes wurden mögliche Assoziationen zwischen der Expression des Markers CD68 und klinischen Parametern der Primärtumoren untersucht. Dabei wurden folgende Merkmale betrachtet: TNM-Stadium, Grading, Hormonrezeptoren, HER2/neu-Status sowie der Einfluss einer neoadjuvanten Chemotherapie. Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurde hierfür der exakte Fisher-Test verwendet, da dieser im Vergleich zum Chi-Quadrat-Test auch bei niedriger Fallzahl zuverlässige Ergebnisse liefert. Die Resultate des Tests sind in Tabelle 10 dargestellt.

Der Test zeigte sowohl für das Tumornest als auch für das Tumorstroma keine signifikanten Assoziationen zwischen der Expression von CD68 und klinischen Merkmalen der Primärtumoren.

**Tab. 11: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Primärtumoren für CD68.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

| Klinische Parameter        | Tumornest      |                    | Tumorstroma    |                    | p    |
|----------------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|------|
|                            | Hoch,<br>n = 8 | Niedrig,<br>n = 19 | Hoch,<br>n = 9 | Niedrig,<br>n = 17 |      |
| <b>T-Stadium</b>           |                |                    | 0,8            |                    | 0,12 |
| 1                          | 2              | 5                  | 2              | 5                  |      |
| 2                          | 2              | 7                  | 1              | 8                  |      |
| 3                          | 2              | 2                  | 2              | 2                  |      |
| 4                          | 1              | 4                  | 3              | 1                  |      |
| Unbekannt                  | 1              | 1                  | 1              | 1                  |      |
| <b>N-Stadium</b>           |                |                    | >0,9           |                    | 0,7  |
| N0                         | 2              | 6                  | 2              | 6                  |      |
| N+                         | 6              | 13                 | 7              | 11                 |      |
| <b>M-Stadium</b>           |                |                    | 0,7            |                    | 0,7  |
| M0                         | 6              | 11                 | 5              | 12                 |      |
| M+                         | 2              | 8                  | 4              | 5                  |      |
| <b>Grading</b>             |                |                    | 0,7            |                    | >0,9 |
| 2                          | 3              | 10                 | 4              | 9                  |      |
| 3                          | 5              | 9                  | 5              | 8                  |      |
| <b>Östrogenrezeptor</b>    |                |                    | 0,7            |                    | 0,4  |
| Positiv                    | 4              | 12                 | 4              | 11                 |      |
| Negativ                    | 4              | 7                  | 5              | 6                  |      |
| <b>Progesteronrezeptor</b> |                |                    | 0,7            |                    | 0,4  |
| Positiv                    | 4              | 12                 | 4              | 11                 |      |
| Negativ                    | 4              | 7                  | 5              | 6                  |      |
| <b>HER2/neu</b>            |                |                    | 0,2            |                    | 0,4  |
| Positiv                    | 1              | 8                  | 2              | 7                  |      |
| Negativ                    | 7              | 11                 | 7              | 10                 |      |
| <b>Neoadjuvante CTX</b>    |                |                    | >0,9           |                    | >0,9 |
| Ja                         | 3              | 7                  | 3              | 6                  |      |
| Nein                       | 5              | 12                 | 6              | 11                 |      |

### 3.3.5 Assoziationen mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen

Danach wurde überprüft, ob eine Verbindung zwischen der CD68-Expression in den cerebralen Metastasen und prognostischen Parametern besteht. Die folgenden Merkmale wurden mittels exaktem Test nach Fisher untersucht: Meningoisis carcinomatosa, Dexamethason-Behandlung,

Anzahl der Hirnmetastasen (einzel vs. multiple), Präsentation (synchron vs. metachron) sowie cerebrale Rezidive. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Der Test zeigte eine statistisch signifikante inverse Assoziation zwischen CD68-positiven Makrophagen im Tumornest und dem Vorliegen einer Meningeosis carcinomatosa ( $p = 0,016$ ). Bei einem  $p$ -Wert von 0,053 zeigt die Assoziation zwischen der CD68-Expression im Tumornest und dem Grad des Hirnödems eine grenzwertige Signifikanz.

**Tab. 12: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen für CD68.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

| Klinische Parameter     | Tumornest       |                    |       | Tumorstoma      |                    |     |
|-------------------------|-----------------|--------------------|-------|-----------------|--------------------|-----|
|                         | Hoch,<br>n = 22 | Niedrig,<br>n = 31 | p     | Hoch,<br>n = 20 | Niedrig,<br>n = 24 | p   |
| <b>Meningeosis</b>      |                 |                    | 0,016 |                 |                    | 0,7 |
| Ja                      | 0               | 8                  |       | 2               | 4                  |     |
| Nein                    | 22              | 22                 |       | 17              | 20                 |     |
| Unbekannt               | 0               | 1                  |       | 1               | 0                  |     |
| <b>Dexamethason</b>     |                 |                    | 0,8   |                 |                    | 0,4 |
| Ja                      | 11              | 17                 |       | 9               | 15                 |     |
| Nein                    | 11              | 13                 |       | 11              | 9                  |     |
| Unbekannt               | 0               | 1                  |       |                 |                    |     |
| <b>Hirnödem</b>         |                 |                    | 0,053 |                 |                    | 0,6 |
| 1                       | 2               | 11                 |       | 6               | 5                  |     |
| 2                       | 6               | 7                  |       | 5               | 5                  |     |
| 3                       | 14              | 11                 |       | 8               | 14                 |     |
| Unbekannt               | 0               | 2                  |       | 1               | 0                  |     |
| <b>Anzahl der HM</b>    |                 |                    | 0,6   |                 |                    | 0,8 |
| Solitär                 | 11              | 12                 |       | 7               | 10                 |     |
| Multiple                | 11              | 18                 |       | 13              | 14                 |     |
| Unbekannt               | 0               | 1                  |       |                 |                    |     |
| <b>Präsentation</b>     |                 |                    | 0,6   |                 |                    | 0,6 |
| Synchron                | 1               | 3                  |       | 1               | 3                  |     |
| Metachron               | 21              | 28                 |       | 19              | 21                 |     |
| <b>Rezidiv cerebral</b> |                 |                    |       |                 |                    |     |
| Ja                      | 4               | 9                  | 0,5   | 5               | 4                  | 0,7 |
| Nein                    | 18              | 22                 |       | 15              | 20                 |     |

## 3.4 CD86

### 3.4.1 Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase)

Im Anschluss wurde der Einfluss CD86-positiver Makrophagen in den Primärtumoren auf die Länge des Intervalls (Primärtumor – Hirnmetastase) untersucht. Dazu wurde das Kollektiv mittels der Median-Split-Methode in die Gruppen CD86<sup>niedrig</sup> und CD86<sup>hoch</sup> dichotomisiert. Die Signifikanz für die entsprechenden Tumorregionen wurde mithilfe des Log-Rank-Tests geprüft und die Ergebnisse in Tabelle 12 dargestellt. Der Test ergab für keine Lokalisation innerhalb der Primärtumoren einen signifikanten Einfluss von CD86 auf die Länge des untersuchten Intervalls (TN:  $p = 0,6$ ; TS:  $p = 0,14$ ; Log-Rank-Test). Der mediane Zeitraum zwischen der Erstdiagnose des Mammakarzinoms und der Hirnmetastase war bei hoher CD86-Expression über beide Tumorregionen hinweg verlängert. Eine niedrige CD86-Expression ging hingegen mit einem kürzeren Intervall einher.

**Tab. 13: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD86.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

| Tumornest                     | Median   |               |              | n  | p    |  |  |
|-------------------------------|----------|---------------|--------------|----|------|--|--|
|                               | Schätzer | KI [95%]      |              |    |      |  |  |
|                               |          | Untere Grenze | Obere Grenze |    |      |  |  |
| <b>CD86<sup>niedrig</sup></b> | 25       | 17            | 75           | 27 | 0,6  |  |  |
| <b>CD86<sup>hoch</sup></b>    | 38       | 29            | -            |    |      |  |  |
| <b>Tumorstroma</b>            |          |               |              |    |      |  |  |
| <b>CD86<sup>niedrig</sup></b> | 28       | 23            | 75           | 26 | 0,14 |  |  |
| <b>CD86<sup>hoch</sup></b>    | 29       | 12            | -            |    |      |  |  |

### 3.4.2 Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor - Tod)

Anschließend wurde der Einfluss der CD86-Expression in den Primärtumoren auf das Gesamtüberleben mittels Log-Rank-Test untersucht (Tab. 13). Hierzu wurde das Kollektiv erneut anhand des Medians dichotomisiert in CD86<sup>niedrig</sup> und CD86<sup>hoch</sup>. Die Definition des Gesamtüberlebens sowie die Zensur entsprechen dem Vorgehen bei CD68.

Für keine der beiden Regionen konnte ein signifikanter Einfluss von CD86 auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden (TN:  $p = 0,4$ ; TS:  $p = 0,8$ ; Log-Rank-Test).

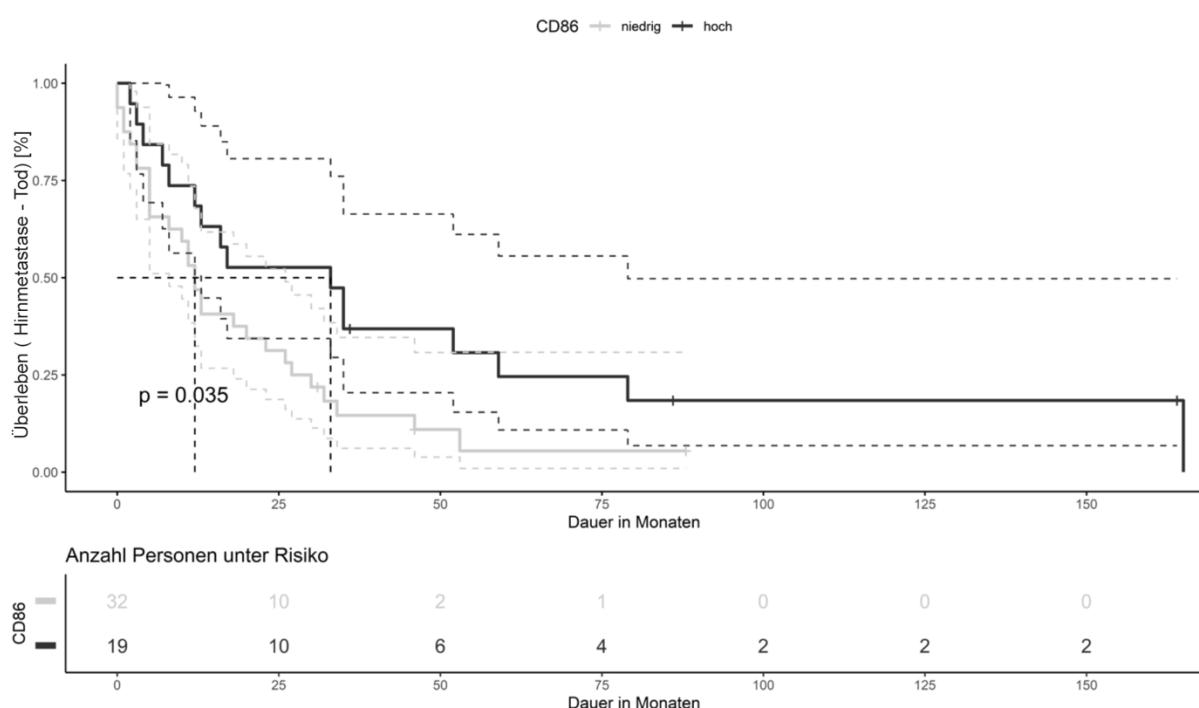
**Tab. 14: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor – Tod) für CD86.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

|                         | Median   |               |              | n  | p   |  |  |
|-------------------------|----------|---------------|--------------|----|-----|--|--|
|                         | Schätzer | KI [95%]      |              |    |     |  |  |
|                         |          | Untere Grenze | Obere Grenze |    |     |  |  |
| <b>Tumornest</b>        |          |               |              |    |     |  |  |
| CD86 <sup>niedrig</sup> | 46       | 29            | 143          | 27 | 0,4 |  |  |
| CD86 <sup>hoch</sup>    | 75       | 66            | -            |    |     |  |  |
| <b>Tumorstroma</b>      |          |               |              |    |     |  |  |
| CD86 <sup>niedrig</sup> | 66       | 34            | 143          | 26 | 0,8 |  |  |
| CD86 <sup>hoch</sup>    | 62       | 29            | -            |    |     |  |  |

### 3.4.3 Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod)

Im Anschluss wurde die Auswirkung der CD86-Expression in den cerebralen Metastasen auf das Intervall (Hirnmetastase -Tod) untersucht. Dazu wurde das Kollektiv mittels Median-Split-Methode in die Gruppen CD86<sup>hoch</sup> und CD86<sup>niedrig</sup> eingeteilt. Die Definition des Intervalls entspricht dem Vorgehen bei CD68. Die Signifikanz wurde anhand des Log-Rank-Tests geprüft und das Überlebensintervall mithilfe einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (Abb. 6). Die senkrechten Striche innerhalb der Überlebenskurven entsprechen zensierten Patientinnen.

Der Log-Rank-Test ergab einen signifikanten Einfluss von CD86-positiven Makrophagen auf die Länge des Intervalls zwischen Erstdiagnose der Hirnmetastase und dem Todeszeitpunkt für das Tumornest mit einem p-Wert von 0,035 (Abb. 6 und Tab. 14). Das mediane Intervall (Hirnmetastase – Tod) betrug bei CD86<sup>hoch</sup> im Tumornest 33 Monate, während es bei einer niedrigen Expression nur 12 Monate betrug. Für das Tumorstroma der Hirnmetastasen konnte kein Einfluss von CD86 auf das untersuchte Intervall festgestellt werden ( $p = 0,2$ ; Log-Rank-Test).



**Abb. 15: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für CD86.** A. Kaplan-Meier-Kurve von Patientinnen mit hoher und niedriger Expression von CD86-positiven Makrophagen im TN. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und der p-Wert ist in der linken unteren Ecke im Diagramm dargestellt. Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

**Tab. 15: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für CD86.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025 <sup>111</sup>.

|                         | Median   |               | n            | p        |  |
|-------------------------|----------|---------------|--------------|----------|--|
|                         | Schätzer | KI [95%]      |              |          |  |
|                         |          | Untere Grenze | Obere Grenze |          |  |
| <b>Tumornest</b>        |          |               |              |          |  |
| CD86 <sup>niedrig</sup> | 12       | 8             | 26           |          |  |
| CD86 <sup>hoch</sup>    | 33       | 13            | 79           | 51 0,035 |  |
| <b>Tumorstroma</b>      |          |               |              |          |  |
| CD86 <sup>niedrig</sup> | 15       | 11            | 30           |          |  |
| CD86 <sup>hoch</sup>    | 32       | 12            | -            | 43 0,2   |  |

### 3.4.4 Assoziationen mit klinischen Parametern der Primärtumoren

Um potenzielle Zusammenhänge zwischen CD86-positiven Makrophagen und klinischen Parametern der Primärtumoren zu untersuchen, wurde erneut der exakte Fisher-Test verwendet (Tab. 15).

Der Test ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen der CD86-Expression im Tumornest und dem Grading der Primärtumoren (TN:  $p = 0,018$ ; exakter Fisher-Test). Tumoren mit niedriger Expression von CD86-positiven Makrophagen waren überwiegend mäßig differenziert (G2). Eine hohe Expression von CD86 war hingegen mit einem schlechten Differenzierungsgrad (G3) assoziiert.

