

**Molekularbiologische Subtypisierung von tripelnegativen
Mammakarzinomen zur Identifikation von Hochrisiko-Patientinnen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von **Carolin Hartung**

Betreuer: **Prof. em. Dr. med. Christoph Thomssen**

Gutachter/Gutachterin:

Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Hartkopf, Tübingen

Prof. Dr. (rer. nat.) Stefan Hüttelmeier

Datum der Verteidigung: 03.12.2025

Referat

Tripelnegative Mammakarzinome (TNBCs) machen 10-15% aller neu diagnostizierten Brustkrebstumoren aus. Die Tumoren exprimieren weder den Östrogen-, Progesteron- noch den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor HER2. Die TNBC-Patientinnen bilden in Hinblick auf die Diagnostik und Prognose eine heterogene Gruppe. Diese Heterogenität kann mittels Histologie, Immunhistochemie, Genexpressionsanalyse oder Mutationsanalyse dargestellt werden. Molekularbiologisch unterscheidet man beim TNBC nach Lehmann et al. sechs Subtypen (TNBCtype-6): Basal-Like 1 und 2 (BL1 und BL2), Mesenchymal (M), Immunomodulatory (IM), Mesenchymal Stem-Like (MSL) und Luminal Androgen Receptor (LAR) (Lehmann et al. 2011). Da der IM-Subtyp hauptsächlich durch Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) und der MSL-Subtyp durch Stromazellen charakterisiert ist, kann die Subtypisierung auch ohne Berücksichtigung des IM- und MSL-Subtyps erfolgen (TNBCtype-4).

Ziel dieser Arbeit ist es, TNBC-Tumoren einer prospektiven Kohorte mittels mRNA-basierter Genexpressionsanalyse zu subtypisieren (TNBCtype-6 und TNBCtype-4) und die Subtypen hinsichtlich klinischer, histopathologischer und biologischer Marker zu vergleichen. Ferner soll herausgestellt werden, ob es eine Assoziation der Subtypen nach Lehmann mit den intrinsischen Typen nach PAM50 gibt (Parker et al. 2009). In einer zweiten Studie soll die Häufigkeit von TILs bei TNBCs bestimmt und ihre Relevanz für die klinische Routine untersucht werden.

Die Verteilung der Subtypen entspricht weitestgehend publizierten Daten: 17% BL1, 13% BL2, 14% M, 4% MSL, 22% IM und 15% LAR. Nach PAM50 waren 88% der TNBC-Tumoren basal-like. Der IM-Subtyp wies die meisten Tumorproben mit > 60% TILs auf, während beim M- und LAR-Subtyp überwiegend Tumorproben mit < 10% TILs gefunden wurden. TNBC-Patientinnen mit dem LAR-Subtyp wiesen das schlechteste Gesamtüberleben auf. Eine pathologische Komplettremission (pCR) wurde bei 48% der TNBC-Patientinnen (n=54) und 25,3% der non-TNBC-Patientinnen (n=146) beobachtet.

Hartung, Carolin: Molekularbiologische Subtypisierung von tripelnegativen Mammakarzinomen zur Identifikation von Hochrisiko-Patientinnen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 31 Seiten, 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung und Zielstellung.....	1
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.2 Einteilung und Therapie des Mammakarzinoms.....	1
1.3 Pathologische Komplettremission (pCR).....	3
1.4 Tripelnegatives Mammakarzinom (TNBC)	3
1.5 Genexpressionsanalysen beim TNBC	6
1.6 Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs)	8
1.7 Zielstellungen	9
2 Diskussion.....	11
2.1 Verteilung der Subtypen nach Lehmann (TNBCtype-6 und TNBCtype-4)	11
2.2 Verteilung der intrinsischen Typen nach PAM50.....	12
2.3 Vergleich klinischer und histopathologischer Parameter	13
2.4 Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs)	15
2.5 Krankheitsverlauf nach TNBCtype-6 und TNBCtype-4.....	17
2.6 pCR-Rate	19
2.7 Fazit.....	20
2.8 Limitationen und Stärken	22
3 Literaturverzeichnis	24
4 Thesen	31
Publikationsteil	
Erklärungen	

Abkürzungsverzeichnis

ADC	Antibody-Drug Conjugates
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.
AR	Androgen Receptor
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BL1	Basal-Like 1
BL2	Basal-Like 2
BLIS	Basal-Like Immune-Suppressed
BLIA	Basal-Like Immune-Activated
BRCA1	Breast Cancer Type 1 Susceptibility Gene
BRCA2	Breast Cancer Type 2 Susceptibility Gene
CBR	Clinical Benefit Rate
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CIS	Carcinoma In Situ
CPS	Combined positive Score
DFS	Disease-Free Survival
DSS	Disease-Specific Survival
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
cDNA	complementary DNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
ER	Östrogenrezeptor
ERBB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
FFPE	Formaline Fixed and Paraffin Embedded
G	Grading
gBRCA1,2	Keimbahn (germline)-Mutation im BRCA1- oder BRCA2-Gen
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HR	Hazard Ratio
HR+	Hormonrezeptor-positiv
HR-	Hormonrezeptor-negativ
IHC	Immunhistochemie
IM	Immunomodulatory
ISH	In Situ-Hybridisierung
Ki-67	Kiel-Antigen Nr. 67
LAR	Luminal Androgen Receptor/ Luminal-AR
LPBC	Lymphocyte-predominant breast cancer

M, MES	Mesenchymal
MSL	Mesenchymal stem-like
NACT	Neoadjuvante Chemotherapie
NST	No Special Type
OR	Odds Ratio
OS	Overall Survival
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PAM	Prediction Analysis of Microarrays
PARP	Poly ADP-Ribose Polymerase
pCR	pathological Complete Response
PD-L1	Programmed cell death ligand-1
PgR	Progesteronrezeptor
PiA	Prognose im Alltag
PR	Progesteronrezeptor
RFI	Recurrence Free Interval
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
STEEP	Standardized Definitions for Efficacy End Points
TILs	Tumor-infiltrating lymphocyte (Tumor-Infiltrierende Lymphozyten)
TNBC	Triple-Negative Breast Cancer
UNS	Unstable

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Das Mammakarzinom

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung in Deutschland und weltweit. Jährlich erkranken rund 70.000 Frauen in Deutschland an Brustkrebs, das entspricht 167,5 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen pro Jahr. Bei weiteren 6.000 Frauen wird ein Carcinoma *in situ* (CIS) diagnostiziert. Jährlich versterben rund 18.000 Frauen an den Folgen von Brustkrebs. Dennoch liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei fast neunzig Prozent. Seit Einführung des Mammographie-Screenings werden viele Brustkrebstumoren bereits in einem frühen Stadium diagnostiziert, wodurch die Sterberate seit Ende der 1990er Jahre kontinuierlich zurückgegangen ist (Ronckers et al. 2023). Die Entstehung von Brustkrebs wird unter anderem mit chromosomalen Veränderungen in Verbindung gebracht, die beispielsweise durch somatische Mutationen verursacht werden. Etwa zehn Prozent der Mammakarzinome sind hereditär bedingt; bei circa fünf Prozent dieser Fälle liegt bei den Patientinnen eine *gBRCA1*- bzw. *gBRCA2*-Mutation vor. Dies führt zu einer Zerstörung endogener Reparaturmechanismen und begünstigt die Krebsentstehung (Roy et al. 2011).

1.2 Einteilung und Therapie des Mammakarzinoms

Die Heterogenität des Mammakarzinoms zeigt sich unter anderem in der möglichen Expression der steroidalen Hormonrezeptoren für Östrogen (ER) und Progesteron (PgR) sowie in der Überexpression des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) bzw. dessen Genamplifikation. Die Bestimmung dieser Marker erfolgt mittels Immunhistochemie (IHC) und für HER2 ggf. in Ergänzung mittels *in-situ*-Hybridisierung (ISH). Über die Bindung der Hormone Östrogen und Progesteron wird das Tumorwachstum stimuliert. Entsprechend der jährlich aktualisierten Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO e.V.) wird ein Tumor als Hormonrezeptor-positiv (HR+) befundet, wenn mindestens 1 % der Tumorzellen Rezeptoren für Östrogen oder Progesteron aufweisen. Als schwach HR+, aber dennoch endokrin sensitiv, werden Tumoren mit 1 % bis 9 % angefärbter Zellen klassifiziert, Hormonrezeptor-negativ (HR-) sind Tumoren mit weniger als 1% angefärbter Tumorzellen (Park-Simon et al. 2024).