**Tab. 16: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Primärtumoren für CD86.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

| Klinische Parameter        | CD86, Tumornest |                    |       | CD86, Tumorstroma |                    |      |
|----------------------------|-----------------|--------------------|-------|-------------------|--------------------|------|
|                            | Hoch,<br>n = 11 | Niedrig,<br>n = 16 | p     | Hoch,<br>n = 9    | Niedrig,<br>n = 17 | p    |
| <b>T-Stadium</b>           |                 |                    | 0,9   |                   |                    | 0,4  |
| 1                          | 2               | 5                  |       | 2                 | 5                  |      |
| 2                          | 4               | 5                  |       | 2                 | 7                  |      |
| 3                          | 2               | 2                  |       | 3                 | 1                  |      |
| 4                          | 2               | 3                  |       | 1                 | 3                  |      |
| Unbekannt                  | 1               | 1                  |       | 1                 | 1                  |      |
| <b>N-Stadium</b>           |                 |                    | 0,4   |                   |                    | 0,2  |
| N0                         | 2               | 6                  |       | 1                 | 7                  |      |
| N+                         | 9               | 10                 |       | 8                 | 10                 |      |
| <b>M-Stadium</b>           |                 |                    | 0,4   |                   |                    | >0,9 |
| M0                         | 8               | 9                  |       | 6                 | 11                 |      |
| M+                         | 3               | 7                  |       | 3                 | 6                  |      |
| <b>Grading</b>             |                 |                    | 0,018 |                   |                    | 0,1  |
| 2                          | 2               | 11                 |       | 2                 | 11                 |      |
| 3                          | 9               | 5                  |       | 7                 | 6                  |      |
| <b>Östrogenrezeptor</b>    |                 |                    | 0,7   |                   |                    | 0,1  |
| Positiv                    | 6               | 10                 |       | 3                 | 12                 |      |
| Negativ                    | 5               | 6                  |       | 6                 | 5                  |      |
| <b>Progesteronrezeptor</b> |                 |                    | 0,7   |                   |                    | 0,1  |
| Positiv                    | 6               | 10                 |       | 3                 | 12                 |      |
| Negativ                    | 5               | 6                  |       | 6                 | 5                  |      |
| <b>HER2/neu</b>            |                 |                    | 0,1   |                   |                    | 0,7  |
| Positiv                    | 6               | 3                  |       | 4                 | 5                  |      |
| Negativ                    | 5               | 13                 |       | 5                 | 12                 |      |
| <b>Neoadjuvante CTX</b>    |                 |                    | 0,7   |                   |                    | 0,4  |
| Ja                         | 5               | 5                  |       | 2                 | 7                  |      |
| Nein                       | 6               | 11                 |       | 7                 | 10                 |      |

### 3.4.5 Assoziationen mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen

Nachfolgend wurde geprüft, ob eine Assoziation zwischen der CD86-Expression in den cerebralen Metastasen und prognostischen Merkmalen besteht. Hierfür wurde ebenfalls der exakte Fisher-Test für die Analyse verwendet und die Ergebnisse in Tabelle 16 veranschaulicht. Für keine der untersuchten Variablen konnte ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

**Tab. 17: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen für CD86.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

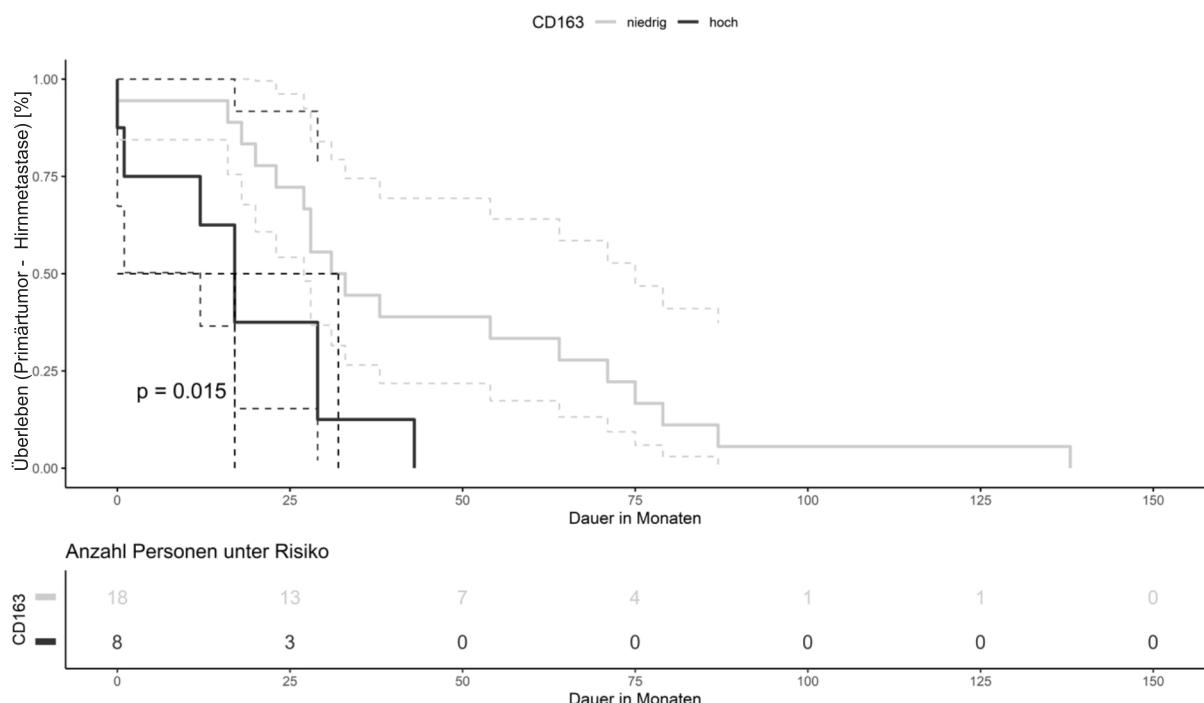
| Klinische Parameter     | Tumornest       |                    | Tumorstroma     |                    | p    |
|-------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|------|
|                         | Hoch,<br>n = 20 | Niedrig,<br>n = 32 | Hoch,<br>n = 15 | Niedrig,<br>n = 29 |      |
| <b>Meningeosis</b>      |                 |                    | 0,13            |                    | 0,6  |
| Ja                      | 1               | 7                  | 1               | 5                  |      |
| Nein                    | 19              | 24                 | 13              | 24                 |      |
| Unbekannt               | 0               | 1                  | 1               | 0                  |      |
| <b>Dexamethason</b>     |                 |                    | 0,4             |                    | 0,2  |
| Ja                      | 9               | 19                 | 6               | 18                 |      |
| Nein                    | 11              | 13                 | 9               | 11                 |      |
| Unbekannt               |                 |                    |                 |                    |      |
| <b>Hirnödem</b>         |                 |                    | 0,8             |                    | 0,4  |
| 1                       | 5               | 7                  | 3               | 8                  |      |
| 2                       | 4               | 9                  | 2               | 8                  |      |
| 3                       | 11              | 14                 | 10              | 12                 |      |
| Unbekannt               | 0               | 2                  | 0               | 1                  |      |
| <b>Anzahl der HM</b>    |                 |                    | 0,6             |                    | 0,1  |
| Solitär                 | 10              | 12                 | 3               | 14                 |      |
| Multiple                | 10              | 19                 | 12              | 15                 |      |
| Unbekannt               | 0               | 1                  |                 |                    |      |
| <b>Präsentation</b>     |                 |                    | 0,2             |                    | 0,3  |
| Synchron                | 0               | 4                  | 0               | 4                  |      |
| Metachron               | 20              | 28                 | 15              | 25                 |      |
| <b>Rezidiv cerebral</b> |                 |                    | 0,7             |                    | >0,9 |
| Ja                      | 4               | 9                  | 3               | 6                  |      |
| Nein                    | 16              | 23                 | 12              | 23                 |      |

## 3.5 CD163

### 3.5.1 Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor- Hirnmetastase)

Um den Einfluss der M2-Makrophagen in den Primärtumoren auf den Zeitraum zwischen Erstdiagnose des Mammakarzinoms bis zum cerebralen Progress zu untersuchen, wurde das Kollektiv erneut anhand der Median-Split-Methode in zwei Gruppen aufgeteilt: CD163<sup>hoch</sup> und CD163<sup>niedrig</sup>. Die Signifikanz wurde durch den Log-Rank-Test geprüft und mittels einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (Abb. 7 und Tab. 17).

Dort zeigte sich ein signifikant verkürztes Intervall (Primärtumor – HM) bei hoher CD163-Expression im Tumorstroma ( $p = 0,015$ ). Im Gegensatz dazu konnte im Tumornest kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,2$ ). Betrachtet man das Tumorstroma beträgt das mediane Intervall zwischen Erstdiagnose des Primärtumors und dem cerebralen Progress bei hoher CD163-Expression 17 Monate und bei geringer Expression 32 Monate. Dies entspricht einem um 46,9% verkürzten Zeitraum bis zur cerebralen Manifestation.



**Abb. 16: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD163.** Kaplan-Meier Kurve von Patientinnen mit hoher und niedriger Expression CD163-positiver Makrophagen für das TS. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und der p-Wert ist in der linken unteren Ecke im Diagramm dargestellt. Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

**Tab. 18: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für CD163.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

|                    | Median   |               |              | n  | p     |  |  |
|--------------------|----------|---------------|--------------|----|-------|--|--|
|                    | Schätzer | KI [95%]      |              |    |       |  |  |
|                    |          | Untere Grenze | Obere Grenze |    |       |  |  |
| <b>Tumornest</b>   |          |               |              |    |       |  |  |
| CD163 niedrig      | 31       | 23            | 75           | 27 | 0,2   |  |  |
| CD163 hoch         | 29       | 12            | -            |    |       |  |  |
| <b>Tumorstroma</b> |          |               |              |    |       |  |  |
| CD163 niedrig      | 32       | 27            | 75           | 26 | 0,015 |  |  |
| CD163 hoch         | 17       | 12            | -            |    |       |  |  |

### 3.5.2 Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor - Tod)

Wie bereits zuvor wurde als nächstes der Einfluss CD163-positiver Makrophagen in den Primärtumoren auf das Gesamtüberleben untersucht. Die Signifikanz wurde durch den Log-Rank-Test geprüft und die Ergebnisse anhand von Kaplan-Meier-Kurven visualisiert (Tab. 18).

Der Test ergab für keine der beiden Tumorregionen innerhalb der Primärtumoren einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben (TN:  $p = > 0,9$ ; TS:  $p = 0,7$ ; Log-Rank-Test). Das mediane Gesamtüberleben war bei CD163<sup>hoch</sup> sowohl im Tumornest als auch im Tumorstroma im Vergleich zu CD163<sup>niedrig</sup> deutlich verkürzt. Dennoch konnte im Log-Rank-Test keine signifikante Beziehung zwischen den beiden Variablen festgestellt werden. Die Breite des Konfidenzintervalls ist auf eine hohe Varianz der Überlebenszeiten sowie die geringe Stichprobengröße zurückzuführen. Daher ist es an dieser Stelle wichtig zu betonen, dass eine fehlende Signifikanz nicht zwangsläufig bedeutet, dass kein Effekt vorliegt. Vielmehr weist es darauf hin, dass die vorliegenden Daten nicht genügen, um eine statistische Signifikanz sicher nachweisen zu können.

**Tab. 19: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor – Tod) für CD163.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

|                    | Median   |               |              | n  | p     |  |  |
|--------------------|----------|---------------|--------------|----|-------|--|--|
|                    | Schätzer | KI [95%]      |              |    |       |  |  |
|                    |          | Untere Grenze | Obere Grenze |    |       |  |  |
| <b>Tumornest</b>   |          |               |              |    |       |  |  |
| CD163 niedrig      | 72       | 34            | 138          | 27 | > 0,9 |  |  |
| CD163 hoch         | 56       | 45            | -            |    |       |  |  |
| <b>Tumorstroma</b> |          |               |              |    |       |  |  |
| CD163 niedrig      | 66       | 45            | 143          | 26 | 0,7   |  |  |
| CD163 hoch         | 38       | 24            | -            |    |       |  |  |

### 3.5.3 Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod)

Anschließend wurde untersucht, wie sich die CD163-Expression in den cerebralen Metastasen auf das Gesamtüberleben auswirkt. Für die Analyse wurde erneut der Log-Rank-Test verwendet und die Resultate in Tabelle 19 dargestellt.

Der Test ergab keinen signifikanten Einfluss von CD163-postiven Makrophagen, weder im Tumornest noch im Tumorstroma, auf die Überlebenszeit zwischen der Erstdiagnose der Hirnmetastase und dem Tod (TN:  $p = 0,6$ ; TS:  $p = 0,9$ ; Log-Rank-Test). Das mediane Gesamtüberleben betrug bei CD163<sup>hoch</sup> für das Tumornest und Tumorstroma jeweils 12 Monate. Bei niedriger Expression hingegen 15 Monate für das Tumornest und 20 Monate für das Tumorstroma.

**Tab. 20: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für CD163.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

|                    | Median   |               | n            | p   |  |
|--------------------|----------|---------------|--------------|-----|--|
|                    | Schätzer | KI [95%]      |              |     |  |
|                    |          | Untere Grenze | Obere Grenze |     |  |
| <b>Tumornest</b>   |          |               |              |     |  |
| CD163 niedrig      | 15       | 12            | 32           | 51  |  |
| CD163 hoch         | 12       | 5             | 0            | 0,6 |  |
| <b>Tumorstroma</b> |          |               |              |     |  |
| CD163 niedrig      | 20       | 13            | 35           | 43  |  |
| CD163 hoch         | 12       | 8             | -            | 0,9 |  |

### 3.5.4 Assoziationen mit klinischen Parametern der Primärtumoren

Zur Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen CD163-positiven Makrophagen und klinischen Parametern der Primärtumoren wurde der exakte Fisher-Test verwendet (Tab. 20).

Es zeigte sich, dass eine hohe Expression von CD163 mit dem Östrogen- sowie Progesteronrezeptorstatus der Primärtumoren signifikant assoziiert ist (TS: jeweils  $p = 0,038$ ; exakter Fisher-Test). Insgesamt wurde beobachtet, dass Patientinnen mit positiven Östrogen- und Progesteronrezeptoren nur in 2 von 15 Fällen eine hohe CD163-Expression aufwiesen. Im Gegensatz dazu war eine hohe Expression von CD163 in 6 von 11 Fällen mit negativen Rezeptoren zu beobachten. Die Ergebnisse legen nahe, dass der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus des Primärtumors einen Einfluss auf das Vorkommen von CD163-positiven Makrophagen hat. Personen mit positiven Rezeptoren weisen tendenziell eine niedrigere Expression von CD163 und umgekehrt. Für die übrigen untersuchten klinischen Merkmale konnten keine signifikanten Assoziationen nachgewiesen werden.

**Tab. 21: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Primärtumoren für CD163.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

| Klinische Parameter        | Tumornest      |                    |      | Tumorstroma    |                    |       |
|----------------------------|----------------|--------------------|------|----------------|--------------------|-------|
|                            | Hoch,<br>n = 8 | Niedrig,<br>n = 19 | p    | Hoch,<br>n = 8 | Niedrig,<br>n = 18 | p     |
| <b>T-Stadium</b>           |                |                    | >0,9 |                |                    | 0,8   |
| 1                          | 2              | 5                  |      | 1              | 6                  |       |
| 2                          | 3              | 6                  |      | 3              | 6                  |       |
| 3                          | 1              | 3                  |      | 1              | 3                  |       |
| 4                          | 1              | 4                  |      | 2              | 2                  |       |
| Unbekannt                  | 1              | 1                  |      | 1              | 1                  |       |
| <b>N-Stadium</b>           |                |                    | 0,4  |                |                    | 0,4   |
| N0                         | 1              | 7                  |      | 1              | 7                  |       |
| N+                         | 7              | 12                 |      | 7              | 11                 |       |
| <b>M-Stadium</b>           |                |                    | >0,9 |                |                    | 0,4   |
| M0                         | 5              | 12                 |      | 4              | 13                 |       |
| M+                         | 3              | 7                  |      | 4              | 5                  |       |
| <b>Grading</b>             |                |                    | >0,9 |                |                    | 0,7   |
| 2                          | 4              | 9                  |      | 3              | 10                 |       |
| 3                          | 4              | 10                 |      | 5              | 8                  |       |
| <b>Östrogenrezeptor</b>    |                |                    | 0,7  |                |                    | 0,038 |
| Positiv                    | 4              | 12                 |      | 2              | 13                 |       |
| Negativ                    | 4              | 7                  |      | 6              | 5                  |       |
| <b>Progesteronrezeptor</b> |                |                    | 0,7  |                |                    | 0,038 |
| Positiv                    | 4              | 12                 |      | 2              | 13                 |       |
| Negativ                    | 4              | 7                  |      | 6              | 5                  |       |
| <b>HER2/neu</b>            |                |                    | >0,9 |                |                    | >0,9  |
| Positiv                    | 3              | 6                  |      | 3              | 6                  |       |
| Negativ                    | 5              | 13                 |      | 5              | 12                 |       |
| <b>Neoadjuvante CTX</b>    |                |                    | >0,9 |                |                    | 0,7   |
| Ja                         | 3              | 7                  |      | 2              | 7                  |       |
| Nein                       | 5              | 12                 |      | 6              | 11                 |       |

### 3.5.5 Assoziationen mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen

Im Anschluss daran wurde geprüft, ob Assoziationen zwischen der CD163-Expression in den Hirnmetastasen und prognostischen Merkmalen bestehen. Hierzu wurde ebenfalls der exakte Fisher-Test verwendet und die Ergebnisse in Tabelle 21 veranschaulicht.

Der Test konnte einen signifikanten Zusammenhang zwischen CD163 und dem Vorhandensein einer Meningeosis carcinomatosa im Tumornest nachweisen (TN:  $p = 0,04$ ; exakter Fisher-Test). Die Ergebnisse ergaben, dass bei allen 8 Fällen mit Meningeosis carcinomatosa im Tumornest eine niedrige CD163-Expression vorlag. In 17 Fällen zeigten Patientinnen ohne Meningeosis ein hohes Vorkommen CD163-positiver Makrophagen, während in 26 Fällen eine niedrige Expression beobachtet wurde.

**Tab. 22: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen für CD163.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

| Klinische Parameter     | Tumornest       |                    | Tumorstoma      |                    | $p$  |
|-------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|------|
|                         | Hoch,<br>n = 17 | Niedrig,<br>n = 35 | Hoch,<br>n = 20 | Niedrig,<br>n = 24 |      |
| <b>Meningeosis</b>      |                 |                    | 0,04            |                    | 0,7  |
| Ja                      | 0               | 8                  | 2               | 4                  |      |
| Nein                    | 17              | 26                 | 18              | 19                 |      |
| Unbekannt               | 0               | 1                  | 0               | 1                  |      |
| <b>Dexamethason</b>     |                 |                    | 0,8             |                    | 0,2  |
| Ja                      | 10              | 18                 | 13              | 11                 |      |
| Nein                    | 7               | 17                 | 7               | 13                 |      |
| Unbekannt               |                 |                    |                 |                    |      |
| <b>Hirnödem</b>         |                 |                    | 0,13            |                    | 0,6  |
| 1                       | 2               | 10                 | 4               | 7                  |      |
| 2                       | 3               | 10                 | 4               | 6                  |      |
| 3                       | 12              | 13                 | 12              | 10                 |      |
| Unbekannt               | 0               | 2                  | 0               | 1                  |      |
| <b>Anzahl der HM</b>    |                 |                    | 0,4             |                    | 0,4  |
| Solitär                 | 9               | 13                 | 6               | 11                 |      |
| Multiple                | 8               | 21                 | 14              | 13                 |      |
| Unbekannt               | 0               | 1                  |                 |                    |      |
| <b>Präsentation</b>     |                 |                    | 0,3             |                    | 0,11 |
| Synchron                | 0               | 4                  | 0               | 4                  |      |
| Metachron               | 17              | 31                 | 20              | 20                 |      |
| <b>Rezidiv cerebral</b> |                 |                    | 0,5             |                    | >0,9 |
| Ja                      | 3               | 10                 | 4               | 5                  |      |
| Nein                    | 14              | 25                 | 16              | 19                 |      |

## 3.6 PD-L1

### 3.6.1 Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen

Zu Beginn wurde untersucht, ob sich die Expression von PD-L1 in den primären Mammakarzinomen und den cerebralen Metastasen voneinander unterscheiden. Hierfür wurde die Expression anhand des CPS in PD-L1-positiv und PD-L1-negativ dichotomisiert und mittels Flussdiagramms für die Subgruppen in Abbildung 8 und Tabelle 22 dargestellt.

Es zeigt sich, dass der PD-L1-Status des Primärtumors nicht zwangsläufig den Status der Hirnmetastase determiniert. Insgesamt konnte eine PD-L1 Expression in 40,7 % der Primärtumoren und in 33,3 % der korrespondierenden Hirnmetastasen nachgewiesen werden ( $CPS \geq 1$ ). Eine diskordante PD-L1-Expression zeigte sich in 7 von 27 Fällen (25,9 %): 4 Fälle wiesen eine positive Expression im Primärtumor und eine negative Expression in der entsprechenden Hirnmetastase auf; 3 Fälle exprimierten kein PD-L1 in Primärtumor, dafür jedoch in der Hirnmetastase.

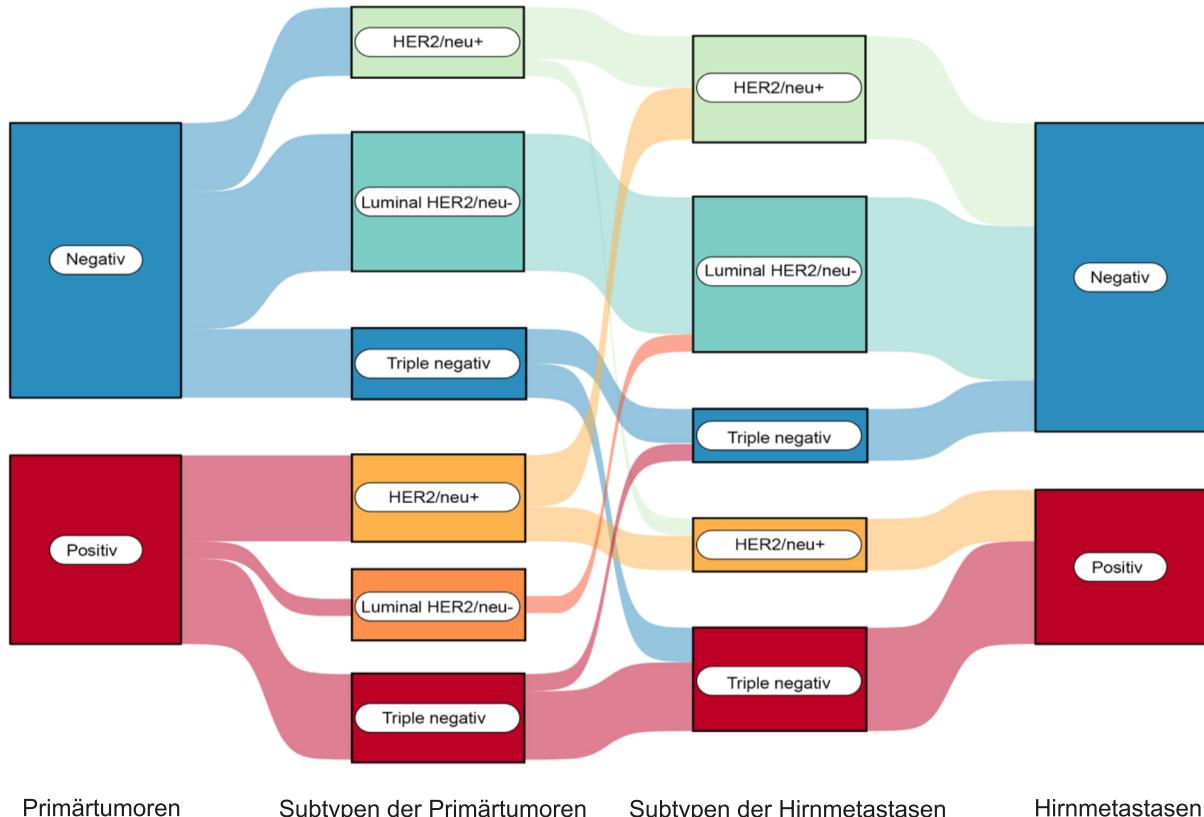


Abb. 17: Flussdiagramm der Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen für PD-L1. Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

**Tab. 23: Ergebnisse der PD-L1-Expression in Primärtumoren und Hirnmetastasen.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

|                   | Primärtumoren |        | Hirnmetastasen |        |        |
|-------------------|---------------|--------|----------------|--------|--------|
|                   | n             | PD-L1+ | PD-L1-         | PD-L1+ | PD-L1- |
| Gesamtheit        | 27            | 11     | 16             | 9      | 18     |
| Triple-negativ    | 9             | 5      | 4              | 6      | 3      |
| Luminal HER2/neu- | 9             | 1      | 8              | 0      | 9      |
| HER2/neu+         | 9             | 5      | 4              | 3      | 6      |

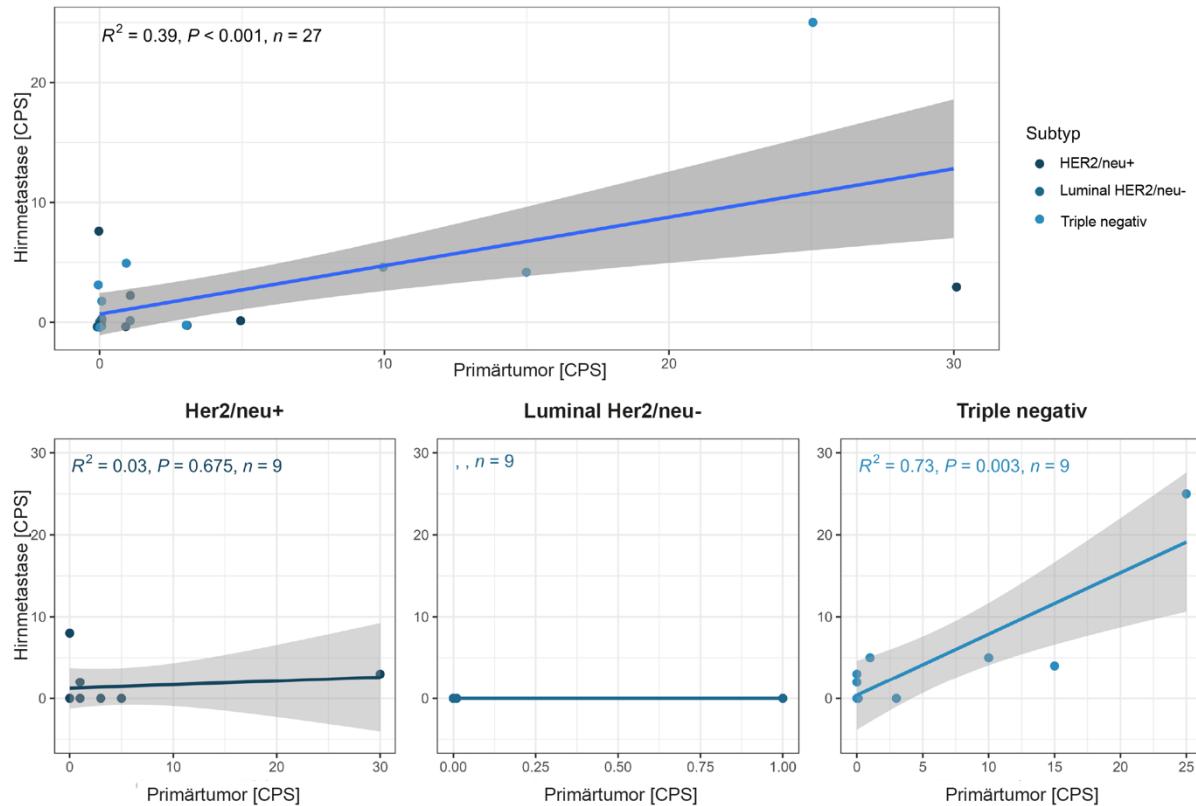
Bei genauerer Betrachtung wird ersichtlich, dass eine positive PD-L1-Expression insbesondere mit den Subgruppen Triple-negativ und HER2/neu+ assoziiert ist. In der Gruppe Luminal HER2/neu- zeigte sich eine positive PD-L1-Expression hingegen nur in einem Fall, während die korrespondierende Hirnmetastase einen negativen PD-L1-Status aufwies. Bei der Untersuchung aller vorliegenden 53 Hirnmetastasen wurde eine positive PD-L1-Expression in 22 Proben nachgewiesen. Die Subgruppenanalyse ergab folgende positive Expressionen: Triple-negativ (10/15), Luminal HER2/neu- (4/19), HER2/neu+ (8/19).

### 3.6.2 Regressionsanalyse der PD-L1-Expression

Anschließend wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt, um den Einfluss der PD-L1-Expression im Primärtumor auf den Status der Hirnmetastase zu überprüfen. Dabei wurde der CPS im Primärtumor als unabhängige Variable (x) und der CPS in der Hirnmetastase als abhängige Variable (y) betrachtet. Zunächst wurde das Gesamtkollektiv und anschließend die Subgruppen betrachtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

Aus dem Bestimmtheitsgrad  $R^2$  für das Gesamtkollektiv lässt sich ableiten, dass etwa 39 % der Variation im CPS der Hirnmetastasen durch die Variation des CPS in den Primärtumoren erklärbar sind. Dies impliziert, dass die Regressionslinie nicht alle Schwankungen des CPS der Hirnmetastasen erklären kann und der CPS in der cerebralen Metastase nicht zwangsläufig durch den CPS des Primärtumors determiniert wird. Das Signifikanzniveau ( $p < 0,001$ ) weist auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den CPS-Werten in den Primärtumoren und Hirnmetastasen hin. Bei separater Betrachtung der Subgruppen wurde

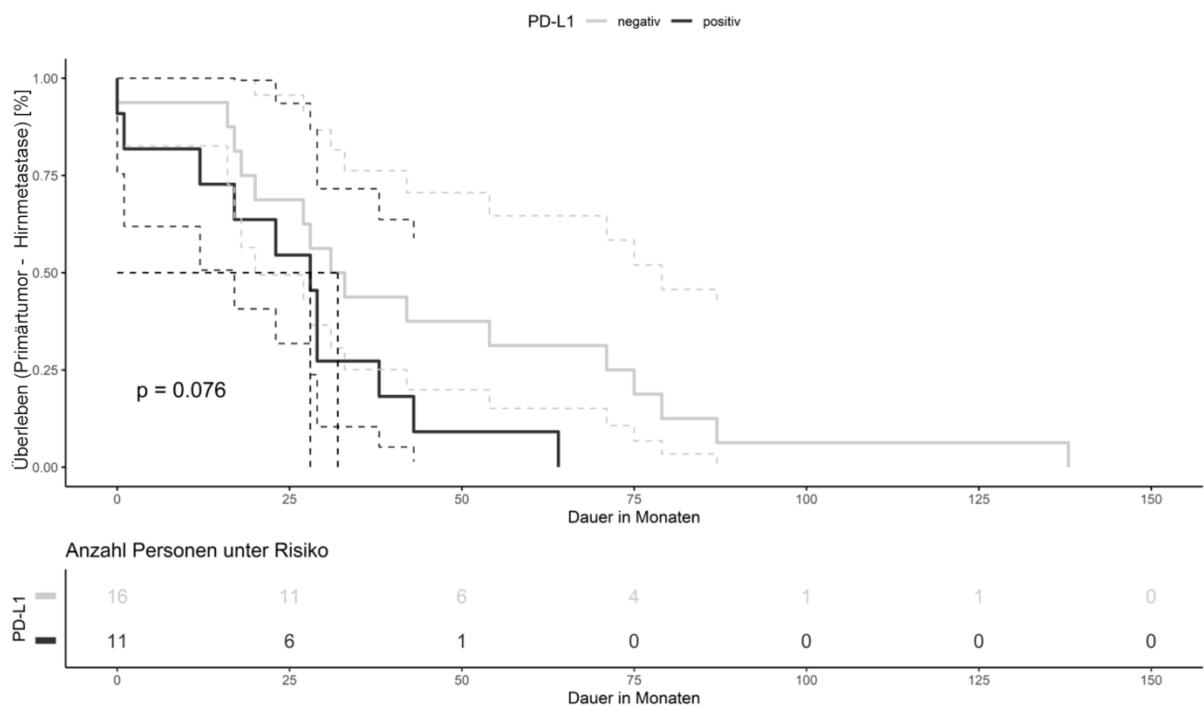
deutlich, dass dieser Zusammenhang lediglich durch die korrelierte PD-L1-Expression der TNBC ( $R^2 = 0,73$ ;  $p = 0,003$ ) und HER2/neu+-Tumore ( $R^2 = 0,03$ ;  $p = 0,675$ ) zustande kam. Eine PD-L1-Expression bei Patientinnen vom Typ Luminal HER2/neu- war insgesamt kaum gegeben



**Abb. 18: Korrelation der PD-L1-Expression zwischen Primärtumor und Hirnmetastase.** Die Graphen zeigen Streudiagramme und entsprechende Regressionsgeraden zur Darstellung eines linearen Zusammenhangs. Das obere Streudiagramm stellt den Zusammenhang des Gesamtkollektivs dar. In den unteren drei Diagrammen werden die Subgruppen HER2/neu+, Luminal HER2/neu- und Triple-negativ betrachtet. Die Stärke der Korrelation ist durch den Bestimmtheitsgrad ( $R^2$ ) repräsentiert. Dieser ist gemeinsam mit dem p-Wert und der Fallzahl (n) in der oberen linken Ecke der Diagramme dargestellt. Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

### 3.6.3 Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase)

Anschließend wurde der Einfluss der PD-L1-Expression auf die Länge des Zeitraums zwischen Erstdiagnose des Primärtumors und dem cerebralen Progress untersucht. Die Untersuchung erfolgte wie zuvor an Gewebeproben der Primärtumoren. Dazu wurde das Kollektiv in die Gruppen PD-L1<sup>positiv</sup> und PD-L1<sup>negativ</sup> gespalten. Für den CPS wurde ein Cut-Off-Wert von  $\geq 1$  definiert. Die Signifikanz wurde mittels Log-Rank-Test geprüft und das Ergebnis mittels Kaplan-Meier-Kurven verbildlicht (Abb. 10 und Tab. 23).



**Abb 19: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) für PD-L1.** Kaplan-Meier Kurve von Patientinnen mit hoher und niedriger PD-L1-Expression. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und der p-Wert ist in der linken unteren Ecke im Diagramm dargestellt. Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

**Tab. 24: Univariatanalyse des Intervalls (Primärtumor– Hirnmetastase) für PD-L1.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

|        | Median   |               | n            | p     |  |
|--------|----------|---------------|--------------|-------|--|
|        | Schätzer | KI [95%]      |              |       |  |
|        |          | Untere Grenze | Obere Grenze |       |  |
| PD-L1+ | 28       | 17            | -            |       |  |
| PD-L1- | 32       | 20            | 79           | 0,076 |  |

Das Ergebnis des Log-Rank-Test mit einem p-Wert von 0,076 zeigte, dass der Einfluss von PD-L1 auf die Länge des Intervalls (Primärtumor – Hirnmetastase) tendenziell signifikant sein könnte, jedoch bei dem hier festgelegten Signifikanzniveau von 0,05 keine statistische Signifikanz erreichte. Dennoch legt das Ergebnis nahe, dass bei einer größeren

Stichprobenanzahl möglicherweise signifikante Zusammenhänge gefunden werden könnten. Die cerebrale Metastase trat bei negativem PD-L1-Status nach einer medianen Zeit von 32 Monaten auf, bei positiver PD-L1-Expression im Primärtumor hingegen bereits nach 28 Monaten

### 3.6.4 Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor - Tod)

Anschließend wurde der Einfluss der PD-L1-Expression in den Primärtumoren auf das Gesamtüberleben mittels Log-Rank-Test untersucht und die Ergebnisse in Tabelle 24 dargestellt. Die Definition des Gesamtüberlebens entspricht wie zuvor dem Zeitraum zwischen Erstdiagnose des Primärtumors und dem Tod.