Rund 20-30 % der Tumoren exprimieren HER2: einen transmembranösen Rezeptor für eine Tyrosinkinase (Rezeptortyrosinkinase), die das Zellwachstum und die Proliferation

der Tumorzellen anregt. Als HER2-positiv gelten Tumoren, die entweder eine starke HER2-Färbung in der IHC aufweisen (als DAKO 3+ bezeichnet) oder bei denen die IHC zwar schwächer positiv ist (DAKO 2+), die Amplifikation mittels ISH jedoch positiv ausfällt (Wolff et al. 2023). Mammakarzinome können histopathologisch entsprechend der Befundung der Rezeptoren in HR+/HER2-negative, HR-/HER2-positiv, HR+/HER2-positiv oder HR-/HER2-negative (TNBC) Karzinome eingeteilt werden. Obgleich tripelnegative Mammakarzinome per Definition HER2-negativ sind, geben neuere Studien Hinweise darauf, dass 45-55 % aller Brustkrebstumoren (und 16-54 % der TNBC-Tumoren) eine niedrige HER2-Expression aufweisen (HER2-low definiert als DAKO 1+ oder DAKO 2+ und ISH neg.) (vgl. Zhang und Peng 2022; Modi et al. 2022). Von Minckwitz et al. erweiterten die Einteilung des Mammakarzinoms um die Differenzierung der Tumorzellen als Surrogatmarker für die Proliferation und schlagen folgende Einteilung vor: luminal A like (HR+/HER2-, Grading 1 oder 2), luminal B/HER2-negative-like (HR+/HER2-, Grading 3), luminal B/HER2-positiv-like (HR+/HER2+, jedes Grading), HER2-positiv (non-luminal)-like (HR-/HER2+, jedes Grading) sowie TNBC (HR-/HER2-, jedes Grading) (Minckwitz et al. 2012).

Eine weitere Möglichkeit zur Spezifizierung der Einteilung in Untergruppen berücksichtigt den Proliferationsmarker Ki-67 (Kiel-Antigen Nr. 67) (Gerdes et al. 1986). Das Ki-67 Protein wird während der Zellteilung exprimiert und ist entsprechend in Geweben mit hoher Zellteilungsrate (Krebszellen) vermehrt nachweisbar. Das Ki-67 Protein kann zur Prognoseeinschätzung genutzt werden (Brown et al. 1996). Bei der Einteilung wird somit nach luminal A-like (HR+/HER2-, Ki-67 niedrig), luminal B-like (HR+/HER2- oder HER2+, Ki-67 hoch), HER2-enriched (HR-/HER2+) und triple-negative breast cancer (TNBC, HR-/HER2-) unterschieden (Goldhirsch et al. 2011).

Die Bestimmung von Biomarkern ermöglicht zielgerichtete Therapien. Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Diagnose nicht metastasiert sind (sogenanntes frühes Mammakarzinom) und einen Hormonrezeptor-positiven Tumor haben, erhalten neben einer endokrinen Therapie gegebenenfalls GnRH-Agonisten. Patientinnen mit HER2-positiven Tumoren profitieren von einer zielgerichteten Therapie zum Beispiel mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab. Bei Hochrisiko-Patientinnen mit HR-positivem/HER2-negativem Tumor werden CDK-Inhibitoren (cyclin-dependent kinase, z.B. Abemaciclib) eingesetzt. Patientinnen mit *BRC*A-Keimbahnmutationen erhalten zusätzlich einen PARP-Inhibitor (Poly ADP-Ribose Polymerase) (Park-Simon et al. 2024).

1.3 Pathologische Komplettremission (pCR)

Als Alternative zur adjuvanten Therapie, hat sich die Chemotherapie vor der Operation (primär systemisch, neoadjuvant) bewährt. Von einer pathologischen Komplettremission (pCR) wird gesprochen, wenn nach neoadjuvanter Chemotherapie (NACT) kein Tumorgewebe im Resektat mehr nachweisbar ist (Kaufmann et al. 2007). Prognostisch relevant ist die pCR-Rate für Patientinnen mit HER2+- und TNBC-Tumoren, da bei ihnen im Vergleich zu Patientinnen mit luminalem, also Hormonrezeptor-positivem Brustkrebs eine pCR mit einem besseren krankheitsfreien Überleben assoziiert ist (Minckwitz et al. 2012).

Zur Befundung einer pCR werden unterschiedliche Definitionen genutzt. Von Minckwitz et al. haben drei Definitionen beschrieben: Können nach NACT histopathologisch weder Tumorzellen in der Brust, noch in der Axilla detektiert werden, wird die pCR mit „ypT0 ypN0“ definiert. Wird ein In-Situ-Karzinom im Tumorbett nachgewiesen, wird die pCR mit „ypTis ypN0“ definiert. Werden zusätzlich Tumorzellen in der Axilla nachgewiesen, lautet die Klassifikation „ypT0/Tis ypN any“. Die Autorinnen und Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass eine pCR, definiert als „ypT0 ypN0“, im Vergleich zu „ypTis ypN0“ mit einem besseren Krankheitsverlauf assoziiert ist. Patientinnen mit einer pCR gemäß „ypT0/Tis ypN any“ wiesen hingegen ein erhöhtes Rückfallrisiko und das schlechteste Gesamtüberleben auf (Minckwitz et al. 2012).

Da ein gutes Ansprechen auf die Chemotherapie mit einer besseren Prognose assoziiert ist, kann eine inkomplette pathologische Remission gegebenenfalls eine Anpassung der Therapie erforderlich machen. Patientinnen mit Resttumor im Resektat (non-pCR) erhalten nach NACT eine Behandlung mit einer nicht kreuzresistenten Substanz - beim frühen TNBC beispielsweise Capecitabin (Masuda et al. 2017). Bei Vorliegen einer *gBRCA*-Mutation und HER2-Negativität wird zusätzlich ein PARP-Inhibitor (z.B. Olaparib) (Tutt et al. 2021) eingesetzt.

Im Vergleich zu den non-TNBCs (HR+ und/oder HER2+) haben TNBC-Patientinnen vor allem in den ersten drei Jahren nach Primärdiagnose einen deutlich schlechteren Krankheitsverlauf bei non-pCR (Liedtke et al. 2008).

1.4 Tripelnegatives Mammakarzinom (TNBC)

Das tripelnegative Mammakarzinom (HR-/HER2-) macht 10-15 % der neu diagnostizierten Mammakarzinome aus. TNBC-Patientinnen sind häufig jünger, die Tumoren größer und die Tumorzellen schlechter differenziert (G3, high-grade) (Metzger-

Filho et al. 2012). Die meisten tripelnegativen Mammakarzinome wachsen invasiv duktal (histologisch NST: no special type). Etwa 46 % der Patientinnen entwickeln im Verlauf Metastasen im Gehirn oder in viszeralen Organen, die am häufigsten in den ersten drei Jahren nach Diagnosestellung diagnostiziert werden (Lin et al. 2008). Das Gesamtüberleben der TNBC-Patientinnen ist im Vergleich zu den anderen histopathologischen Gruppen des Mammakarzinoms schlechter. Die Sterberate beträgt in den ersten fünf Jahren fast 40 % (Dent et al. 2007).

Tripelnegative Tumoren weisen eine höhere Rate an somatischen und hereditären Mutationen, genetischen Instabilitäten und unterschiedlichen Genexpressionsmustern auf (Shah et al. 2012). Im Rahmen von Therapieempfehlungen für zielgerichtete Therapien werden beim TNBC verschiedene Mutationen untersucht. Neben somatischen Mutationen wie *ERBB2* (Untersuchung auf HER2 Mutationen unabhängig vom HER2-Status) oder *ESR1* (Park-Simon et al. 2024), werden die Tumoren auf Keimbahnmutationen im *BRCA1*-, *BRCA2*- und *PALB2*-Gen (partner and localizer of *BRCA2*) untersucht. In Metaanalysen wurde festgestellt, dass hereditäre *gBRCA*-Mutationen bei TNBC-Patientinnen gehäuft auftreten (Zhang et al. 2015). Bei etwa 15% der TNBC-Patientinnen liegt eine *gBRCA*-Mutation vor. Diese haben durch die Behandlung mit einem PARP-Inhibitor ein besseres Überleben als Patientinnen ohne *gBRCA*-Mutation (Loibl et al. 2018). PARP-Inhibitoren können den programmierten Zelltod von Zellen mit *gBRCA*-Mutation herbeiführen und damit das Rückfallrisiko der Patientinnen senken (Tutt et al. 2021).

Eine weitere Möglichkeit der Differenzierung des TNBCs ist die Bestimmung therapierelevanter Targets (Zielproteine für zielgerichtete Medikamente). Solche Targets sind die Voraussetzung für die Medikamentenentwicklung beim Mammakarzinom. Ein prädiktiver Biomarker ist PD-L1 (Programmed cell death ligand-1), der je nach Studie bei bis zu 45 % (Miles et al. 2021) der lokal fortgeschrittenen (inoperablen) bzw. metastasierten tripelnegativen Mammakarzinome detektiert werden kann. In der metastasierten Situation ist bei hoher Expression von PD-L1 (kombinierter, positiver Score, CPS ≥ 10 %) der Immuncheckpoint-Inhibitor Pembrolizumab hochwirksam und inzwischen Therapiestandard (Cortes et al. 2020). Die AGO empfiehlt für das metastasierte TNBC zur Therapieplanung sowohl die Untersuchung auf eine *gBRCA*-Keimbahnmutation als auch eine Untersuchung der PD-L1-Expression im Tumor (AGO 2024).

Auch Antikörper-Wirkstoffkonjugate (Antibody-Drug Conjugates, ADC) wie Sacituzumab Govitecan sind für TNBC-Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom bei Chemotherapieresistenz Therapiestandard. Dieser ADC konnte im Vergleich zur Standard-Chemotherapie in Phase-III-Studien sowohl eine Verbesserung im progressionsfreien, als auch im Gesamtüberleben zeigen (Bardia et al. 2024).

Ogleich tripelnegative Mammakarzinome per Definition HER2-negativ sind, geben neuere Studien Hinweise darauf, dass 16-54 % der TNBC-Tumoren eine niedrige HER2-Expression aufweisen und per Definition HER2-low sind (vgl. Zhang und Peng 2022; Modi et al. 2022). Wird ein TNBC-Tumor als HER2-low identifiziert, können metastasierte Patientinnen von einer Therapie mit dem ADC Trastuzumab-Deruxtecan profitieren: Das Gesamtüberleben nach Chemotherapie-Vorbehandlung konnte unter Behandlung um sechs Monate verlängert werden (23,4 statt 16,8 Monate) (Modi et al. 2022). Seit Januar 2024 wird die Behandlung von Trastuzumab-Deruxtecan für metastasierte Patientinnen mit inoperablen oder HER2-low-Tumoren, die bereits eine Chemotherapie erhalten haben, von den Krankenkassen übernommen (Gemeinsamer Bundesausschuss 2024).

Eine weitere Therapiemöglichkeit bietet die Hemmung des Androgenrezeptors (AR), der bei etwa 70 % aller Brustkrebstumoren und etwa 25 % der TNBCs nachgewiesen werden kann. Tumoren mit AR zeigen ein langsames Tumorwachstum und sind mit einem besseren Krankheitsverlauf assoziiert (Gasparini et al. 2014). Im Vergleich zu non-TNBCs wird der AR bei TNBCs signifikant seltener exprimiert (OR = 0,07, 95 % KI 0,05 – 0,11, $p < 0,00001$) (Zhang et al. 2015). In einer Studie mit insgesamt dreißig TNBC-Patientinnen mit immunhistochemisch nachweisbarem AR, die mit Abirateronacetat und Prednisolon therapiert wurden, lag die Clinical Benefit Rate (CBR: umfasst sowohl Komplettremission als auch partielle Remission und stable disease) nach sechs Monaten bei 20 % (Bonnetfoi et al. 2016). In einer weiteren Studie mit 78 TNBC-Patientinnen zeigte sich bei guter Therapieverträglichkeit mit dem Antiandrogen Enzalutamid immerhin eine CBR von 33 % (95 % KI 23 % bis 45 %) nach 16 Wochen (Traina et al. 2018). In einer Phase-II-Studie mit insgesamt 424 überwiegend viszeral metastasierten TNBC-Patientinnen konnte der AR bei 12 % der Tumoren immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Hälfte dieser Patientinnen wurde mit Bicalutamid therapiert und zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Clinical Benefit Rate (CBR: beinhaltet sowohl Komplettremission als auch partielle Remission und stable disease) von 19 % (95 % KI 6 %–37 %) nach sechs Monaten (Gucalp et al. 2013).

Der Einsatz des Antiandrogens Bicalutamid ist beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom in der klinischen Routine etabliert (Deutsche Krebsgesellschaft 2024). Auch bei TNBC-Patientinnen mit nachweisbarem AR, die mit Bicalutamid und zusätzlich Paclitaxel nach unzureichendem Ansprechen auf die primäre Chemotherapie behandelt wurden, zeigte sich bei 42 % der Patientinnen ein Therapieansprechen (Lim et al. 2024).

Obwohl es mehrere Studien zur antiandrogenen Therapie beim fortgeschrittenen AR-positiven TNBC gibt, ist die Datenlage für die Anwendung in der klinischen Routine bislang nicht ausreichend.

1.5 Genexpressionsanalysen beim TNBC

Die Untersuchung der Tumoren mittels RNA-Technologien ist seit mehreren Jahrzehnten Forschungsgegenstand. Der nachfolgende Abschnitt soll einen Überblick über die Entwicklungen beim Mammakarzinom allgemein und nachfolgend für das TNBC geben. Der Grundstein im Bereich der Genexpressionsanalysen des Mammakarzinoms wurde 2000 gelegt, als Perou et al. erstmalig die RNA des Tumorgewebes von 42 Brustkrebspatientinnen mittels cDNA-Microarrays untersuchten. Ziel war es herauszufinden, ob sich die Diversität von Mammakarzinomen auch in der RNA-Expression der Brustkrebstumoren widerspiegelt. Die Daten der Genexpressionsanalysen wurden anschließend mit denen von 17 verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien verglichen. Es wurden 1753 Gene identifiziert, deren Expressionsmuster sich deutlich zwischen den Tumoren unterschied. Mit Hilfe von Clusteranalysen konnten die Tumoren in intrinsische Gruppen eingeteilt werden: luminal A, luminal B-like, basal-like, HER2-enriched sowie normal breast/normal-like. Von den nach IHC identifizierten tripelnegativen Tumoren wurden 75 % der intrinsischen basal-like-Gruppe zugeordnet. Eine hohe *ESR1*-Expression (*ESR1*= Gensymbol für den Östrogenrezeptor) korrelierte mit luminalen Tumoren, die als ER-positiv gewertet wurden (Perou et al. 2000; Sørlie et al. 2001).

In Anlehnung an die Ergebnisse von Perou et al. konnten Parker et al. 2009 den Algorithmus für die molekulare Klassifizierung auf 50 Gene (PAM50 - Prediction Analysis of Microarray) mit folgenden fünf intrinsischen Gruppen reduzieren: luminal A, luminal B, HER2-enriched, basal-like und normal-like. Von den nach IHC als ER-positiv befundenen Tumoren waren auf RNA-Ebene 73 % luminal (luminal A oder luminal B), 11 % HER2-enriched, 5 % basal-like und 7 % normal-like. Die ER-negativen Tumoren waren in 11 % der Fälle luminal A oder luminal B, in 32 % HER2-enriched, in 50 %

basal-like und in 7 % normal-like (Parker et al. 2009). Die Klassifizierung anhand histopathologisch bestimmter Biomarker kann als Surrogat für die intrinsische Typisierung genutzt werden, eine hundertprozentige Übereinstimmung gibt es, wie diese Ergebnisse zeigen, aber nicht.