Der Log-Rank-Test zeigte keinen signifikanten Einfluss der PD-L1-Expression der Mammakarzinome auf die Länge des Gesamtüberlebens ( $p = 0,5$ ; Log-Rank-Test). Das mediane Gesamtüberleben betrug bei positiver Expression 58 Monate und bei negativem Status 75 Monate.

**Tab. 25: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens (Primärtumor – Tod) für PD-L1.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

|        | Median   |               |              | n   | p  |  |  |
|--------|----------|---------------|--------------|-----|----|--|--|
|        | Schätzer | KI [95%]      |              |     |    |  |  |
|        |          | Untere Grenze | Obere Grenze |     |    |  |  |
| PD-L1+ | 58       | 29            | -            |     |    |  |  |
| PD-L1- | 75       | 34            | 143          | 0,5 | 27 |  |  |

### 3.6.5 Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod)

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung des PD-L1-Status der Hirnmetastasen auf das Überleben nach stattgefunder Hirnmetastasierung überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 dargestellt.

Im Log-Rank-Test konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ( $p = 0,5$ ; Log-Rank-Test). Hierbei zeigte sich im Vergleich zum Primärtumor ein umgekehrtes Bild. Die mediane Überlebenszeit wies bei positiver Expression eine längere Dauer auf als bei einem negativen PD-L1-Status. Ein möglicher Grund dafür sind zwei Patientinnen, die 154 Monate beziehungsweise 138 Monate nach Erstdiagnose der PD-L1-positiven cerebralen Metastase noch am Leben sind. Aufgrund der Stichprobengröße des Kollektivs könnte es sein, dass diese beiden Ausreißer einen entscheidenden Einfluss auf das Resultat des Log-Rank-Tests haben.

**Tab. 26: Univariatanalyse des Intervalls (Hirnmetastase – Tod) für PD-L1.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

|        | Median   |               | n            | p      |
|--------|----------|---------------|--------------|--------|
|        | Schätzer | KI [95%]      |              |        |
|        |          | Untere Grenze | Obere Grenze |        |
| PD-L1+ | 15       | 11            | 35           |        |
| PD-L1- | 13       | 5             | 34           | 52 0,5 |

### 3.6.6 Assoziationen mit klinischen Parametern der Primärtumoren

Um potenzielle Zusammenhänge zwischen PD-L1 und klinischen Parametern der Primärtumoren zu untersuchen, wurde der exakte Fisher-Test verwendet und die Ergebnisse in Tabelle 26 dargestellt.

Der Test ergab keine signifikanten Assoziationen zwischen der Expression von PD-L1 und klinischen Merkmalen der Primärtumoren.

**Tab. 27: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Primärtumoren für PD-L1.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

| Klinische Parameter        | PD-L1              |                    |      |
|----------------------------|--------------------|--------------------|------|
|                            | Positiv,<br>n = 11 | Negativ,<br>n = 16 | p    |
| <b>T-Stadium</b>           |                    |                    | 0,7  |
| 1                          | 2                  | 5                  |      |
| 2                          | 5                  | 4                  |      |
| 3                          | 1                  | 3                  |      |
| 4                          | 2                  | 3                  |      |
| Unbekannt                  | 1                  | 1                  |      |
| <b>N-Stadium</b>           |                    |                    | 0,4  |
| N0                         | 2                  | 6                  |      |
| N+                         | 9                  | 10                 |      |
| <b>M-Stadium</b>           |                    |                    | >0,9 |
| M0                         | 7                  | 10                 |      |
| M+                         | 4                  | 6                  |      |
| <b>Grading</b>             |                    |                    | 0,7  |
| 2                          | 6                  | 7                  |      |
| 3                          | 5                  | 9                  |      |
| <b>Östrogenrezeptor</b>    |                    |                    | 0,3  |
| Positiv                    | 5                  | 11                 |      |
| Negativ                    | 6                  | 5                  |      |
| <b>Progesteronrezeptor</b> |                    |                    | 0,3  |
| Positiv                    | 5                  | 11                 |      |
| Negativ                    | 6                  | 5                  |      |
| <b>HER2/neu</b>            |                    |                    | 0,4  |
| Positiv                    | 5                  | 4                  |      |
| Negativ                    | 6                  | 12                 |      |
| <b>Neoadjuvante CTX</b>    |                    |                    | 0,7  |
| Ja                         | 5                  | 5                  |      |
| Nein                       | 6                  | 11                 |      |

### 3.6.7 Assoziationen mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen

Danach wurde geprüft, ob eine Assoziation zwischen der PD-L1-Expression in den Hirnmetastasen und prognostischen Merkmalen besteht. Dazu wurde erneut der exakte Fisher-Test verwendet und die Ergebnisse in Tabelle 27 verdeutlicht.

Für keine der untersuchten Variablen konnte ein signifikanter Zusammenhang hinsichtlich des PD-L1-Status nachgewiesen werden.

**Tab. 28: Assoziationsanalyse mit klinischen Parametern der Hirnmetastasen für PD-L1.** Modifiziert nach Zimmer et al. 2025<sup>111</sup>.

| Klinische Parameter     | PD-L1              |                    | p    |
|-------------------------|--------------------|--------------------|------|
|                         | Positiv,<br>n = 22 | Negativ,<br>n = 31 |      |
| <b>Meningeosis</b>      |                    |                    | 0,12 |
| Ja                      | 1                  | 7                  |      |
| Nein                    | 21                 | 23                 |      |
| Unbekannt               | 0                  | 1                  |      |
| <b>Dexamethason</b>     |                    |                    | 0,3  |
| Ja                      | 14                 | 14                 |      |
| Nein                    | 8                  | 16                 |      |
| Unbekannt               | 0                  | 1                  |      |
| <b>Hirnödem</b>         |                    |                    | 0,2  |
| 1                       | 3                  | 10                 |      |
| 2                       | 5                  | 8                  |      |
| 3                       | 14                 | 11                 |      |
| Unbekannt               | 0                  | 2                  |      |
| <b>Anzahl der HM</b>    |                    |                    | 0,6  |
| Solitär                 | 15                 | 14                 |      |
| Multiple                | 7                  | 16                 |      |
| Unbekannt               |                    | 1                  |      |
| <b>Präsentation</b>     |                    |                    | 0,2  |
| Synchron                | 1                  | 3                  |      |
| Metachron               | 21                 | 28                 |      |
| <b>Rezidiv cerebral</b> |                    |                    | 0,3  |
| Ja                      | 7                  | 6                  |      |
| Nein                    | 15                 | 25                 |      |

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.1.1 Expressionsunterschiede zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen

Das Gehirn galt historisch gesehen als immunologisch privilegiertes Organ, in dem eine adaptive Immunantwort und Entzündungsreaktionen streng kontrolliert und begrenzt sind. Zu dieser Vorstellung hat neben der Blut-Hirn-Schranke und dem vermeintlichen Fehlen von Lymphgefäß, maßgeblich die Arbeit von Medawar et al. aus dem Jahr 1948 beigetragen<sup>113, 114</sup>. In dieser Studie wurde Haut erwachsener Kaninchen in Hirngewebe sowie auf die Brust transplantiert. Dabei stellten die Untersucher fest, dass die Transplantate im Gehirn keine adaptive Immunantwort hervorriefen und somit im Gegensatz zur Lokalisation auf der Brust nicht abgestoßen wurden. Im Vergleich dazu wurde die Haut desselben Spenders, wenn sie zuerst peripher und anschließend cerebral transplantiert wurde, ebenso schnell abgestoßen wie an der peripheren Stelle. Daraus schlussfolgerten Medawar et al., dass sich bereits bestehende Immunreaktionen zwar auf das Gehirn ausbreiten können, dieses selbst jedoch tolerogen ist und somit keine entsprechende Immunantwort auf ein allogenes Transplantat aufbauen kann. Diese Entdeckungen trugen zur Entstehung des Konzepts des Gehirns als immunprivilegiertes Organ bei. Zurückgeführt wurden die Beobachtungen auf das vermeintliche Fehlen eines Lymphdrainagesystems und folglich auf eine fehlende afferente Immunität<sup>114</sup>. In den 1980er Jahren wurden erstmals Wege des Antigenaustritts vom Gehirn zu den tiefen cervicalen Lymphknoten entdeckt<sup>115,116</sup>. Eine Forschungsgruppe von Aspelund et al. entdeckte 2015 ein funktionelles Lymphsystem in der Dura mater von Mäusen, welches interstitielle Flüssigkeit sowie Liquor aus dem Subarachnoidalraum absorbiert und über Foramina in der Schädelbasis in die tiefen Halslymphknoten drainiert<sup>117</sup>. Ferner stellt die Blut-Hirn-Schranke als dichteste Endothelbarriere des Körpers eine Herausforderung für den efferenten Arm der Immunität des ZNS dar<sup>113,118</sup>.

Eine weitere Besonderheit der cerebralen Immunität sind gehirnresidente Makrophagen, sogenannte Mikroglia, welche sich aus Vorläuferzellen des Dottersacks entwickeln<sup>119</sup>. Im Gegensatz zu peripheren Makrophagen erneuern sich Mikroglia im Rahmen der Homöostase eigenständig<sup>120</sup>. Nach einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, etwa durch Bestrahlung oder

im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen, können periphere Monozyten jedoch signifikant zum Makrophagenpool des ZNS beitragen<sup>121,122,123</sup>.

Folglich ist das Gehirn zwar nicht immunologisch privilegiert, aber dennoch einzigartig. Vor diesem Hintergrund erscheint ein Vergleich der TAMs im Primärtumor und der korrespondierenden Hirnmetastase folgerichtig.

Für das Gesamtkollektiv konnten im Tumornest in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der Expression der Marker CD68, CD163 und CD86 festgestellt werden. Allerdings zeigte die Subgruppenanalyse eine signifikant höhere Expression von CD86 in den cerebralen Metastasen der luminalen HER2/neu-negativen Tumore (Tab. 6). Im Tumorstroma zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied in der CD68-Expression mit höheren Werten in der Metastase als im Primärtumor. Dieser Expressionsunterschied lässt sich insbesondere den HER2/neu-positiven Tumoren zuordnen (Tab. 6). Ein möglicher Grund für die höhere Expression an Makrophagen in den Hirnmetastasen könnte auf Einwanderung von aus dem Knochenmark stammenden Makrophagen (BMDM) zurückzuführen sein. Die Arbeit von Bowman et al. zeigt, dass neben Mikroglia auch infiltrierende, vom Knochenmark abgeleitete Makrophagen in cerebralen Metastasen vorhanden sind. Zusätzlich haben sie nachgewiesen, dass Mikroglia spezifisch Itga4 (CD49D) unterdrücken, was eine Unterscheidung zwischen BMDM und Mikroglia ermöglicht<sup>122</sup>.

Nach intensiver Recherche wurde eine weitere Studie gefunden, die die Expressionsunterschiede verschiedener Makrophagenmarker zwischen Primärtumoren und Hirnmetastasen untersuchte: Eine Forschungsgruppe um Liu et al. analysierte das Tumormikromilieu von Primärtumoren nicht-kleinzeliger Lungenkarzinomen (NSCLC) und Hirnmetastasen. Mittels immunhistochemischer Analyse prüften sie unter anderem den Einfluss von CD68 und CD163 auf klinische Parameter und Überlebenszeiten. Insgesamt wurden 17 gepaarte Proben aus Primärtumoren des NSCLC und den entsprechenden Hirnmetastasen sowie 45 weitere ungepaarte Hirnmetastasen analysiert. Liu et al. stellten fest, dass sich die Expression von CD68 und CD163 zwischen den Primärtumoren und Hirnmetastasen nicht signifikant unterscheidet. Methodisch unterscheidet sich die Arbeit jedoch hinsichtlich der Quantifizierung der Immunhistochemie: Liu et al. verwendeten zur Quantifizierung der Makrophagen den Durchschnitt der Anzahl aus drei Hot-Spots. Eine Unterteilung zwischen Tumornest und Tumorstroma fand nicht statt. Diese fehlende

Differenzierung zwischen den beiden Tumorkompartimenten könnte ein Grund dafür sein, weshalb Liu et al. keine unterschiedliche Expression von CD68 zwischen Primärtumor und Hirnmetastase feststellen konnten. Zudem unterscheiden sich die Entitäten der analysierten Primärtumoren in dieser Arbeit von denen in der Studie von Liu et al. <sup>124</sup>.

Interessanterweise konnten wir nachweisen, dass der PD-L1-Status des Primärtumors nicht zwangsläufig den Status der Hirnmetastase determiniert (Abb.8 und Tab. 22). In der neuropathologischen Diagnostik wird PD-L1 bei cerebralen Metastasen des Mammakarzinoms nicht standardmäßig untersucht <sup>125</sup>. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass es zu einem Switch der PD-L1-Expression kommen kann. Insgesamt konnte eine PD-L1-Expression in 40,7 % der Primärtumoren und 33,3 % der Hirnmetastasen nachgewiesen werden (CPS  $\geq 1$ ). Eine nicht übereinstimmende PD-L1-Expression zeigte sich in 7/27 Fällen (25,9 %): 4 Fälle zeigten eine positive Expression im Primärtumor und eine negative Expression in der korrespondierenden Hirnmetastase; 3 Fälle exprimierten kein PD-L1 in Primärtumor und dafür jedoch in der Hirnmetastase. Diskordantes Expressionsverhalten zwischen primären Mammakarzinomen und cerebralen Metastasen wiesen auch Chehade et al. im Jahr 2022 nach<sup>126</sup>. Somit stellt sich die Frage, ob man PD-L1 routinemäßig bei Hirnmetastasen mitbestimmen sollte. Derzeit gibt jedoch keine nichtinvasive Methode, um ein Ansprechen cerebraler Metastasen auf eine Immuntherapie vorherzusagen. Im Jahr 2023 untersuchten Brastianos et al. erstmals das Ansprechen von Pembrolizumab auf cerebrale Metastasen, unabhängig von ihrem zugrundeliegenden PD-L1-Status. Es wurden verschiedene Kohorten basierend auf ihrer Tumorentität eingeteilt. Die größte Kohorte stellten Patientinnen mit Mammakarzinom dar (n = 35). Folgende primäre Endpunkte wurden in der Studie definiert: komplettes Ansprechen, partielle Ansprechen und stabile Krankheit. Insgesamt profitierten 42,1 % der Patientinnen von der Therapie, wobei die Ansprechraten bei Mammakarzinomen 37,0 % betrug. Interessanterweise konnte kein Unterschied zwischen den Subtypen festgestellt werden. Einen Nutzen im Sinne einer kompletten oder partiellen Remission konnte allerdings nur bei 8,8 % des Gesamtkollektivs beobachtet werden <sup>127</sup>. Tiezzi et al. postulierten CD86 als potenziellen prognostischen Marker zur Vorhersage des Erfolgs einer Immuntherapie in Mammakarzinomen. Dieser war, neben dem triple-negativen Subtyp, insbesondere mit regulatorischen T-Zellen, T-Gedächtniszellen und zytotoxischen CD8+-T-Zellen assoziiert <sup>128</sup>. In mehreren Tumorentitäten wurde die Wirksamkeit der Immuntherapie bei Hirnmetastasen belegt. Dennoch sprechen nicht alle Patientinnen auf diese Therapieform an, und es ist

notwendig weiter zu evaluieren, welche Gründe dahinterstecken und wie man den Erfolg dieser Therapien besser vorhersagen kann <sup>127</sup>.

#### **4.1.2 Expressionsunterschiede zwischen Tumornest und Tumorstroma**

Entsprechend dieser Arbeit konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass TAMs sowohl im Tumornest als auch im Tumorstroma präsent sind <sup>129,130</sup> Für die Oberflächenmarker CD68, CD163 und CD86 zeigte sich sowohl in den Primärtumoren als auch in den Hirnmetastasen ein signifikant erhöhtes Vorkommen im Tumorstroma (Tab. 5). Dass die überwiegende Mehrheit der TAMs im Stroma ansässig ist, steht im Einklang mit den Ergebnissen von Mahmoud et al. <sup>130</sup>. Ähnliche Untersuchungen ergaben zudem, dass stromale TAMs einen höheren prognostischen Wert haben als solche im Tumornest <sup>129</sup>. Zu diesem Ergebnis kam auch eine Arbeit von Medrek et al. aus dem Jahr 2012: Sie fanden heraus, dass das Vorhandensein von CD68- und CD163-positiven Makrophagen im Tumorstroma, nicht aber im Tumornest, einen unabhängigen schlechten Prognoseparameter in primären Mammakarzinomen darstellt <sup>129</sup>. Im Gegensatz dazu zeigte die Arbeit von Gwak et al., dass ein hohes Vorkommen von CD68-positiven Makrophagen im Tumornest von primären Mammakarzinomen mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Intervall einhergeht <sup>131</sup>. Andererseits korrelierte eine hohe Dichte CD68-positiver Makrophagen im Tumornest mit einer besseren Prognose bei Endometrium- und Magenkarzinomen <sup>132,133</sup>. Bei der Untersuchung der CD163-Expression in Abhängigkeit von der Tumorlokalisierung stellten Fortis et al. fest, dass das progressionsfreie Intervall und das Gesamtüberleben bei Brustkrebskranken mit niedriger CD163-Expression im Tumorzentrum des Primärtumors, aber hoher Expression an den invasiven Rändern verlängert war <sup>134</sup>. Die divergierende Funktion von TAMs in unterschiedlichen Tumorkompartimenten unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Forschung. Ch'ng et al. postulierten, dass TAMs im Tumornest zur hypoxieinduzierten Angiogenese beitragen, während stromale TAMs die Architektur und den Tumorgrad beeinflussen <sup>135</sup>. Leek et al. zeigten, dass hypoxieassoziierte Tumornekrose im Brustkrebs zur Rekrutierung von Makrophagen führt, welche anschließend die Angiogenese induzieren und zu einer schlechteren Tumorprognose beitragen <sup>136</sup>. Somit wäre es denkbar, dass sofern das Tumorwachstum die Blutversorgung überschreitet, die daraus resultierende Hypoxie im Tumornest zur Invasion von intratumoralen TAMs führt <sup>131</sup>. Diese Unterschiede liefern möglicherweise eine Erklärung

dafür, weshalb die untersuchten Parameter in der vorliegenden Arbeit nicht zwingend identisch in beiden Regionen sind.