In einer Studie mit 3247 Brustkrebstumoren untersuchten Lehmann et al. 2011 tripelnegative Mammakarzinome (TNBC, n = 587, 18 %). Durch Clusteranalysen konnten die TNBC-Tumoren in sechs molekulare Subtypen eingeteilt werden (TNBCtype-6): Basal-like 1 (BL1), Basal-like 2 (BL2), Immunomodulatory (IM), Mesenchymal (M), Mesenchymal Stem-Like (MSL) und Luminal Androgen Receptor (LAR). Konnte ein Tumor molekularbiologisch keinem der sechs Subtypen sicher zugeordnet werden, wurde er als unstable (UNS) bezeichnet. BL1- und BL2-Tumoren sprechen aufgrund der Überexpression von Genen mit erhöhter Proliferation im Vergleich zu den anderen TNBC-Subtypen besser auf Chemotherapeutika an. Die Patientinnen weisen mit 63 % eine höhere pCR-Rate auf als der MSL- (31 %) oder LAR-Subtyp (14 %) ($p = 0,042$). Sowohl der M- als auch der MSL-Subtyp sind gekennzeichnet durch epithelial-mesenchymales Wachstum und Wachstumsfaktor-Signalwege. Die Patientinnen sprechen besser auf den Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib an, als die anderen Subtypen nach Lehmann. Der IM-Subtyp ist durch eine hohe Expression immunassoziiertes Gene charakterisiert und korreliert mit einer hohen Anzahl an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs). Beim LAR-Subtyp sind Gene des Androgen-Metabolismus hochreguliert, unter anderem der Androgenrezeptor (AR) (Lehmann et al. 2011).

In einer späteren Studie reduzierten Lehmann et al. die sechs molekularen Subtypen (TNBCtype-6) auf eine Klassifizierung in vier molekulare Subtypen (TNBCtype-4): BL1, BL2, M, LAR. Hintergrund war der hohe Anteil an TILs im Gewebe des IM-Subtyps und der hohe Anteil Tumor-assoziiertes Stroma-Zellen beim MSL-Subtyp, die jeweils das Expressionsmuster dominieren (Lehmann et al. 2016). Die Arbeiten von Lehmann und Pietenpol zur molekularen Subtypisierung des TNBCs wurden 2024 beim ASCO-Meeting besonders gewürdigt (ASCO Daily News 2024).

Burstein et al. führten 2015 ebenfalls Cluster-Analysen anhand von RNA-Expressionsprofilen von TNBC-Tumoren (n=198) durch und identifizierten vier stabile Subtypen: Luminal-AR (LAR), Mesenchymal (MES), Basal-like Immune-Suppressed (BLIS) und Basal-Like Immune-Activated (BLIA). Die meisten MSL- und LAR-Subtypen nach Lehmann et al. fanden sich aufgrund ähnlicher

Eigenschaften in den Gruppen LAR und MES. Die Unterteilung der Basal-Like-Tumoren folgte einem anderen Prinzip: beim BLIS-Subtyp sind Immunregulationswege herunterreguliert, beim BLIA-Subtyp hochreguliert. Zur Überprüfung ihrer Ergebnisse wendeten sie ihren Subtypisierungs-Algorithmus auf die RNA-Expressionsdaten von sieben öffentlich verfügbaren TNBC-Datensätzen an. Den Autorinnen und Autoren war es möglich, die gleiche prozentuale Einteilung der Klassifizierung vorzunehmen wie in ihrer Ausgangsstudie. Als Endpunkte für den Krankheitsverlauf wählten sie das krankheitsfreie Überleben (DFS, Disease-Free Survival) sowie das krankheitsspezifische Überleben (DSS, Disease-Specific Survival) und kamen zu folgendem Ergebnis: Patientinnen mit Tumoren vom BLIS-Subtyp zeigten in Bezug auf das krankheitsfreie und krankheitsspezifische Überleben die schlechteste Prognose ($p = 0,042$, respektive $p = 0,039$), während Patientinnen mit Tumoren vom BLIA-Subtyp die beste Prognose ($p = 0,041$, respektive $p = 0,029$) hatten. Die Autorinnen und Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Identifikation geeigneter Immunmodulatoren für den BLIS- und BLIA-Subtypen notwendig ist (Burstein et al. 2015).

1.6 Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs)

Das Immunsystem spielt eine entscheidene Rolle bei der Erkennung und Bekämpfung von Krebszellen. Die Infiltration von Lymphozyten im Tumorgewebe deutet auf eine körpereigene Immunreaktion hin und ist mit einem besseren klinischen Krankheitsverlauf assoziiert (Paijens et al. 2021). Gleichzeitig besteht bei Vorliegen einer Immunschwäche eine erhöhte Inzidenz für maligne Erkrankungen (Spano et al. 2008). Die Sensitivität des Immunsystems auf Tumorzellen zu reagieren, kann durch Chemotherapeutika verbessert werden: Gehen Tumorzellen infolge von Chemotherapie zu Grunde, setzen sie immunogene Signale frei. Durch diese Signale akkumulieren Immunzellen im Tumorgewebe und greifen die noch verbliebenen Tumorzellen an (Zitvogel et al. 2011). Bei der Verbesserung der körpereigenen Immunantwort spielt auch die Reduktion von regulatorischen T-Zellen (T-reg) durch Chemotherapeutika eine Rolle. T-reg sind für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und die Verhinderung von Autoimmunreaktionen verantwortlich. Diese körpereigene Schutzfunktion verhindert jedoch die körpereigene Immunreaktion auf Tumorzellen. Die Schädigung von T-reg durch Chemotherapeutika macht diese wieder möglich (Oleinika et al. 2012).

Brustkrebstumoren mit $> 50\%$ prädominantem lymphozytärem Infiltrat im Tumorstroma fallen unter die Kategorie „Lymphocyte-predominant breast cancer“

(LPBC) (Denkert et al. 2010). Der Anteil an TILs in den verschiedenen Gruppen von Brusttumoren variiert: TNBCs und HER2-positive Tumoren zeigen den im Durchschnitt höchsten Anteil an TILs (20 % und 16 %), während HR+/HER2-negative Tumoren den geringsten Anteil an TILs aufweisen (6 %) (Stanton et al. 2016).

TNBC-Patientinnen haben bereits ab einem Anteil von 10 % TILs im Tumorgewebe eine bessere Prognose (Dieci et al. 2015). Eine erhöhte Anzahl an TILs im Brusttumorgewebe geht auch mit einer signifikant besseren pCR-Rate und einem besseren Krankheitsverlauf einher (Wang et al. 2016).

Aufgrund bislang uneinheitlicher Vorgehen zur Bestimmung des TILs-Anteils im Tumorgewebe, gibt es in der aktuellen S3-Leitlinie zum Mammakarzinom keine Empfehlung für die Auswertung von TILs sowie zur Höhe des Cut-off-Wertes (allgemein definiert als Wert, ab dem ein Test als positiv bzw. negativ gilt) (Deutsche Krebsgesellschaft 2021). Auch die AGO gibt keine Cut-off-Werte in ihren aktuellen Leitlinien und Empfehlungen an (AGO 2024). Die International TILs Working Group (eine internationale Gruppe von PathologInnen und OnkologInnen) hat eine solche Empfehlung hingegen veröffentlicht. Dabei erfolgt die Evaluation der TILs anhand der Ausbreitung von Immunzellinfiltraten im Tumorstroma und wird in Prozent angegeben, gemessen an der Fläche des Stromas. Der Cut-off-Wert wird mit 10 % TILs im Tumorgewebe angegeben. Intratumorale TILs werden separat betrachtet, Areale mit Nekrose, DCIS oder tertiäre Lymphstrukturen werden ausgespart. Es werden nur einkernige Immunzellen gezählt, Leukozyten mit polymorphen Kernen werden nicht berücksichtigt (Salgado et al. 2014).