#### **4.1.3 Einfluss der Ergebnisse auf die Länge des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) und das Gesamtüberleben**

Die Zeitspanne zwischen der Erstdiagnose des Primärtumors und dem Auftreten von Hirnmetastasen sowie das Gesamtüberleben sind wichtige prognostische Parameter. Ein kurzer Zeitraum ist häufig mit einer aggressiven Tumobiologie und einer schnellen Krankheitsprogression vergesellschaftet. In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von CD163 im Tumorstroma und der Länge des Intervalls zwischen Erstdiagnose des Primärtumors und dem cerebralen Progress festgestellt werden (Abb. 7, Tab. 17). Weder für CD68 noch für CD86 und PD-L1 konnte ein nachweisbarer Einfluss auf die Zeitspanne zwischen der Diagnose des Primärtumors und dem Auftreten von Hirnmetastasen festgestellt werden. Ebenso zeigte sich für keinen untersuchten Marker ein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben.

Bei Patientinnen mit hoher Expression von CD163 im Tumorstroma betrug das Intervall (Primärtumor – Hirnmetastase) im Median 17 Monate und bei solchen mit niedriger Expression hingegen 32 Monate (Tab. 17). Das entspricht einem um 46,9 % verkürzten Intervall in der Gruppe CD163<sup>hoch</sup>. Im Einklang mit unseren Ergebnissen ging in mehreren Studien ein hohes Vorkommen von CD163-positiven Makrophagen in Primärtumoren des Mammakarzinoms mit einem früheren Progress einher<sup>137,138</sup>. Im Gegensatz zu Tiainen et al. konnten wir keinen Einfluss von CD163 auf das Gesamtüberleben nachweisen<sup>137</sup>. Unsere Ergebnisse bezüglich des Gesamtüberlebens decken sich wiederum mit denen von Sousa et. al. Dort konnte weiterhin CD163 als unabhängiger prognostischer Faktor für ein kürzeres progressionsfreies Intervall ermittelt werden<sup>139</sup>. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit ausschließlich cerebrale Progresse inkludiert wurden. Lokalrezidive und extrakranielle Metastasen gingen nicht in die Berechnung des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) ein, weshalb dieses auch nicht als progressionsfreies Intervall im klassischen Sinne bezeichnet wird. Vor diesem Hintergrund ist ein Vergleich mit Studien, die das klassische progressionsfreie Intervall untersucht haben, nur eingeschränkt möglich.

Für CD68 besteht basierend auf unseren Daten mit einem p-Wert von 0,077 im Tumorstroma eine gewisse Tendenz, dass das Intervall (Primärtumor - Hirnmetastase) bei einer größeren Stichprobe möglicherweise signifikant wäre. Patientinnen mit hoher CD68-Expression erlitten nach einem medianen Intervall von 23 Monaten einen cerebralen Progress, während solche mit niedriger Expression erst nach 31 Monaten betroffen waren (Abb.5 und Tab. 7). Dementsprechend war das Intervall bei hoher Expression um 25,8 % verkürzt. In mehreren Studien wurde bereits der Einfluss von CD68-positiven Makrophagen auf prognostische Parameter des Mammakarzinoms untersucht <sup>130,137,139</sup>. Mahmoud et al. führten eine Expressionsanalyse durch, um den prognostischen Wert von CD68-positiven Makrophagen in 1322 primären Mammakarzinomen zu untersuchen. Dazu zählten sie Makrophagen in drei Hot-Spot-Areas und addierten die Resultate. Dort zeigte die univariate Überlebensanalyse einen signifikanten Zusammenhang zwischen CD68-positiven Makrophagen und einem kürzeren progressionsfreien Intervall sowie Gesamtüberleben. Dahingegen war die Anzahl an CD68-positiven Makrophagen in der multivariaten Modellanalyse kein unabhängiger prognostischer Marker <sup>130</sup>. Tiainen et al. untermauern die Ergebnisse der univariaten Analyse der Überlebenszeiten <sup>137</sup>. Im Gegensatz dazu konnte im Einklang mit unseren Ergebnissen in der Arbeit von Sousa et al. kein Einfluss von CD68 in der Überlebenszeitanalyse nachgewiesen werden <sup>139</sup>.

Obwohl wir keine signifikanten Auswirkungen von CD86-positiven TAMs auf das Intervall (Primärtumor - Hirnmetastase) feststellen konnten, ist es dennoch erwähnenswert, dass eine hohe Expression in beiden Tumorregionen mit einem längeren Zeitraum bis zur cerebralen Manifestation einher ging (Tab. 12). In der Arbeit von Pinto et al. konnte ein protektiver Einfluss von M1-Makrophagen auf das Rezidiv von kolorektalen Karzinomen nachgewiesen werden. Es ist jedoch anzumerken, dass in ihrer Studie CD80 als Marker für M1-Makrophagen verwendet wurde <sup>140</sup>. Weiterhin konnten wir keinen statistischen Zusammenhang zwischen der Expression von CD86 und dem Gesamtüberleben feststellen (Tab. 13). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen einer Brustkrebsstudie, in welcher ebenfalls kein Einfluss von M1-Makrophagen auf das progressionsfreie Intervall sowie auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden konnte <sup>141</sup>. Dahingegen wurde in einer Studie zu HER2/neu-positiven primären Mammakarzinomen festgestellt, dass eine hohe Dichte von M1-Makrophagen, die mit iNOS markiert wurden, mit einem längeren Gesamtüberleben einherging <sup>142</sup>. Obwohl M1-Makrophagen antitumorale Eigenschaften zugesprochen werden, findet man in der Literatur

diesbezüglich auch gegenteilige Ergebnisse: In einer Brustkrebsstudie war CD86 in der multivariaten Analyse mit einer schlechteren Prognose assoziiert<sup>93,128</sup>.

Für PD-L1 ergab sich bei einem p-Wert von 0,076 ein tendenzieller Zusammenhang zwischen PD-L1 und der Länge des Intervalls (Primärtumor - Hirnmetastase) (Abb. 10, Tab. 23). Dieses wäre bei einer höheren Stichprobengröße möglicherweise signifikant gewesen. Zudem zeigte sich bei den untersuchten Parametern einheitlich, dass eine hohe Expression in den Primärtumoren mit einem kürzeren Intervall (Primärtumor - Hirnmetastase) sowie Gesamtüberleben einherging, jedoch ohne statistische Signifikanz. In einer Arbeit von Qin et al. wurden 870 primäre Mammakarzinome hinsichtlich ihrer PD-L1-Expression untersucht. Sie fanden heraus, dass eine hohe Expression von PD-L1 mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Intervall und Gesamtüberleben korrelierte<sup>143</sup>. Im Einklang mit Qin et al. zeigte eine Metaanalyse, welche 2546 Fälle umfasste, ein verringertes Gesamtüberleben bei primären Mammakarzinomen mit hoher PD-L1-Expression<sup>144</sup>. In der KEYNOTE-522-Zulassungsstudie für den PD-1-Antikörper Pembrolizumab zur Behandlung des TNBC führte die Kombination aus Pembrolizumab und Chemotherapie, gefolgt von Pembrolizumab allein, zu einer um 37 % verringertem Risiko für Progression oder Tod. Grundvoraussetzung für die Therapie ist eine positive Expression von PD-L1 mit einem CPS  $\geq 10$ <sup>60</sup>.

#### 4.1.4 Einfluss der Ergebnisse auf die Länge des Intervalls (Hirnmetastase – Tod)

Das Intervall zwischen der Erstdiagnose einer Hirnmetastase und dem Tod ist ein bedeutender klinischer Parameter, da es als Verlaufsindikator für das metastasenspezifische Überleben fungiert. Dieses Intervall bietet wertvolle Informationen über den Krankheitsverlauf und die Wirksamkeit therapeutischer Maßnahmen. Durch die Erfassung der Zeitspanne zwischen dem Auftreten von Hirnmetastasen und dem Todeszeitpunkt ermöglicht es eine genauere Prognoseeinschätzung und unterstützt die Bewertung der Effektivität neuer Behandlungsmethoden. Zudem kann es als Referenzpunkt in klinischen Studien dienen, um den Nutzen spezifischer Therapien für Patientinnen mit Hirnmetastasen zu untersuchen.

In der Überlebenszeitanalyse konnte für die Marker CD68, CD163 und PD-L1 weder für das Tumornest noch für das Tumorstroma ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit nach stattgefunder Hirnmetastasierung nachgewiesen werden (Tab. 9, 19 und 25). Dies steht teilweise im Einklang mit den Ergebnissen von Liu et al., welche für CD163 in den cerebralen

Metastasen von Lungenkarzinomen ebenfalls keinen Einfluss auf die Überlebenszeit nachweisen konnten. Jedoch zeigte sich in ihrer Arbeit ein signifikant verkürztes Intervall (Hirnmetastase - Tod) bei Patienten mit hoher Expression von CD68 in Hirnmetastasen<sup>124</sup>.

Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit ein signifikant längeres Intervall zwischen Manifestation der Hirnmetastase und dem Todeszeitpunkt für die CD86-Expression im Tumornest der cerebralen Metastasen nachgewiesen werden (Tab. 14). Patientinnen mit hoher Expression im Tumornest der Hirnmetastase hatten ein um 63,6 % verlängertes medianes Überleben. Ähnliche günstige Prognosen wurden für M1-Makrophagen unter anderem auch in Primärtumoren von Melanomen und Lungenkarzinomen berichtet<sup>145 146</sup>. Dennoch findet man in der Literatur diesbezüglich auch gegenteilige Ergebnisse: In einer Brustkrebsstudie war eine hohe Expression von CD86 in Primärtumoren mit einer schlechteren Prognose in der multivariaten Analyse assoziiert.<sup>128</sup> Außerdem wurde CD86 in Low-grade-Gliomen als ungünstiger prognostischer Parameter in der Überlebenszeitanalyse identifiziert<sup>147</sup>. Ebenso korrelierten M1-Makrophagen mit einem kürzeren Gesamtüberleben sowie einem höheren WHO-Grad. Zusätzlich zeigte sich, dass M1-Makrophagen das Ansprechen von IDH-Wildtyp-Glioblastomen auf eine Strahlentherapie beeinträchtigen können<sup>148</sup>.

Die Arbeit von Pukrop et al. liefert Einblicke in eine potenzielle Rolle von TAMs bei der cerebralen Metastasierung und bietet somit eine mögliche Erklärung für deren Einfluss auf die Überlebenszeiten. Mittels in-vitro-Modellen der Hirnmetastasierung haben sie nachgewiesen, dass Mikroglia sich an Tumorzellen anheften und aktiv deren Migration in das Cerebrum fördern. Interessanterweise zeigten diese proinvasiven Mikroglia eine veränderte Morphologie, jedoch keine Polarisation zum M2-Typ<sup>149</sup>.

#### 4.1.5 Ergebnisse und klinische Parameter der Primärtumoren

Im folgenden Abschnitt wird die prognostische Relevanz der Expression von CD68, CD163, CD86 und PD-L1 in Bezug auf klinisch-pathologische Parameter diskutiert:

In der durchgeführten Assoziationsanalyse konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Expression von CD68 und den klinischen Parametern der Primärtumoren nachgewiesen werden (Tab. 10). Im Gegensatz dazu zeigten Mahmoud et al., dass CD68-

positive Makrophagen signifikant mit einem höheren Tumorgrading, negativen Östrogen- und Progesteronrezeptoren, HER2/neu-Überexpression und dem triple-negativen Subtyp assoziiert sind<sup>130</sup>. Tiainen et al. bestätigen den Zusammenhang von CD68 mit HER2/neu-Positivität, negativen Hormonrezeptoren und einer schlechten Tumordifferenzierung<sup>137</sup>. Den Ergebnissen beider Arbeitsgruppen liegen unterschiedliche Methodiken zugrunde. Zudem erfolgte keine Differenzierung zwischen Tumornest und Tumorstroma<sup>130, 137</sup>. Wie zuvor erwähnt, scheinen Makrophagen in diesen beiden Regionen unterschiedliche Funktionen zu übernehmen, weshalb eine Unterscheidung vor diesem Hintergrund wichtig ist<sup>135</sup>. Mahmoud et al. zählten CD68-positive Makrophagen an den drei folgenden Stellen: intratumoral, im angrenzenden Tumorstroma sowie im entfernten Tumorstroma. Die Gesamtzahl der Makrophagen wurde durch die Addition der Zählungen für die drei Kompartimente ermittelt<sup>130</sup>. Im Gegensatz dazu zählten Tiainen et al. Hot-Spots an der Invasionsfront und im Tumorstroma, führten aber ebenfalls keine Differenzierung in der Analyse durch<sup>137</sup>. Die unterschiedlichen Methodiken unterstreichen die Notwendigkeit einer einheitlichen Quantifizierung von Makrophagen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Für den M2-Makrophagenmarker CD163 konnten wir im Einklang mit der Literatur einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer hohen Expression im Tumorstroma und negativen Hormonrezeptoren nachweisen (Tab. 20). Darüber hinaus wurde in mehreren Arbeiten ein Zusammenhang zwischen CD163-positiven Makrophagen und einem höheren T-Stadium, Lymphknotenmetastasen, höherem Grading, hohem Ki-67-Proliferationsstatus sowie HER2/neu-Positivität nachgewiesen<sup>137, 139</sup>.

In der hier vorliegenden Arbeit korrelierten CD86 im Tumornest ebenfalls mit einem höheren Grading (Tab. 15). Diese Tatsache könnte für ungünstige Eigenschaften von CD86 sprechen. In einer Transkriptomanalyse untersuchten Oshi et al. die Rolle von M1-Makrophagen und identifizierten sowohl günstige als auch ungünstige Eigenschaften: Entgegen früheren Studien zeigte sich kein Zusammenhang zwischen M1-TAMs und einem verbesserten Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie oder eine verlängerte Überlebenszeit<sup>141, 150</sup>. Stattdessen zeigte sich eine signifikante Korrelation mit klinisch aggressiven Tumorcharakteristika wie beispielsweise einem höheren Nottingham-Grad und einem erhöhten Ki-67-Proliferationsindex in primären Mammakarzinomen. Daher postulierten sie die Hypothese, dass Tumore mit einem hohen M1-Anteil eine verstärkte Immunaktivität aufweisen, um die Aggressivität des Tumors zu kompensieren. Neben den zu erwartenden Zytokinen wie IFN- $\gamma$  konnte jedoch auch die

Freisetzung von protumoralen TGF- $\beta$  nachgewiesen werden. Außerdem zeigten Tumoren mit einer hohen Anzahl an M1-Makrophagen eine starke Infiltration sowohl günstiger als auch ungünstiger Immunzellen. Insgesamt wiesen M1-TAMs einen signifikant höheren zytologischen Aktivitätswert (CYT) auf, was auf ein günstiges Tumormikromilieu hindeuten könnte. Der CYT setzt sich aus den Mittelwerten der Expression von antitumoralem zytologischen Perforin und proapoptotischen Granzym zusammen, die von zytotoxischen T-Zellen sezerniert werden<sup>141</sup>. Dieser Score wurde in früheren Studien zur Bewertung der Krebsimmunität beschrieben und hohe Werte gingen mit einem längeren Überleben einher<sup>151</sup>. Diese Ergebnisse, sowie der von uns festgestellte Zusammenhang zu hochgradigen Tumoren, spiegeln die hohe Plastizität von Makrophagen wider. Daher werden in neueren Arbeiten zunehmend die Begriffe „M1-ähnliche“ und „M2-ähnliche“ Makrophagen verwendet, da eine einfache Dichotomisierung der Polarisation nicht gerecht zu werden scheint<sup>152</sup>.