1.7 Zielstellungen

Ergänzend zur histopathologischen Befundung kann die molekularbiologische Subtypisierung dazu beitragen, die Tumorbilogie des tripelnegativen Mammakarzinoms präziser zu beschreiben. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die molekularbiologische Subtypisierung an Tumoren des tripelnegativen Mammakarzinoms durchzuführen, die Verteilung der molekularen Subtypen zu beschreiben und den Krankheitsverlauf der Patientinnen entsprechend des molekularen Subtyps zu korrelieren.

Die formulierten Ziele lauten wie folgt:

1. Mittels Genexpressionsdaten sollen tripelnegative Tumoren in die molekularbiologischen Subtypen nach Lehmann (TNBCtype-6 und TNBCtype-4) unterteilt werden (Lehmann et al. 2011).
2. Mittels Genexpressionsdaten sollen tripelnegative Tumoren in die intrinsischen Typen nach PAM50 unterteilt werden (Parker et al. 2009).
3. Jeder molekularbiologische Subtyp nach Lehmann (TNBCtype-6 und TNBCtype-4) soll in die intrinsischen Typen nach PAM50 eingeteilt werden.
4. Es soll untersucht werden, ob eine Assoziation der molekularbiologischen Subtypen nach Lehmann (TNBCtype-6 und TNBCtype-4) und der intrinsischen Typen nach PAM50 zu klinischen und histopathologischen besteht.
5. Innerhalb der molekularbiologischen Subtypen nach Lehmann (TNBCtype-6 und TNBCtype-4) soll der Anteil der TILs im Tumorgewebe bestimmt werden, um eine mögliche Assoziation herauszustellen.
6. Es soll untersucht werden, ob es eine Assoziation der molekularbiologischen Subtypen nach Lehmann mit dem krankheitsfreien Überleben (RFI: Recurrence Free Interval) und dem Gesamtüberleben (OS: Overall Survival) der Patientinnen gibt.
7. Es soll die Rate pathologischer Komplettremissionen (pCR) beim TNBC mit der pCR-Rate beim non-TNBC verglichen werden.
8. Es soll die pCR-Rate innerhalb der TNBC-Subtypen nach Lehmann verglichen werden.

2 Diskussion

2.1 Verteilung der Subtypen nach Lehmann (TNBCtype-6 und TNBCtype-4)

Die in dieser Arbeit dargestellte Klassifizierung des TNBCs in molekularbiologische Subtypen spiegelt die Verteilung wider, die im klinischen Alltag zu beobachten ist. Diese Analyse basiert auf den Daten der prospektiv rekrutierten PiA-TNBC-Kohorte (PiA steht für Prognose im Alltag). Die Auswertung der PiA-Daten zeigt, dass eine molekularbiologische Subtypisierung von tripelnegativen Mammakarzinomen gemäß der Klassifikation von Lehmann et al. möglich ist.

Alle 124 TNBC-Proben (von insgesamt 152 TNBC-Proben, 82 %), von denen FFPE-RNA isoliert werden konnte, wurden erfolgreich nach Lehmann (TNBCtype-6 und TNBCtype-4) subtypisiert (Hartung et al. 2021). Auch Masuda et al. konnten die Subtypen nach Lehmann 2013 an einem neoadjuvant therapierten Kollektiv erfolgreich reproduzieren (Masuda et al. 2013). Die Zuordnung zu den Subtypen nach TNBCtype-6 oder TNBCtype-4 erfolgte anhand des größten Korrelationskoeffizienten mit der höchsten Signifikanz. Die Differenz der Korrelationskoeffizienten zwischen den Subtypen musste mindestens 0,05 betragen („best fit“).

Die Tabelle 1 zeigt die Verteilung der molekularen Subtypen (TNBCtype-6) in der PiA-TNBC-Kohorte im Vergleich zu Lehmann et al. 2011 und Masuda et al. 2013:

Tabelle 1: Verteilung der molekularen Subtypen (TNBCtype-6) in der PiA-TNBC-Kohorte (Hartung et al. 2021) im Vergleich zu den Kohorten von Lehmann et al. 2011 und Masuda et al. 2013

	TNBCtype-6						
	BL1	BL2	IM	M	MSL	LAR	UNS
Hartung et al. 2021	17 %	13 %	22 %	14 %	4 %	15 %	16 %
Lehmann et al. 2011	21 %	13 %	23 %	14 %	11 %	13 %	10 %
Masuda et al. 2013	16 %	6 %	21 %	20 %	10 %	15 %	12 %

Abkürzungen: Triple-Negative Breast Cancer (TNBC), Basal-Like 1 (BL1), Basal-Like 2 (BL2), Mesenchymal (M), Immunomodulatory (IM), Mesenchymal Stem-Like (MSL), Luminal Androgen Receptor (LAR), Unstable (UNS), Prognose im Alltag (PiA).

Die Tabelle veranschaulicht die hohe Übereinstimmung der Ergebnisse. Während der BL2-, IM-, und M-Subtyp prozentual gleich häufig wie bei Lehmann et al. vorkommen, ist die Verteilung vom BL1- und LAR-Subtyp kongruent zu Masuda et al..

Für die Subtypisierung nach TNBCtype-4 wurden Patientinnen mit IM- und MSL-Subtyp über den „next best fit“ neu klassifiziert. Die Verteilung ist in Tabelle 2 nur im Vergleich

zu Lehmann et al. dargestellt, da bei Masuda et al. noch kein Subtyping nach TNBCtype-4 durchgeführt wurde.

Tabelle 2: Verteilung der molekularen Subtypen (TNBCtype-4) in der PiA-TNBC-Kohorte (Hartung et al. 2021) im Vergleich zu der Kohorte von Lehmann et al. 2016

	TNBCtype-4				
	BL1	BL2	M	LAR	UNS
Hartung et al. 2021	29 %	20 %	16 %	20 %	15 %
Lehmann et al. 2016	35 %	25 %	25 %	16 %	2 %

Abkürzungen: Triple-Negative Breast Cancer (TNBC), Basal-Like 1 (BL1), Basal-Like 2 (BL2), Mesenchymal (M), Immunomodulatory (IM), Mesenchymal Stem-Like (MSL), Luminal Androgen Receptor (LAR), Unstable (UNS), Prognose im Alltag (PiA).

Die Aufteilung ist nach TNBCtype-4 bis auf den mesenchymalen Subtyp (M) und die Zuordnung zu der instabilen Gruppe (UNS) ähnlich. Möglich wäre, dass die Tumoren, die bei Lehmann als M-Subtyp klassifiziert wurden, in der PiA-TNBC-Kohorte dem UNS-Subtyp zugeordnet wurden.

Die Analysen ergeben, dass eine molekulare Subtypisierung nach den Vorschlägen von Lehmann et al. sowohl nach TNBCtype-6 als auch nach TNBCtype-4 möglich ist. Die klinische Bedeutung der Klassifizierung kann mittels Assoziation mit dem Krankheitsverlauf (s. Kapitel 2.5 - 2.6) herausgestellt werden.

2.2 Verteilung der intrinsischen Typen nach PAM50

Die Begriffe TNBC und basal-like (nach PAM50) werden oft synonym verwendet. In der PiA-TNBC-Kohorte waren 88 % der TNBC-Tumoren basal-like und 12 % nonbasal-like. Bei Lehmann et al. waren nur 47 % der TNBCs basal-like (Lehmann et al. 2011), bei Desalegn et al., die eine Studie mit 334 -Tumorproben von Brustkrebspatientinnen aus Äthiopien durchführten, waren es nur 62 % (Desalegn et al. 2022). Diese unterschiedlichen Ergebnisse werden unter anderem durch die Unterschiede in den Kollektiven zu erklären sein.

Die nonbasal-like-Tumoren (n=15) in der PiA-TNBC-Kohorte waren wie zu erwarten gut differenziert, wiesen wenige TILs auf und wurden in neun Fällen dem LAR-Subtyp zugeordnet. Während LAR-Tumoren normalerweise nur der nonbasal-like Gruppe zuzuordnen sind (Lehmann et al. 2011; Santonja et al. 2018; Masuda et al. 2013), waren es in der PiA-TNBC-Kohorte nur neun von 18 Tumoren.