Für PD-L1 konnten keine signifikanten Zusammenhänge mit klinischen Parametern der Primärtumoren nachgewiesen werden (Tab. 26). Dennoch zeigte sich bei Betrachtung der Subgruppen, dass eine hohe Expression insbesondere mit triple-negativen Tumoren, aber auch mit HER2/neu-positiven Tumoren korrelierte. Dahingegen konnte im Subtyp Luminal/HER2/neu- nur bei einer Person im Primärtumor eine Expression von PD-L1 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit der Studie von Qin et al. aus dem Jahr 2015<sup>143</sup>. Dort war eine Expression von PD-L1 signifikant mit einem höheren T-Stadium, Invasion von Lymphgefäßen sowie einem schlechteren Grading assoziiert. Ein positiver Östrogen- und Progesteronstatus ging hingegen mit einer niedrigeren Expression von PD-L1 einher. Wie in unserer Studie zeigte sich dort insbesondere bei triple-negativen Brustkrebs eine positive PD-L1 Expression, jedoch ohne statistische Signifikanz<sup>143</sup>.

#### 4.1.6 Ergebnisse und Meningeosis carcinomatosa

Eine Meningeosis carcinomatosa tritt bei 3-8 % aller Krebserkrankungen auf und stellt ein fortgeschrittenes Tumorstadium sowie eine ernsthafte Komplikation dar. Hierbei gelangen die Tumorzellen entweder hämatogen oder durch direkte Infiltration in die Meningen. Anschließend können sie sich im Liquor cerebrospinalis verteilen und siedeln sich häufig in Bereichen mit verringriger Zirkulationsgeschwindigkeit, wie beispielsweise der Cauda equina, der Hippocampusspalte oder den basalen Zisternen, an<sup>153</sup>. Die Prognose der Betroffenen ist

sehr schlecht und beträgt ohne Behandlung nur circa 4-6 Wochen <sup>154</sup>. Die häufigsten ursächlichen Krebsarten sind Melanome, Lungenkarzinome und Brustkrebs <sup>153</sup>.

Wir fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer niedrigen CD68-Expression im Tumornest der Hirnmetastasen und dem Auftreten einer Meningeosis carcinomatosa (Tab. 11). Alle 8 Patientinnen, welche eine Meningeosis erlitten, wiesen eine niedrige Expression von CD68 auf. Bei Betrachtung der Polarisation konnte zudem ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer geringen Expression von CD163 und dem Vorliegen einer Meningosis nachgewiesen werden (Tab. 21). Für CD86 ergab der exakte Fisher-Test zwar kein signifikantes Ergebnis, dennoch wiesen 7 von 8 Fällen eine niedrige Expression auf (Tab. 16). Die Ergebnisse legen entgegen unserer Erwartung nahe, dass ein niedriges Vorkommen von TAMs mit einem höheren Risiko für Meningeosis einhergeht. In einer Arbeit von Kobayashi et al. wurden signifikant mehr Makrophagen in Liquorproben bei Patienten mit soliden Tumoren gefunden als bei solchen ohne Tumor. Zu den soliden Tumoren zählten Medulloblastome, Dysgerminome, neuroendokrine Karzinome, Magenkarzinome, NSCLC und Melanome. Außerdem korrelierte eine hohe Anzahl an Makrophagen in Liquorproben mit dem Vorhandensein atypischer bzw. maligner Zellen. Der Einsatz eines Cut-off-Wertes ermöglichte die zytologische Unterscheidung von tumorpositiven und -negativen Liquorproben anhand der Makrophagenanzahl <sup>155</sup>. In einer Arbeit von Haas et al. wurde eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen sowie deren spezifische Rekrutierung durch chemotaktische Botenstoffe bei karzinomatöser und lymphomatöser Meningeosis nachgewiesen. Nach vorheriger Blockade von CCL-17 und CCL-22 verringerte sich die chemotaktische Wirkung auf T<sub>regs</sub> <sup>156</sup>. Diese migrationsfördernden Cytokine werden unter anderem von TAMs ausgeschüttet, wodurch die Invasion regulatorischer T-Zellen gefördert wird <sup>157</sup>. Hypothetisch betrachtet stellt sich nun die Frage, ob Tumoren im Rahmen der leptomeningealen Metastasierung eine Unterstützung von TAMs erfahren und diese womöglich aktiv aus dem Tumor in den Liquor rekrutieren. Die zugrundeliegende Pathophysiologie geht aus dieser Arbeit nicht hervor und könnte eine spannende Forschungsfrage darstellen. Hierbei könnte insbesondere ein Vergleich der TAMs zwischen der Hirnmetastase und dem korrespondierenden Liquor cerebrospinalis helfen, die Fragestellung weiter zu untersuchen.

#### 4.1.7 Ausblick: TAMs als therapeutisches Ziel in der Krebstherapie

Aufgrund ihrer fördernden Rolle in der Tumorprogression geraten TAMs zunehmend als potenzielle therapeutische Zielstrukturen in den Fokus der Krebstherapie.<sup>158</sup> Es wurden mehrere mögliche Behandlungsansätze in Primärtumoren untersucht, die im Folgenden beschrieben werden:

Liposomale Bisphosphonate wurden in einem in-vivo Melanom-Mausmodell erfolgreich eingesetzt, um eine Transformation von M2- zu M1-Makrophagen zu bewirken<sup>158</sup>. Zudem konnte in Cervixkarzinomen nachgewiesen werden, dass Zoledronat die MMP9 in Makrophagen inhibiert, wodurch die Sekretion von VEGF gehemmt wird und folglich auch die Angiogenese und das Tumorwachstum<sup>48</sup>. Ein weiterer therapeutischer Ansatz erscheint die Beeinflussung und Reduktion des hypoxischen Tumormikromilieus: In Mammakarzinomen konnte gezeigt werden, dass eine Anti-VEGFR-2-Therapie die Durchblutung hypoxischer Tumore fördert und eine Polarisation in Richtung M1-Typ fördert<sup>159</sup>. Weiterhin konnten diesbezüglich positive Ergebnisse durch eine Beeinflussung des HIF-Signalwegs mittels der zugelassenen Medikamente Vorinostat und Topotecan nachgewiesen werden<sup>160 161</sup>.

In mehreren Studien wurden erfolgreich Antagonisten spezifischer Chemokine zur Therapie maligner Tumore sowie TAMs eingesetzt. Die Behandlung immundefizienter Mäuse mit einem CCR2-Antagonisten führte zu einer Unterdrückung der TAM-Infiltration in Speicheldrüsenkarzinomen<sup>162</sup>. Außerdem konnte ein CCR2-Inhibitor die östrogenabhängige Lebermetastasierung von humanen Brustkrebszellen hemmen<sup>163</sup>. Die Kombination der Chemotherapie FOLFIRINOX mit einem CCR2-Antagonisten erhöhte die Anzahl von CD4+ und CD8+-Effektorzellen und reduzierte zugleich die Infiltration von regulatorischen T-Zellen und TAMs in Pankreaskarzinomen<sup>164</sup>. Die Blockade von CSF-1 in Mäusen hemmte die intratumorale Infiltration immunsuppressiver Makrophagen und verbesserte dadurch die Wirksamkeit einer immunbasierten Melanomtherapie<sup>165</sup>. In Lungenkarzinomen führten Celecoxib und IFN- $\gamma$  zu einer Verschiebung der Polarisation zugunsten von M1-Makrophagen<sup>166</sup>. In einem Mausmodell führte IFN- $\gamma$  zu einer Akkumulation von Makrophagen in Gallenblasenkarzinomen, während zugleich die Differenzierung zu M2-Makrophagen gehemmt wurde. Dadurch konnte eine Reduktion von VEGF und folglich der Angiogenese erzielt werden<sup>167</sup>. In vivo Experimente ergaben, dass ein mit Mannose-Polyethylenglykol modifiziertes Liposom, beladen mit Imiquimod und Doxorubicin, Primärtumore sowie Lungenmetastasen wirksam bekämpft und ein Rezidiv nach der Operation verhindert. Während Imiquimod, ein TLR7-Agonist, die Umwandlung von M2- zu M1-TAMs fördert, induziert die

Freisetzung von Doxorubin den immunogenen Zelltod sowie die Reifung dendritischer Zellen<sup>168</sup>. Eine Hemmung des ERK/STAT3-Signals führte zur Reduktion von M2-Makrophagen in Mammakarzinomen und verringerte zudem das Fortschreiten in vitro und in vivo<sup>169</sup>. CD40, ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie wird häufig auf antigenpräsentierenden Zellen, einschließlich TAMs und dendritischen Zellen, exprimiert. Sein Ligand CD40L, wird auf CD4+-Zellen exprimiert<sup>170</sup>. Forschungsergebnisse belegen, dass die Aktivierung von CD40/CD40L zu einer Hochregulierung von MHC-I sowie proinflammatorischen IL-12 führt. Zudem fördert die agonistische Stimulation von CD40 via IFN- $\gamma$  die Polarisation zu M1-Makrophagen. In Mäusen mit Urothelkarzinom führte die Kombination von Antikörpern gegen CD40 und PD-1 zu einem verlängerten Gesamtüberleben<sup>171</sup>.

Während für Primärtumoren bereits einige potenzielle Behandlungsstrategien erforscht wurden, sind Hirnmetastasen bisher weniger in den Fokus der Forschung gerückt:

Die Blockierung von Mikroglia mit Clodronat, einem Bisphosphonat, reduzierte die Invasion von Krebszellen. Durch bakterielles Lipopolysaccharid gelang eine Induktion des M1-Typs und damit einhergehend eine Reduktion der proinvasiven Funktion<sup>149</sup>. Mittels nanopartikelbasierter photothermischer Therapie konnte neben antitumorale Effekten in primären Mammakarzinomen und Hirnmetastasen ebenfalls eine Repolarisation zu M1-Makrophagen erzeugt werden<sup>172</sup>. Die hier beschriebenen Arbeiten verdeutlichen eine Auswahl möglicher Therapieoptionen, welche auf TAMs abzielen. Trotz vielversprechender Ergebnisse bedarf es weiterer Forschung und zuletzt auch großer klinische Studien und diese neuartigen Krebstherapien implementieren zu können.

## 4.2 Diskussion der Methodik

### 4.2.1 Patientinnenkollektiv

Bereits zu Beginn der Arbeit zeigten sich Einschränkungen in der Auswahl geeigneter Patienteninnen. Die Operation der cerebralen Metastase erfolgte stets am Universitätsklinikum Magdeburg, sodass der Zugang zu den Proben problemlos erfolgen konnte. Hingegen fand die Operation des Primärtumors häufig an externen Kliniken statt, wodurch das Akquirieren der Proben deutlich erschwert wurde. Daher konnten 53 Hirnmetastasen nur 27 Primärtumoren zugeordnet werden, wodurch das Kollektiv verkleinert wurde. Ein weiteres Problem stellten die

Gewebeproben selbst dar, welche teilweise nur geringfügig vitale Tumorzellen enthielten oder Einblutungen und große Nekrosezonen aufwiesen. Nicht ausreichende Proben und solche ohne vitale Tumorzellen, wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Datenerhebung wurde durch unvollständige Patientenakten zudem erschwert. Die fehlenden Daten wurden bestmöglich durch Zusammenarbeit mit anderen behandelnden Ärzten und Ärztinnen ergänzt. Aufgrund von Wohnort-, Gynäkologen- oder Krankenhauswechsel konnten nicht von allen Patientinnen die Lebensdaten erhoben werden, weshalb diese bei der Überlebenszeitanalyse zensiert wurden.

#### **4.2.2 Tissue Microarray**

Die Methode des Tissue Microarray stellt eine effiziente und kostengünstige Möglichkeit zur Analyse von Gewebeproben dar. Das liegt daran, dass mehrere Proben auf einem Objektträger analysiert werden können<sup>173</sup>. Mithilfe des verwendeten Arraymold-Kit konnten bis zu 35 Proben auf einem Objektträger platziert werden. Durch die Analyse verschiedener Tumorregionen in den Hirnmetastasen und den entsprechenden Primärtumoren, kam es trotz der vergleichsweisen geringen Kohorte zu einem großen Probenaufkommen. Daher war das TMA in dieser Studie die Methode der Wahl. Trotz einer Vielzahl an Vorteilen hat auch diese Methodik Limitationen: Bereits die Auswahl des zu stanzenden Areals stellt eine Herausforderung und mögliche Fehlerquelle dar<sup>173</sup>. Um sicherzustellen, dass die ausgewählten Bereiche repräsentativ für den Tumor sind, erfolgte die Auswahl nach dem Vier-Augen-Prinzip. Dennoch ist es möglich, dass die Heterogenität der Zellmorphologie, Proteinexpression und das Vorkommen von Makrophagen nur unzureichend abgebildet wurde. In einer Vielzahl von Studien wurde jedoch belegt, dass die Analyse von TMAs und herkömmliche Gewebeschnitten zumeist übereinstimmend sind<sup>173</sup>.

#### **4.2.3 Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie ist eine etablierte Methode zur Analyse von Gewebeproben. Potenzielle Fehlerquellen ergeben sich bei der Auswahl geeigneter Antikörper und der sorgfältigen Durchführung des IHC-Protokolls. Um mögliche Fehlfärbungen zu vermeiden, wurden ausschließlich Antikörper verwendet, die bereits an Paraffingewebe getestet wurden. Anschließend wurden Testfärbungen durchgeführt, um die Spezifität dieser Antikörper zu überprüfen.

#### 4.2.4 Immunreaktiver Score

Die Expressionsniveaus der Marker CD68, CD86 und CD163 wurden semiquantitativ mithilfe eines modifizierten immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner ausgewertet. Der Score berücksichtigt den Prozentsatz positiver Zellen sowie die Intensität der Färbung. Der endgültige IRS ergibt sich aus der Multiplikation dieser beiden Parameter<sup>109</sup>. Die gleiche Methodik wurde auch von Wei et al. in einer Studie zu tumorassoziierten Makrophagen in kolorektalen Karzinomen angewendet, um die Expression von CD68 und CD163 zu quantifizieren. In der Arbeit von Wei et. al wurde festgestellt, dass keine oder nur geringe Mengen an TAMs im Tumornest vorhanden waren<sup>110</sup>. Im Gegensatz dazu haben wir in unserer Untersuchung TAMs im Tumornest identifiziert. Um diese Unterschiede in der Präsenz von TAMs im Tumornest zu quantifizieren, wurde der Reaktivitätsscore entsprechend unserer Methodik angepasst. Diese Modifikation ermöglicht eine präzise Erfassung und Bewertung der TAMs sowohl im Tumornest als auch im Tumorstroma.

Die Quantifizierung tumorassozierter Makrophagen gestaltet sich insgesamt als herausfordernd, da es kein einheitliches und etabliertes Verfahren gibt. Verschiedene Ansätze werden angewendet, darunter Zellzählung, semiquantitative Auswertung, die Verwendung des IRS sowie Flächenberechnungen mittels Fiji/ImageJ<sup>110,131,140</sup>. Zudem erfolgt die Analyse entweder separat für Tumornest und Tumorstroma oder ausschließlich für eine bestimmte Region<sup>130,131</sup>. Diese Vielfalt an Methoden spiegelt die Komplexität und uneinheitliche Quantifizierung tumorassozierter Makrophagen wider. Daher sind der Vergleich und die Interpretation verschiedener Studien untereinander anspruchsvoll.

#### 4.2.5 PD-L1 -Scoring

Zur Auswertung der Expression von PD-L1 haben sich in der klinischen Praxis folgende Scores etabliert, welche bereits in der Methodik dieser Arbeit erläutert wurden (Abb. 3): TPS, CPS und IC-Score<sup>174</sup>. Zur statistischen Auswertung wurde in der vorliegenden Studie der CPS gewählt. Der Combined Positive Score bewertet die Anzahl der PD-L1-positiven Zellen (Tumorzellen, Makrophagen, Lymphozyten) im Verhältnis zu allen vitalen Tumorzellen. Somit stellt der CPS eine Verbindung zwischen TPS und IC-Score dar. Ferner schlägt sich eine PD-L1-Expression durch Makrophagen auch in einem positiven CPS nieder<sup>174</sup>. Ein Problem zeigte sich in der Festlegung des Cut-off-Werts für den CPS. Die Spannweite der Cut-off-Werte unterscheidet sich in Abhängigkeit von der betrachteten Tumorentität sowie Studie<sup>174</sup>. In der

KEYNOTE-522-Zulassungsstudie für den PD-1-Antikörper Pembrolizumab zur Behandlung des triple-negativen Mammakarzinoms wurde ein Cut-off von  $CPS \geq 10$  festgelegt<sup>60 61</sup>. Im Vergleich dazu basiert die Zulassung von Pembrolizumab zur Therapie des Zervixkarzinoms auf einem  $CPS \geq 1$ <sup>175</sup>. Um die Auswirkungen von PD-L1 auf die Überlebenszeiten sowie Zusammenhänge zu klinischen Merkmalen sensitiv nachvollziehen zu können, wurde ein Cut-off-Wert von 1 gewählt. Insgesamt wurden dadurch 11 von 27 Mammakarzinomen sowie 9 korrespondierende Hirnmetastasen als PD-L1-positiv gewertet. Bei einem Cut-off von  $CPS \geq 10$  wären hingegen nur 4 Mammakarzinome und 1 Hirnmetastase positiv zu werten. Durch die Festlegung eines niedrigeren Cut-off-Wertes wäre es möglich, dass Ergebnisse überinterpretiert wurden.