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den Subtypen nach Lehmann und den intrinsischen Typen nach PAM50 zeigte sich, dass der basal-like Typ vor allem durch die BL1-, BL2-, IM- und M-Subtypen repräsentiert wird (Hartung et al. 2021). Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten von Masuda et al. überein (Masuda et al. 2013), während bei Lehmann et al. nur der BL1-Subtyp überwiegend basal-like war (Lehmann et al. 2011).

In der vorgestellten PiA-TNBC-Studie wurden insgesamt 12 der 124 Tumoren (10 %) als HER2-enriched nach PAM50 klassifiziert, sieben von ihnen stammen aus der nonbasal-like Gruppe des LAR-Subtyps (58 %) (Hartung et al. 2021). Bei Santonja et al. waren vier von fünf LAR-Tumoren HER2-enriched (Santonja et al. 2018), bei Lehmann et al. waren es sogar 10 % der LAR-Tumoren (Lehmann et al. 2011).

Aufgrund aktueller Diskussionen zu der Bedeutung von HER2-low Tumoren (Modi et al. 2022) wurde nachträglich der Anteil von HER2-low-Tumoren in der PiA-TNBC-Kohorte untersucht. Insgesamt waren 43 von 124 (35 %) TNBC-Tumoren HER2-low, in der LAR-Gruppe lag der Anteil sogar bei 54 % (13 von 24). Die Ergebnisse sind kongruent zu bisherigen Studien (Baez-Navarro et al. 2023). Von den insgesamt zwölf TNBC-Tumoren, die in der PiA-TNBC-Studie nach PAM50 HER2-enriched waren, wurden mittels IHC die Hälfte der Tumoren als HER2-low klassifiziert. Weitere Studien zur Identifikation von HER2-low Tumoren innerhalb einer TNBC-Kohorte durchzuführen erscheint sinnvoll, da Patientinnen mit HER2-low Tumoren einen schlechteren Krankheitsverlauf zeigen als Patientinnen mit HER2-negativen Tumoren und von einer zielgerichteten anti-HER2-Therapie profitieren könnten (Sanomachi et al. 2023).

Die Heterogenität des TNBCs zeigt sich auch in der Verteilung der intrinsischen Typen nach PAM50. In der prospektiven PiA-TNBC-Kohorte sind die Tumoren häufiger basal-like (88 %) als in anderen Studien. Eine Assoziation zwischen der Klassifizierung als HER2-enriched nach PAM50 und HER2-low nach Immunhistochemie konnte für die PiA-TNBC-Studie nicht gezeigt werden.

2.3 Vergleich klinischer und histopathologischer Parameter

In der PiA-TNBC-Kohorte sollten die Subtypen nach Lehmann hinsichtlich klinischer (Alter) und histopathologischer Parameter wie Grading, Nodalstatus, Tumorgroße miteinander verglichen werden.

Innerhalb der LAR-Gruppe waren zwei Drittel der Patientinnen nach TNBCtype-6 über 50 Jahre alt, was der erwarteten Verteilung in der Gesamtkohorte entspricht. Patientinnen

vom BL1-Subtyp waren in 60 % der Fälle unter 50 Jahre alt (12 von 20, $p < 0,05$). Tumoren vom BL1-Subtyp waren häufiger schlecht- (G3) differenziert. Beim LAR-Subtyp war es genau andersherum: die Tumoren waren signifikant häufiger G1 oder G2 (12 von 15) als G3 ($p < 0,05$) (s. Tab. 2, Hartung et al. 2021).

Nach TNBCtype-4 waren die Ergebnisse kongruent: BL1-Tumoren waren eher schlecht differenziert (G3), während LAR-Tumoren eher gut bis mäßig differenziert waren (G1 und G2) ($p < 0,05$). Eine Korrelation der Subtypen zur Tumorgöße und zum Nodalstatus konnte nach beiden Subtypisierungen (TNBCtype-6 und TNBCtype-4) nicht gefunden werden (Hartung et al. 2021).

Die Arbeitsgruppe von Lehmann fand keine Assoziation der einzelnen Subtypen nach TNBCtype-6 zur Tumorgöße und Grading. Beim Alter zeigte nur der LAR-Subtyp ein signifikantes Ergebnis: die Patientinnen waren älter als Patientinnen mit einem non-LAR-Subtyp (Lehmann et al. 2011). Bei Santonja et al. waren die Tumoren der BL1-Gruppe ebenfalls eher G3 als die Tumoren der LAR-Gruppe. Tumoren vom LAR-Subtyp waren etwa in gleichen Teilen G1/G2 (6 von 13) bzw. G3 (7 von 13) (Santonja et al. 2018).

Aufgrund des schlechten Krankheitsverlaufs (s. Kapitel 2.6) wurde der LAR-Subtyp genauer betrachtet und zusätzlich auf die Expression von Ki-67 und dem AR untersucht. Schnell wachsende Tumoren wie das TNBC zeigen eher einen hohen Ki-67-Prozentwert, langsam wachsende Tumoren einen niedrigen Ki-67-Prozentwert (Yerushalmi et al. 2010). Tumoren, die den AR exprimieren, sind weniger proliferativ und haben folglich eine geringere Ki-67-Expression (Candelaria et al. 2019). Auch in der PiA-TNBC-Studie korreliert eine RNA-Überexpression des Androgenrezeptors mit dem LAR-Subtyp (s. Abb. 4A, Hartung et al. 2021), was mit der guten Differenzierung des Tumors und einer entsprechend geringen Ki-67-Expression einhergeht.

In der PiA-TNBC-Studie korreliert eine niedrige Ki-67-Expression mit dem LAR-Subtyp (TNBCtype-6), eine hohe Ki-67-Expression mit dem BL1-Subtyp (s. Abb. 4B, Hartung et al. 2021). Auch bei Lehmann et al. wiesen die Basal-Like-Subtypen (BL1 und BL2) die höchste Ki-67-Expression auf: 70 %, bzw. 42 % ($p < 0,05$) (Lehmann et al. 2011).

Tumoren des BL1-Subtyps sind schlechter differenziert und zeigen eine höhere Rate an Ki-67-Expression. Bei einem guten Grading und einer niedrigen Ki-67-Expression muss an das Vorliegen eines LAR-Subtyps, bzw. nonbasal-like Typs gedacht werden.

2.4 Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs)

Die Bedeutung von TILs im Tumorgewebe für die Prognose einer Patientin und das Ansprechen auf Therapien wird diskutiert und in explorativen Studien seit fast 15 Jahren untersucht (Denkert et al. 2010). In der PiA-TNBC-Studie war der Anteil an TILs in der Gruppe der TNBCs 72,2 % mit über 10 % TILs im Tumorgewebe, gefolgt von HER2-positiven Tumoren (55,4 % mit über 10 % TILs im Tumorgewebe). Bei den HR+/HER2-negativen Tumoren hatten 29 % der Tumoren einen Anteil an TILs mit > 10 % TILs im Tumorgewebe (s. Abb. 2, Schüler et al. 2022). Diese Ergebnisse passen zu bisherigen Studien (s. Kapitel 1.6), in denen die TNBCs und HER2-positiven Tumoren ebenfalls den höchsten Anteil an TILs im Tumorgewebe aufweisen (Stanton et al. 2016). Während die International TILs Working Group einen Cut-off-Wert von 10 % TILs im Tumorgewebe empfiehlt (Salgado et al. 2014), schlägt die Arbeitsgruppe von Denkert et al. zwei Cut-off-Werte vor (10 % und 60 %) und teilt die Tumoren in drei Gruppen ein: low group (< 10 % TILs), intermediate group (10-60 % TILs) und high group (> 60 % TILs) (Denkert et al. 2018). In Anlehnung daran, konnten in der PiA-TNBC-Studie die meisten Tumoren der intermediate group zugeordnet werden (53 %), 28 % waren in der low group, 19 % in der high group (Hartung et al. 2021). Eine ähnliche Verteilung der TILs bei TNBC-Tumoren zeigte sich bei Jong et al., obgleich die Cut-Off-Werte nicht identisch sind: Bei etwa der Hälfte der Patientinnen war der TILs-Anteil im Tumorgewebe < 30 %, bei 27 % der Patientinnen konnten zwischen 30-50 % TILs im Tumorgewebe nachgewiesen werden und 21 % wiesen > 75 % TILs auf (Jong et al. 2022).