#### 4.2.6 Statistische Auswertung

Die Stichprobengröße des untersuchten Kollektivs ist aus oben genannten Gründen gering, insbesondere bei einer weiteren Unterteilung in die Subtypen. Nach eingehender Literaturrecherche konnte keine weitere Studie identifiziert werden, die die Infiltration von TAMs in Mammakarzinomen und den korrespondierenden Hirnmetastasen vergleichend untersucht hat. Die vorliegenden Ergebnisse können als Basis für zukünftige Studien mit größerer Fallzahl dienen, um eine höhere statistische Power zu erzielen. Aus der deskriptiven Statistik ging hervor, dass die enthaltenen Messwerte nicht normalverteilt sind. Dies wurde in der Analyse durch die Verwendung nicht-parametrischer Tests berücksichtigt. Trotz mehrerer Signifikanzen sollten die statistischen Berechnungen vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl vorsichtig interpretiert werden. Das Ausbleiben signifikanter Ergebnisse könnte einerseits darauf hinweisen, dass keine signifikanten Unterschiede existieren. Andererseits ist es ebenso möglich, dass die Stichprobengröße nicht ausreicht, um bestehende Unterschiede statistisch nachzuweisen.

## 5 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom stellt global die häufigste Krebstodesursache der weiblichen Bevölkerung dar und war zudem im Jahr 2020 das am häufigsten diagnostizierte Malignom weltweit. Im Verlauf der Erkrankung entwickeln viele Betroffene Metastasen, wovon insbesondere Hirnmetastasen die Lebenserwartung stark limitieren. Beim Tumorprogress spielt vor allem das Zusammenspiel zwischen dem Tumor und seiner Mikroumgebung eine entscheidende Rolle. Innerhalb dieser Mikroumgebung stellen TAMs eine wichtige Zellpopulation dar, welche die Invasion, Intravasion, Angiogenese sowie Metastasierungstendenz des Tumors fördern. Über eine Expression von PD-L1 sowie durch die Schaffung eines immunsuppressiven Milieus, können TAMs die Immunevasion des Tumors unterstützen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war ein Vergleich der Infiltration tumorassozierter Makrophagen und der PD-L1-Expression in Primärtumoren von Mammakarzinomen sowie den korrespondierenden Hirnmetastasen. Da das Gehirn immunologisch eine Sonderstellung einnimmt und die therapeutischen Möglichkeiten bei cerebralen Metastasen nach wie vor begrenzt sind, könnten TAMs ein vielversprechendes neues Therapieziel darstellen. Hierfür erfolgte eine immunhistochemische Färbung der Oberflächenproteine CD68, CD86, CD163 und PD-L1 von 27 gepaarten Proben sowie 26 weiteren cerebralen Metastasen.

In den Hirnmetastasen zeigte eine höhere Expression von CD68, während die Expression von CD86 und CD163 vergleichbar blieben. TAMs waren zudem überwiegend im Tumorstroma lokalisiert. In der Überlebenszeitanalyse der Primärtumoren ging eine hohe Expression von CD163 mit einem kürzeren Intervall bis zur Erstdiagnose der Hirnmetastase einher. CD86 war hingegen in den cerebralen Metastasen mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert. Es zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen CD68 und CD163 mit dem Vorliegen einer Meningeosis carcinomatosa. Weiterhin korrelierte CD86 mit einem höheren Grading und CD163 mit hormonrezeptornegativen Tumoren. Eine Expression von PD-L1 konnte insbesondere bei den Subgruppen HER2/neu+ und Triple-negativ in den Primärtumoren und Hirnmetastasen nachgewiesen werden. In der Überlebenszeitanalyse konnte für PD-L1 kein Einfluss ermittelt werden. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die PD-L1-Expression im Primärtumor nicht zwangsläufig den Status der Hirnmetastase determiniert. Damit erweitert die Arbeit das Verständnis von TAMs und PD-L1 in Mammakarzinomen und Hirnmetastasen und kann als Ausgangspunkt für weitere Studien dienen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Wilkinson, L. & Gathani, T. Understanding breast cancer as a global health concern. *Br. J. Radiol.* **95**, 20211033 (2022).
2. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
3. Erdmann, F. & et. al. Krebsregister Robert Koch Institut.
4. Stachs, A., Stubert, J., Reimer, T. & Hartmann, S. Benign Breast Disease in Women. *Dtsch. Ärztebl. Int.* **116**, 565–574 (2019).
5. Myers, E. R. *et al.* Benefits and Harms of Breast Cancer Screening: A Systematic Review. *JAMA* **314**, 1615–1634 (2015).
6. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)- Ständige Kommission Leitlinien. AWMF-Regelwerk „Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“. Langversion 4.4- Juni 2021. Verfügbar: <http://www.awmf.org/leitlinien/awmf-regelwerk.html> (Zugriff am 26.06.23).
7. Hildebrandt, M. G., Naghavi-Behzad, M. & Vogsen, M. A role of FDG-PET/CT for response evaluation in metastatic breast cancer? *Semin. Nucl. Med.* **52**, 520–530 (2022).
8. Lobbezoo, D. J. A. *et al.* Prognosis of metastatic breast cancer: are there differences between patients with de novo and recurrent metastatic breast cancer? *Br. J. Cancer* **112**, 1445–1451 (2015).
9. Perou, C. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–52 (2000).
10. Dunnwald, L. K., Rossing, M. A. & Li, C. I. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res. BCR* **9**, R6 (2007).
11. Ross, J. S. Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2 therapy. *Drug News Perspect.* **22**, 93–106 (2009).
12. Slamon, D. J. *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **344**, 783–792 (2001).
13. Hennigs, A. *et al.* Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study. *BMC Cancer* **16**, 734 (2016).
14. Hudis, C. A. & Gianni, L. Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. *The Oncologist* **16**, 1–11 (2011).
15. Wang, R. *et al.* The Clinicopathological features and survival outcomes of patients with different metastatic sites in stage IV breast cancer. *BMC Cancer* **19**, 1091 (2019).
16. Elkholi, I. E., Lalonde, A., Park, M. & Côté, J.-F. Breast Cancer Metastatic Dormancy and Relapse: An Enigma of Microenvironment(s). *Cancer Res.* **82**, 4497–4510 (2022).
17. Gavrilovic, I. T. & Posner, J. B. Brain metastases: epidemiology and pathophysiology. *J. Neurooncol.* **75**, 5–14 (2005).
18. Gállego Pérez-Larraya, J. & Hildebrand, J. Brain metastases. *Handb. Clin. Neurol.* **121**, 1143–1157 (2014).
19. Sacks, P. & Rahman, M. Epidemiology of Brain Metastases. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **31**, 481–488 (2020).
20. Derkx, S. H. A. E., Van Der Veldt, A. A. M. & Smits, M. Brain metastases: the role of clinical imaging. *Br. J. Radiol.* **95**, 20210944 (2022).
21. Nayak, L., Lee, E. Q. & Wen, P. Y. Epidemiology of Brain Metastases. *Curr. Oncol. Rep.* **14**, 48–54 (2012).
22. Sul, J. & Posner, J. B. Brain Metastases: Epidemiology and Pathophysiology. in *Brain Metastases* (eds. Raizer, J. J. & Abrey, L. E.) 1–21 (Springer US, Boston, MA, 2007).

doi:10.1007/978-0-387-69222-7\_1.

23. Nam, B.-H. *et al.* Breast cancer subtypes and survival in patients with brain metastases. *Breast Cancer Res.* **10**, R20 (2008).
24. Kuksis, M. *et al.* The incidence of brain metastases among patients with metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Neuro-Oncol.* **23**, 894–904 (2021).
25. Darlix, A. *et al.* Impact of breast cancer molecular subtypes on the incidence, kinetics and prognosis of central nervous system metastases in a large multicentre real-life cohort. *Br. J. Cancer* **121**, 991–1000 (2019).
26. A, M. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, (2004).
27. M, M. *et al.* Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **163**, (1999).
28. Rd, S. *et al.* Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, (2005).
29. Classen, A., Lloberas, J. & Celada, A. Macrophage Activation: Classical Vs. Alternative. in *Macrophages and Dendritic Cells: Methods and Protocols* (ed. Reiner, N. E.) 29–43 (Humana Press, Totowa, NJ, 2009). doi:10.1007/978-1-59745-396-7\_3.
30. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
31. T, L. & G, N. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, (2011).
32. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* **176**, 287–292 (1992).
33. Cd, M., K, K., Jm, A., Mj, H. & Am, H. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, (2000).
34. Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **42**, 717–727 (2006).
35. Anderson, N. M. & Simon, M. C. Tumor Microenvironment. *Curr. Biol. CB* **30**, R921 (2020).
36. Li, F. *et al.* Retinoblastoma Inactivation Induces a Protumoral Microenvironment via Enhanced CCL2 Secretion. *Cancer Res.* **79**, 3903–3915 (2019).
37. Stanley, E. R., Guilbert, L. J., Tushinski, R. J. & Bartelmez, S. H. CSF-1—A mononuclear phagocyte lineage-specific hemopoietic growth factor. *J. Cell. Biochem.* **21**, 151–159 (1983).
38. Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G. & Pollard, J. W. Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy. *J. Exp. Med.* **193**, 727–740 (2001).
39. Qin, R. *et al.* Role of chemokines in the crosstalk between tumor and tumor-associated macrophages. *Clin. Exp. Med.* **23**, 1359–1373 (2023).
40. Hinshaw, D. C. & Shevde, L. A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* **79**, 4557 (2019).
41. He, Z. & Zhang, S. Tumor-Associated Macrophages and Their Functional Transformation in the Hypoxic Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
42. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* **23**, 549–555 (2002).
43. Jodele, S., Blavier, L., Yoon, J. M. & DeClerck, Y. A. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 35–43 (2006).

44. Yu, J. *et al.* Tumor-associated macrophages (TAMs) depend on MMP1 for their cancer-promoting role. *Cell Death Discov.* **7**, 343 (2021).
45. Condeelis, J. & Segall, J. E. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 921–930 (2003).
46. Lin, E. Y. & Pollard, J. W. Tumor-Associated Macrophages Press the Angiogenic Switch in Breast Cancer. *Cancer Res.* **67**, 5064–5066 (2007).
47. Hanahan, D., Christofori, G., Naik, P. & Arbeit, J. Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur. J. Cancer* **32**, 2386–2393 (1996).
48. Giraudo, E., Inoue, M. & Hanahan, D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* **114**, 623–633 (2004).
49. Bergers, G. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2**, 737–744 (2000).
50. Leek, R. D. *et al.* Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J. Pathol.* **190**, 430–436 (2000).
51. Schoppmann, S. F. *et al.* Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* **161**, 947–956 (2002).
52. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* **41**, 49–61 (2014).
53. Goswami, S. *et al.* Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res.* **65**, 5278–5283 (2005).
54. Mor, G. *et al.* Macrophages, estrogen and the microenvironment of breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **67**, 403–411 (1998).
55. Travis, R. C. & Key, T. J. Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res. BCR* **5**, 239–247 (2003).
56. Qian, B.-Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
57. Liang, S. C. *et al.* Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2706–2716 (2003).
58. Ohaegbulam, K. C., Assal, A., Lazar-Molnar, E., Yao, Y. & Zang, X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol. Med.* **21**, 24–33 (2015).
59. Lin, C. *et al.* Tumour-associated macrophages-derived CXCL8 determines immune evasion through autonomous PD-L1 expression in gastric cancer. *Gut* **68**, 1764–1773 (2019).
60. European Commission Approves KEYTRUDA® (pembrolizumab) Plus Chemotherapy as Neoadjuvant Treatment, Then Continued as Adjuvant Monotherapy After Surgery for Locally Advanced or Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer at High Risk of Recurrence. *Merck.com* <https://www.merck.com/news/european-commission-approves-keytruda-pembrolizumab-plus-chemotherapy-as-neoadjuvant-treatment-then-continued-as-adjuvant-monotherapy-after-surgery-for-locally-advanced-or-early-stage-triple/>.
61. Schmid, P. *et al.* Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **382**, 810–821 (2020).
62. Beaver, J. A. *et al.* Patients with melanoma treated with an anti-PD-1 antibody beyond RECIST progression: a US Food and Drug Administration pooled analysis. *Lancet Oncol.* **19**, 229–239 (2018).
63. Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A. & Ribas, A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* **168**, 707–723 (2017).
64. Ren, D. *et al.* Predictive biomarkers and mechanisms underlying resistance to

- PD1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy. *Mol. Cancer* **19**, 19 (2020).
65. Dong, L. *et al.* The loss of RNA N6-adenosine methyltransferase Mettl14 in tumor-associated macrophages promotes CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction and tumor growth. *Cancer Cell* **39**, 945–957.e10 (2021).
66. Dimeloe, S. *et al.* Tumor-derived TGF- $\beta$  inhibits mitochondrial respiration to suppress IFN- $\gamma$  production by human CD4<sup>+</sup> T cells. *Sci. Signal.* **12**, eaav3334 (2019).
67. Konkel, J. E. *et al.* Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses. *Immunity* **46**, 660–674 (2017).
68. Prima, V., Kaliberova, L. N., Kaliberov, S., Curiel, D. T. & Kusmartsev, S. COX2/mPGES1/PGE2 pathway regulates PD-L1 expression in tumor-associated macrophages and myeloid-derived suppressor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 1117–1122 (2017).
69. Lines, J. L. *et al.* VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells. *Cancer Res.* **74**, 1924–1932 (2014).
70. Xie, X. *et al.* The Expression Pattern and Clinical Significance of the Immune Checkpoint Regulator VISTA in Human Breast Cancer. *Front. Immunol.* **11**, 563044 (2020).
71. Petty, A. J. *et al.* Hedgehog-induced PD-L1 on tumor-associated macrophages is critical for suppression of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cell function. *JCI Insight* **6**, (2021).
72. Lu, L.-C. *et al.* Increased Expression of Programmed Death-Ligand 1 in Infiltrating Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma Tissues after Sorafenib Treatment. *Liver Cancer* **8**, 110–120 (2019).
73. Bellmunt, J. *et al.* Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells and overall survival in patients with urothelial carcinoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **26**, 812–817 (2015).
74. Gómez, V. *et al.* Breast cancer-associated macrophages promote tumorigenesis by suppressing succinate dehydrogenase in tumor cells. *Sci. Signal.* **13**, eaax4585 (2020).
75. Saito, N. *et al.* Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes. *Am. J. Pathol.* **139**, 1053–1059 (1991).
76. Holness, C. L. & Simmons, D. L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* **81**, 1607–1613 (1993).
77. Movita, D. *et al.* Kupffer cells express a unique combination of phenotypic and functional characteristics compared with splenic and peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 723–733 (2012).
78. Pulford, K. A. *et al.* KP1: a new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *J. Clin. Pathol.* **42**, 414–421 (1989).
79. Ruco, L. P. *et al.* Expression of macrophage-associated antigens in tissues involved by Langerhans' cell histiocytosis (histiocytosis X). *Am. J. Clin. Pathol.* **92**, 273–279 (1989).
80. Gottfried, E. *et al.* Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand. J. Immunol.* **67**, 453–463 (2008).
81. Kunz-Schughart, L. A. *et al.* [The 'classical' macrophage marker CD68 is strongly expressed in primary human fibroblasts]. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **87**, 215–223 (2003).
82. Kunisch, E. *et al.* Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 774–784 (2004).
83. Hameed, A., Hruban, R. H., Gage, W., Pettis, G. & Fox, W. M. Immunohistochemical expression of CD68 antigen in human peripheral blood T cells. *Hum. Pathol.* **25**, 872–876 (1994).
84. Di Vito, A. *et al.* Innate immunity in cardiac myxomas and its pathological and clinical correlations. *Innate Immun.* **24**, 175342591774167 (2017).