Sieht man sich die Verteilung innerhalb der molekularbiologischen Subtypen an, so ist der Anteil an Tumorproben mit > 60 % TILs in der PiA-TNBC-Kohorte nach TNBCtype-6 beim IM-Subtyp am höchsten und in der Gruppe des M- und LAR-Subtyps am niedrigsten (überwiegend < 10 % TILs) (s. Suppl. Abb. 2A, Hartung et al. 2021). Auch bei Lehmann et al. war der TILs-Anteil in der IM-Gruppe nach TNBCtype-6 am höchsten (38 %), gefolgt von BL2 (23 %), MSL (21 %), LAR (17 %), BL1 (15 %) und M (9 %) (Lehmann et al. 2011).

Nachfolgend soll die Verteilung der Tumoren vom IM-Subtyp nach TNBCtype-4 in der PiA-TNBC-Studie diskutiert werden. Der höchste Anteil an TILs (> 60 %) ist nach TNBCtype-4 beim BL1-Subtyp zu finden, gefolgt vom UNS-, LAR- und BL2-Subtyp. Der M-Subtyp weist wie nach TNBCtype-6 keine Tumoren mit < 60% TILs auf (s. Suppl. Abb. 2B, Hartung et al. 2021). Dies könnte wie in Abbildung 1 zu sehen, durch

die Verteilung der IM-Tumoren nach Reklassifizierung von TNBCtype-6 zu TNBCtype-4 bedingt sein: Zehn der 28 IM-Tumoren sind nach TNBCtype-4 BL1. Die restlichen IM-Tumoren wurden dem BL2- (n=5) und dem LAR-Subtyp (n=4) zugeordnet. Der andere Teil der IM-Tumoren (n=9) konnte nach TNBCtype-4 keinem Subtypen sicher zugeordnet werden und wurde als unstable (UNS) klassifiziert (Hartung et al. 2021).

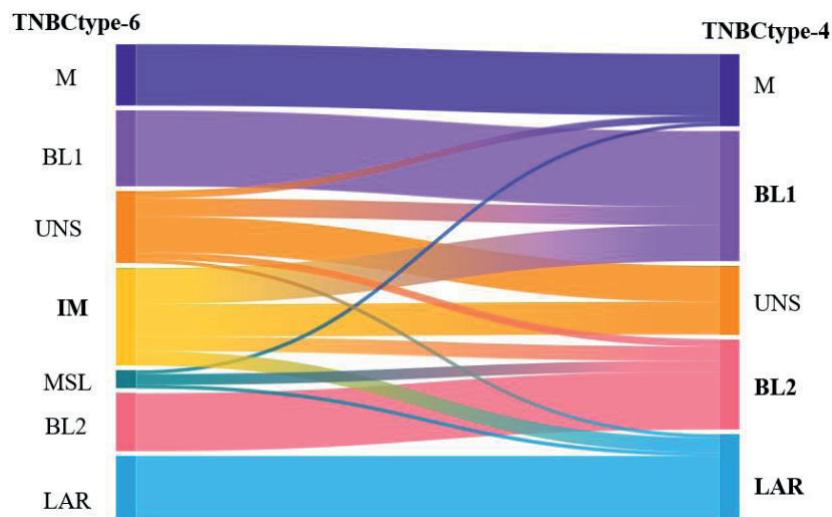


Abbildung 1: Reklassifizierung der molekularen Subtypen nach TNBCtype-4 (Lehmann et al. 2016). Verteilung der IM-Gruppe: 36 % zu BL1, 18 % zu BL2, 14 % zu LAR und 32 % zu UNS.

Abkürzungen: Triple-Negative Breast Cancer (TNBC), Basal-Like 1 (BL1), Basal-Like 2 (BL2), Mesenchymal (M), Immunomodulatory (IM), Mesenchymal Stem-Like (MSL), Luminal Androgen Receptor (LAR), Unstable (UNS).

Vergleicht man die Prozentzahlen nach TNBCtype-6 und TNBCtype-4 bei Lehmann et al., ist davon auszugehen, dass auch bei ihrer Analyse die IM-Tumoren sich auf den BL1- (+17 %), BL2- (+11 %) und LAR- (+7 %) Subtyp verteilen. Der M-Subtyp verzeichnet den geringsten Zuwachs an IM-Tumoren (+4 %) (Lehmann et al. 2016), passend zu der geringen Präsenz von TILs in den Tumoren des M-Subtyps in der PiA-TNBC-Studie (s. Suppl. Abb. 2A, 2B, Hartung et al. 2021).

TNBC-Patientinnen mit weniger als 10 % TILs im Tumorgewebe zeigten in der PiA-TNBC-Kohorte einen schlechteren Krankheitsverlauf als Patientinnen mit > 10 % TILs im Tumorgewebe: bei < 10 % TILs: RFI 65,6 % (95 % KI 49,5–81,7), bei 10-60 % TILs: RFI 72,1 % (95 % KI 61,3–82,9), bei > 60 % TILs: RFI 88,5 % (95 % KI 76,2–> 99,9) (Schüler et al. 2022). Diese Ergebnisse passen zu anderen veröffentlichten Daten (s. auch Kapitel 1.6), wonach TNBC-Patientinnen mit einem frühen Mammakarzinom mit einem hohen TILs-Anteil (> 75 %) nicht nur ein besseres

Gesamtüberleben, sondern auch eine deutlich niedrigere 10-Jahres-Rezidivrate haben (Jong et al. 2022).

Im Gegensatz zu anderen Studien, in denen deutlich mehr Hochrisiko-Patientinnen das Kollektiv bestimmen (Denkert et al. 2018; Jong et al. 2022), basiert die PiA-TNBC-Studie auf einer repräsentativen Kohorte, so dass auch Patientinnen mit einem niedrigen Rezidivrisiko eingeschlossen wurden. Die Ergebnisse zum Krankheitsverlauf sind in der PiA-TNBC-Studie folglich repräsentativer für die klinische Routine.

Zur Prognoseabschätzung hat sich der Anteil der TILs als geeigneter Biomarker herausgestellt, sodass ihre Bestimmung in der klinischen Routine empfohlen wird (Loibl et al. 2024). Bislang ergeben sich aus der Bestimmung zwar keine klinischen Konsequenzen, jedoch wurde herausgestellt, dass Patientinnen mit TILs im Resttumor nach NACT eine bessere Prognose haben (Dieci et al. 2023; Cao et al. 2023). In zukünftigen Studien könnte untersucht werden, ob der Anteil an TILs im Resttumor zwischen den Subtypen nach Lehmann variiert und ob dieser mit dem jeweiligen Krankheitsverlauf korreliert.

2.5 Krankheitsverlauf nach TNBCtype-6 und TNBCtype-4

Um ausschließlich krankheitsbedingte Ereignisse zu erfassen, wurde in der vorliegenden Arbeit das krankheitsfreie Überleben (RFI, Recurrence Free Interval, beinhaltet invasives ipsilaterales Brustkrebsrezidiv, lokales, regionales invasives Rezidiv, Fernmetastasen sowie Tod durch Brustkrebs) in Anlehnung an die STEEP-Kriterien gewählt (Hudis et al. 2007, Tolaney et al. 2021). Ergänzend wurden Überlebensanalysen mit dem Endpunkt Gesamtüberleben durchgeführt.