85. Pulford, K. A., Sipos, A., Cordell, J. L., Stross, W. P. & Mason, D. Y. Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *Int. Immunol.* **2**, 973–980 (1990).
86. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 557–563 (2011).
87. Song, L., Lee, C. & Schindler, C. Deletion of the murine scavenger receptor CD68. *J. Lipid Res.* **52**, 1542–1550 (2011).
88. Tsukamoto, K. *et al.* Synergically increased expression of CD36, CLA-1 and CD68, but not of SR-A and LOX-1, with the progression to foam cells from macrophages. *J. Atheroscler. Thromb.* **9**, 57–64 (2002).
89. de Beer, M. C., Zhao, Z., Webb, N. R., van der Westhuyzen, D. R. & de Villiers, W. J. S. Lack of a direct role for macrosialin in oxidized LDL metabolism. *J. Lipid Res.* **44**, 674–685 (2003).
90. Zhang, J., Li, S., Liu, F. & Yang, K. Role of CD68 in tumor immunity and prognosis prediction in pan-cancer. *Sci. Rep.* **12**, 7844 (2022).
91. Acuto, O. & Michel, F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 939–951 (2003).
92. Murphy, K. M., Weaver, C., Janeway, C., Travers, P. & Walport, M. *Janeway Immunologie*. (Springer Spektrum, Berlin [Heidelberg], 2018). doi:10.1007/978-3-662-56004-4.
93. Pan, Y., Yu, Y., Wang, X. & Zhang, T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front. Immunol.* **11**, 583084 (2020).
94. Li, W., Katz, B. P. & Spinola, S. M. Haemophilus ducreyi-Induced Interleukin-10 Promotes a Mixed M1 and M2 Activation Program in Human Macrophages. *Infect. Immun.* **80**, 4426–4434 (2012).
95. Linsley, P. S. *et al.* Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* **173**, 721–730 (1991).
96. Linsley, P. S. *et al.* CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* **174**, 561–569 (1991).
97. Hosseini, A., Gharibi, T., Marofi, F., Babaloo, Z. & Baradaran, B. CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. *Int. Immunopharmacol.* **80**, 106221 (2020).
98. Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
99. Onofre, G., Kolácková, M., Jankovicová, K. & Krejsek, J. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **52**, 57–61 (2009).
100. Zwadlo, G., Voegeli, R., Schulze Osthoff, K. & Sorg, C. A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Exp. Cell Biol.* **55**, 295–304 (1987).
101. Kristiansen, M. *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **409**, 198–201 (2001).
102. Abraham, N. G. & Drummond, G. CD163-Mediated Hemoglobin-Heme Uptake Activates Macrophage HO-1, Providing an Antiinflammatory Function. *Circ. Res.* **99**, 911–914 (2006).
103. Van Gorp, H., Delputte, P. L. & Nauwynck, H. J. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol. Immunol.* **47**, 1650–1660 (2010).
104. Hwang, P. K. & Greer, J. Interaction between hemoglobin subunits in the hemoglobin .haptoglobin complex. *J. Biol. Chem.* **255**, 3038–3041 (1980).
105. Philippidis, P. *et al.* Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ. Res.* **94**, 119–126 (2004).

106. Buechler, C. *et al.* Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 97–103 (2000).
107. Komohara, Y. *et al.* AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **54**, 763–771 (2006).
108. Fabriek, B. O. *et al.* The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* **113**, 887–892 (2009).
109. Remmele, W. & Stegner, H. E. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathol.* **8**, 138–140 (1987).
110. Wei, C. *et al.* Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Mol. Cancer* **18**, 64 (2019).
111. Zimmer, Y.N. *et al.* The landscape and clinical impact of tumor-associated macrophages and PD-L1 in primary breast cancers and their brain metastases. *Front. Immunol.* **16**, (2025).
112. Lambertz, N. *et al.* Expression of aquaporin 5 and the AQP5 polymorphism A(-1364)C in association with peritumoral brain edema in meningioma patients. *J. Neurooncol.* **112**, 297–305 (2013).
113. Sampson, J. H., Gunn, M. D., Fecci, P. E. & Ashley, D. M. Brain immunology and immunotherapy in brain tumours. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 12–25 (2020).
114. Medawar, P. B. Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye. *Br. J. Exp. Pathol.* **29**, 58–69 (1948).
115. Bradbury, M. W. & Cole, D. F. The role of the lymphatic system in drainage of cerebrospinal fluid and aqueous humour. *J. Physiol.* **299**, 353–365 (1980).
116. Widner, H. *et al.* Scintigraphic method to quantify the passage from brain parenchyma to the deep cervical lymph nodes in rats. *Eur. J. Nucl. Med.* **13**, 456–461 (1987).
117. Aspelund, A. *et al.* A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J. Exp. Med.* **212**, 991–999 (2015).
118. Daneman, R. & Prat, A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a020412 (2015).
119. Alliot, F., Godin, I. & Pessac, B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **117**, 145–152 (1999).
120. Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W. & Rossi, F. M. V. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* **10**, 1538–1543 (2007).
121. Mildner, A. *et al.* Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat. Neurosci.* **10**, 1544–1553 (2007).
122. Bowman, R. L. *et al.* Macrophage ontogeny underlies differences in tumor-specific education in brain malignancies. *Cell Rep.* **17**, 2445–2459 (2016).
123. Wilhelm, I., Molnár, J., Fazakas, C., Haskó, J. & Krizbai, I. A. Role of the Blood–Brain Barrier in the Formation of Brain Metastases. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1383–1411 (2013).
124. Liu, J.-S. *et al.* Spatial and temporal heterogeneity of tumor immune microenvironment between primary tumor and brain metastases in NSCLC. *BMC Cancer* **24**, 123 (2024).
125. Boman, C. *et al.* Discordance of PD-L1 status between primary and metastatic breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat. Rev.* **99**, 102257 (2021).
126. Chehade, R. *et al.* PD-L1 expression in breast cancer brain metastases. *Neuro-Oncol.*

*Adv.* **4**, vdac154 (2022).

127. Brastianos, P. K. *et al.* Pembrolizumab in brain metastases of diverse histologies: phase 2 trial results. *Nat. Med.* **29**, 1728–1737 (2023).
128. Tiezzi, D. G., Tiezzi, M., Silva, A. R. D., Andrade, J. M. & Pimentel, F. F. CD86 expression may select patients for immune therapy in breast cancer. *Ann. Oncol.* **28**, i13–i14 (2017).
129. Medrek, C., Pontén, F., Jirström, K. & Leandersson, K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* **12**, 306 (2012).
130. Mahmoud, S. M. A. *et al.* Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* **65**, 159–163 (2012).
131. Gwak, J. M., Jang, M. H., Kim, D. I., Seo, A. N. & Park, S. Y. Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. *PLoS One* **10**, e0125728 (2015).
132. Ohno, S. *et al.* The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients. *Anticancer Res.* **23**, 5015–5022 (2003).
133. Ohno, S. *et al.* Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. *Anticancer Res.* **24**, 3335–3342 (2004).
134. Fortis, S. P. *et al.* Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer. *J. Immunother. Cancer* **5**, 39 (2017).
135. Ch'ng, E. S., Tuan Sharif, S. E. & Jaafar, H. In human invasive breast ductal carcinoma, tumor stromal macrophages and tumor nest macrophages have distinct relationships with clinicopathological parameters and tumor angiogenesis. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **462**, 257–267 (2013).
136. Leek, R. D., Landers, R. J., Harris, A. L. & Lewis, C. E. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer* **79**, 991–995 (1999).
137. Tiainen, S. *et al.* High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. *Histopathology* **66**, 873–883 (2015).
138. Klingen, T. A., Chen, Y., Aas, H., Wik, E. & Akslen, L. A. Tumor-associated macrophages are strongly related to vascular invasion, non-luminal subtypes, and interval breast cancer. *Hum. Pathol.* **69**, 72–80 (2017).
139. Sousa, S. *et al.* Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res.* **17**, 101 (2015).
140. Pinto, M. L. *et al.* The Two Faces of Tumor-Associated Macrophages and Their Clinical Significance in Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
141. Oshi, M. *et al.* M1 Macrophage and M1/M2 ratio defined by transcriptomic signatures resemble only part of their conventional clinical characteristics in breast cancer. *Sci. Rep.* **10**, 16554 (2020).
142. Honkanen, T. J. *et al.* Prognostic and predictive role of tumour-associated macrophages in HER2 positive breast cancer. *Sci. Rep.* **9**, 10961 (2019).
143. Qin, T. *et al.* High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer. *Oncotarget* **6**, 33972–33981 (2015).
144. Zhang, M. *et al.* Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 31347–31354 (2017).
145. Cobankent Aytekin, E., Unal, B., Bassorgun, C. I. & Ozkan, O. Clinicopathologic Evaluation of CD80, CD86, and PD-L1 Expressions with Immunohistochemical Methods in Malignant Melanoma Patients. *Turk Patoloji Derg.* **40**, 16–26 (2024).

146. Ma, J. *et al.* The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* **10**, 112 (2010).
147. Qiu, H. *et al.* Integrated Analysis Reveals Prognostic Value and Immune Correlates of CD86 Expression in Lower Grade Glioma. *Front. Oncol.* **11**, 654350 (2021).
148. Zhou, Z. *et al.* Increased M1 Macrophages Infiltration Correlated With Poor Survival Outcomes and Radiation Response in Gliomas. *Dose-Response* **18**, 1559325820964991 (2020).
149. Pukrop, T. *et al.* Microglia promote colonization of brain tissue by breast cancer cells in a Wnt-dependent way. *Glia* **58**, 1477–1489 (2010).
150. von der Lippe Gythfeldt, H. *et al.* Immune phenotype of tumor microenvironment predicts response to bevacizumab in neoadjuvant treatment of ER-positive breast cancer. *Int. J. Cancer* **147**, 2515–2525 (2020).
151. Narayanan, S. *et al.* Cytolytic Activity Score to Assess Anticancer Immunity in Colorectal Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **25**, 2323–2331 (2018).
152. Murray, P. J. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
153. Djukic, M. *et al.* Cerebrospinal fluid abnormalities in meningeosis neoplastica: a retrospective 12-year analysis. *Fluids Barriers CNS* **14**, 7 (2017).
154. Grossman, S. A. & Krabak, M. J. Leptomeningeal carcinomatosis. *Cancer Treat. Rev.* **25**, 103–119 (1999).
155. Kobayashi, S. *et al.* Macrophages in Giemsa-stained cerebrospinal fluid specimens predict carcinomatous meningitis. *Oncol. Lett.* **20**, 352 (2020).
156. Haas, J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells into the CSF in lymphomatous and carcinomatous meningitis. *Blood* **111**, 761–766 (2008).
157. Hefetz-Sela, S. *et al.* Acquisition of an immunosuppressive protumorigenic macrophage phenotype depending on c-Jun phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 17582–17587 (2014).
158. Islam, M. R. *et al.* Pegylated Liposomal Alendronate Biodistribution, Immune Modulation, and Tumor Growth Inhibition in a Murine Melanoma Model. *Biomolecules* **13**, 1309 (2023).
159. Huang, Y. *et al.* Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 17561–17566 (2012).
160. Hutt, D. M., Roth, D. M., Vignaud, H., Cullin, C. & Bouchecareilh, M. The histone deacetylase inhibitor, Vorinostat, represses hypoxia inducible factor 1 alpha expression through translational inhibition. *PLoS One* **9**, e106224 (2014).
161. Rapisarda, A. *et al.* Schedule-dependent inhibition of hypoxia-inducible factor-1alpha protein accumulation, angiogenesis, and tumor growth by topotecan in U251-HRE glioblastoma xenografts. *Cancer Res.* **64**, 6845–6848 (2004).
162. Yang, Z. *et al.* CCL2/CCR2 Axis Promotes the Progression of Salivary Adenoid Cystic Carcinoma via Recruiting and Reprogramming the Tumor-Associated Macrophages. *Front. Oncol.* **9**, 231 (2019).
163. Han, R. *et al.* Estrogen promotes progression of hormone-dependent breast cancer through CCL2-CCR2 axis by upregulation of Twist via PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling. *Sci. Rep.* **8**, 9575 (2018).
164. Nywening, T. M. *et al.* Phase 1b study targeting tumour associated macrophages with CCR2 inhibition plus FOLFIRINOX in locally advanced and borderline resectable pancreatic cancer. *Lancet Oncol.* **17**, 651–662 (2016).
165. Mok, S. *et al.* Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy. *Cancer Res.* **74**, 153–161 (2014).
166. Ren, F. *et al.* Interferon- $\gamma$  and celecoxib inhibit lung-tumor growth through modulating

- M2/M1 macrophage ratio in the tumor microenvironment. *Drug Des. Devel. Ther.* **8**, 1527–1538 (2014).
167. Sun, T. *et al.* Inhibition of tumor angiogenesis by interferon- $\gamma$  by suppression of tumor-associated macrophage differentiation. *Oncol. Res.* **21**, 227–235 (2014).
168. Li, C. *et al.* Repolarizing Tumor-Associated Macrophages and inducing immunogenic cell Death: A targeted liposomal strategy to boost cancer immunotherapy. *Int. J. Pharm.* **651**, 123729 (2024).
169. Mu, X. *et al.* Tumor-derived lactate induces M2 macrophage polarization via the activation of the ERK/STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Cycle* **17**, 428–438 (2018).
170. Kinouchi, M. *et al.* Infiltration of CD40-positive tumor-associated macrophages indicates a favorable prognosis in colorectal cancer patients. *Hepatogastroenterology* **60**, 83–88 (2013).
171. Leblond, M. M. *et al.* CD40 Agonist Restores the Antitumor Efficacy of Anti-PD1 Therapy in Muscle-Invasive Bladder Cancer in an IFN I/II-Mediated Manner. *Cancer Immunol. Res.* **8**, 1180–1192 (2020).
172. Tong, F. *et al.* Hollow copper sulfide nanoparticles carrying ISRIB for the sensitized photothermal therapy of breast cancer and brain metastases through inhibiting stress granule formation and reprogramming tumor-associated macrophages. *Acta Pharm. Sin. B* **13**, 3471–3488 (2023).
173. Kononen, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* **4**, 844–847 (1998).
174. Vranic, S. & Gatalica, Z. PD-L1 testing by immunohistochemistry in immuno-oncology. *Biomol. Biomed.* **23**, 15–25 (2023).
175. Pembrolizumab for Persistent, Recurrent, or Metastatic Cervical Cancer | NEJM. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2112435>.

## **7 Danksagung**

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## 8 Anhang

### 8.1 Materialien

#### Antikörper

| Produkt  | Hersteller     |
|--|----------------|
| CD68 Monoklonal Antibody KP1 IgG                     | Agilent (Dako) |
| CD163 Monoclonal Mouse Antibody IgG                  | BioLegend      |
| CD86 Monoclonal Rabbit Antibody IgG                  | Cell Signaling |
| PD-L1 Monoclonal Mouse Antibody ICH 22C3 pharmDx IgG | Agilent (Dako) |
| Ki-67 Monoclonal Mouse Antibody IgG                  | Cell Signaling |

#### Laborausstattung und Verbrauchsmaterial

| Produkt  | Hersteller                     |
|--|--------------------------------|
| Aperio Versa 8                                 | Leica Biosystems Nussloch GmbH |
| Lichtmikroskop Primo Star                      | Carl Zeiss AG                  |
| Wärmeschrank                                   | Memmert                        |
| Vortex-Genie 2                                 | Thermo Fisher Scientific       |
| Mikrowelle NN-V423M                            | Panasonic                      |
| Pippetten                                      | Thermo Fisher Scientific       |
| Pipettenspitzen                                | Sarstedt AG & Co. KG           |
| Pipettenspitzen                                | Thermo Fisher Scientific       |
| Digitaler Pipettierhelfer S1                   | Thermo Fisher Scientific       |
| HistoCore MULTICUT                             | Leica Biosystems Nussloch GmbH |
| HistoCore Arcadia Einbettssystem               | Leica Biosystems Nussloch GmbH |
| Menzel-Gläser Superfrost Plus                  | Thermo Fisher Scientific       |
| Deckgläser 24x50mm                             | Carl Roth                      |
| Double-Edge Blades PTFE Coated Stainless Steel | Personna                       |
| FEATHER® Microtome Blades S35                  | pfm medical gmbh               |
| Arraymold-Kit E                                | Arraymold                      |

## Software

| Produkt                                      | Hersteller                             |
|--|--|
| Adobe Photoshop 2024                         | Adobe Inc.                             |
| Adobe Illustrator 2024                       | Adobe Inc.                             |
| CGM Medico                                   | CompuGroup Medical SE & Co. KGaA       |
| Image J                                      | Wayne Rasband                          |
| PACS Chilliweb                               | Nexus / Chilli GmbH                    |
| R (Programmiersprache und Statistikprogramm) | R Foundation for Statistical Computing |

## Chemikalien

| Produkt                            | Hersteller               |
|------------------------------------|--------------------------|
| Destilliertes Wasser               | B. Braun                 |
| 2-Propanol, ROTIPURAN >=99,8 %     | Carl Roth                |
| ROTICLEAR für Histologie           | Carl Roth                |
| Tris PUFFERAN >= 99,8%             | Carl Roth                |
| Tween 20                           | Carl Roth                |
| Hämalaun-Lösung sauer nach Mayer   | Carl Roth                |
| Eosin G-Lösung 1% wässrig          | Carl Roth                |
| Mountex Eindeckmedium              | Medite Medical           |
| Ethanol vergällt >=99,8%           | Carl Roth                |
| Antibody Diluent OP Quanto         | Thermo Fisher Scientific |
| Citratpuffer (PT-Module Buffer 1)  | Thermo Fisher Scientific |
| DAB Quanto                         | Thermo Fisher Scientific |
| UltraVison Hydrogen Peroxide Block | Thermo Fisher Scientific |
| UltraVision Protein-Block          | Thermo Fisher Scientific |
| Primary Antibody Amplifier Quanto  | Thermo Fisher Scientific |
| HRP Polymer Quanto                 | Thermo Fisher Scientific |

## 9 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Vergleichende Analyse von tumorassoziierten Makrophagen und PD-L1 in Primärtumoren und Hirnmetastasen des Mammakarzinoms“

in der Klinik für Neurochirurgie

mit Unterstützung durch PD Dr. med. Klaus-Peter Stein

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden. Abbildungen, Inhalte und Tabellen (Originale oder in modifizierter Form) aus der folgenden Publikation wurden als solche gekennzeichnet: The landscape and clinical impact of tumor-associated macrophages and PD-L1 in primary breast cancers and their brain metastases. *Front. Immunol.* 16, (2025).

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 30.05.2025

Yannik Nicola Zimmer

## **10 Darstellung des Bildungsweges**

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.