In der LAR-Gruppe (TNBCtype-6) zeigten Patientinnen in der PiA-TNBC-Studie mit basal-like Tumoren im Vergleich zu Patientinnen mit nonbasal-like Tumoren ein signifikant fünfmal höheres Risiko zu versterben ($p < 0,034$). Ähnlich war es beim RFI: hier zeigte sich aber nur ein Trend für ein höheres Risiko für Patientinnen vom basal-like LAR-Subtyp, ein krankheitsbedingtes Ereignis zu erleiden. Sowohl in der univariaten Analyse als auch nach Adjustierung an Tumorgöße und Lymphknotenbefall verstarben mehr Patientinnen der Gruppe mit einem LAR-Subtyp, im Vergleich zu der Gruppe mit einem non-LAR-Subtyp (BL1, BL2, IM, M, MSL, UNS): adjustierte HR = 2,74, 95 % KI 1,06–7,10, $p < 0,05$. Die Ergebnisse waren nach TNBCtype-4 ähnlich: Patientinnen der LAR-Gruppe zeigten im Vergleich zu der non-LAR-Gruppe ein

verkürztes Gesamtüberleben (HR = 2,62, 95 % KI 1,05–6,50, $p < 0,05$). Bei krankheitsbedingten Ereignissen konnte ebenfalls ein Trend gesehen werden: RFI, HR = 1,74; 95 % KI 0,69-4,40 (Hartung et al. 2021).

Lehmann et al. wählten neben dem Gesamtüberleben (OS, Overall Survival, inkludiert Verstorbene jeglicher und unbekannter Todesursache) das rezidivfreie Überleben (RFS, Relapse Free Survival) als Endpunkt, das im Vergleich zum RFI auch Patientinnen mit unbekannter und krankheitsunabhängiger Todesursache einschließt. Das RFS war für Patientinnen mit einem LAR-Subtyp unabhängig von der Art und Dauer der Therapie signifikant ($p < 0,05$) verkürzt im Vergleich zu Patientinnen mit einem BL1- (HR = 2,9), IM- (HR = 3,2) und MSL- (HR = 10,5) Subtyp. Die Patientinnen der BL1-Gruppe hatten im Vergleich ein besseres Gesamtüberleben ($p = 0,037$), während Patientinnen mit LAR-Subtyp auch hier das schlechteste Gesamtüberleben hatten (Lehmann et al. 2011).

Lim et al. sahen ebenfalls eine Korrelation zwischen der AR-Expression nach IHC und dem LAR-Subtyp nach Lehmann, räumten jedoch ein, dass die Testung auf AR-Positivität mittels Genanalyse geeigneter sei, um einen prädiktiven Marker für die antiandrogene Therapie zu identifizieren (Lim et al. 2024).

Der schlechtere Krankheitsverlauf der Patientinnen mit LAR-Subtyp könnte durch das im Vergleich schlechtere Ansprechen auf Chemotherapie bedingt sein. Als alternativer Therapieansatz könnte der Androgenrezeptor einen Angriffspunkt zielgerichteter Therapien darstellen. Die Tatsache, dass beim LAR-Subtyp mehr Tumorzellen AR-positiv sind als bei den anderen Subtypen (über 10-fach erhöht, $p < 0,05$) (Lehmann et al. 2011), wurde auf RNA-Ebene auch in der PiA-TNBC-Studie gesehen (s. Abb. 4A in Hartung et al. 2021). Wie bereits einleitend beschrieben, wurde die Wirksamkeit verschiedener Antiandrogene bei metastasierten oder lokal fortgeschrittenen TNBC-Patientinnen mit AR bereits in Phase-II-Studien untersucht. Für die Etablierung der antiandrogenen Therapie im klinischen Alltag bedarf es jedoch der Ergebnisse von Phase-III-Studien, die sich derzeit teilweise schon in der Rekrutierungsphase (bspw. NCT05954442) befinden. Angesichts der eher geringen Ansprechrate auf die antiandrogene Therapie ist zu vermuten, dass weitere Prädiktoren neben dem Androgenrezeptor (oder andere Substanzen zusätzlich zur antiandrogenen Therapie) benötigt werden.

2.6 pCR-Rate

Bei dem Subkollektiv der neoadjuvant therapierten Patientinnen der PiA-TNBC-Studie (54 von 152) lag die pCR-Rate bei 48 % (26 von 54). Bei den neoadjuvant therapierten non-TNBC-Patientinnen lag sie nur bei 25 % (37 von 146). Die pCR-Rate wurde dabei als komplette Remission ohne Nachweis invasiver Tumorzellen in der Brust oder Axilla definiert (ypT0/Tis ypN0) (Hartung et al. 2021). Auch in bisherigen Studien haben TNBC-Patientinnen eine höhere pCR-Rate als non-TNBC-Patientinnen: Bei Liedtke et al. war die pCR-Rate der TNBCs doppelt so hoch im Vergleich zu den non-TNBCs (22 % bzw. 11 %, $p = 0,034$). Bei 33 % der TNBC-Patientinnen lag eine fortgeschrittene Tumorerkrankung vor (T3 und T4 bei 83 von 255) (Liedtke et al. 2008). Bei Masuda et al. zeigten 28 % der TNBCs eine pCR-Rate; hier waren 38 % der Patientinnen lokal fortgeschritten (Stadium IIIA-IIIB bei 50 von 130 Patientinnen) (Masuda et al. 2013).

Bis vor einigen Jahren erhielten vor allem Patientinnen mit lokal fortgeschrittenen Tumorerkrankungen eine neoadjuvante Chemotherapie. Im Vergleich zu Liedtke et al. und Masuda et al. lag der Anteil an Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem Tumorleiden in der PiA-TNBC-Studie nur bei 15 %, was die hier höhere pCR-Rate innerhalb der TNBC-Patientinnen erklären könnte (Hartung et al. 2021).

Sieht man sich die Verteilung der pCR-Rate innerhalb der Subtypen-Gruppen an, besteht in der PiA-TNBC-Studie kein signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen mit LAR- (50 %) und non-LAR-Tumoren (48 %). Möglicherweise hängt dies mit der kleinen Stichprobe neoadjuvant therapierter und gleichzeitig molekularbiologisch subtypisierter Patientinnen ($n=33$) zusammen. Nach der strengeren pCR-Definition (ypT0 ypN0), die von Minckwitz et al. 2012 empfohlen wird, zeigen die LAR-Tumoren in der PiA-TNBC-Studie eine schlechtere pCR-Rate als die non-LAR-Tumoren (25 % bzw. 45 %) (Hartung et al. 2021). In einer Metaanalyse mit insgesamt 1086 TNBC-Tumoren zeigten Patientinnen mit einem LAR-Subtyp ebenfalls eine schlechtere pCR-Rate (13,3 %) als mit einem non-LAR-Subtyp (39,2 %) (Thompson et al. 2022). Darüber, wie die pCR-Rate in den einzelnen Studien definiert wurde, machen die Autorinnen und Autoren allerdings keine Angabe.

Der LAR-Subtyp schnitt bei Masuda et al. mit einer pCR-Rate von 10 % im Vergleich zu den anderen Subtypen am zweitschlechtesten ab (BL2 0 % pCR-Rate). Beim Vergleich der pCR-Rate zwischen den Subtypen nach Lehmann und den intrinsischen Typen nach PAM50 gibt es eine Besonderheit: BL1- bzw. BL2- Tumoren sind nach PAM50 zwar alle

basal-like, die pCR-Rate der Patientinnen jedoch nicht gleich (BL1 52 % und BL2 0 % pCR-Rate). Trotz ähnlicher Tumorbilogie der basal-like Tumoren, spielt beim BL2-Subtyp unter anderem die Expression von Wachstumsfaktoren eine Rolle. Eine Vorhersage der pCR-Rate ist laut den Autorinnen und Autoren daher eher mittels der Subtypen nach Lehmann, als nach PAM50 möglich (Masuda et al. 2013). Die Ergebnisse zur pCR-Rate zeigen einen Trend bei den einzelnen Subtypen. Dabei stellt der LAR-Subtyp eine biologisch besondere Entität mit einer geringeren Proliferationsrate dar, so dass es zu einer reduzierten Chemosensitivität kommt. Dem gegenüber steht der BL1-Subtyp mit hohen pCR-Raten, so dass die Patientinnen besser auf die Chemotherapie ansprechen.

2.7 Fazit

Das Mammakarzinom ist eine äußerst heterogene Erkrankung, die in Bezug auf Diagnose, Therapie und Krankheitsverlauf in verschiedene Typen eingeteilt werden kann. Das tripelnegative Mammakarzinom (TNBC) stellt einen dieser Subtypen dar und weist ebenfalls eine ausgeprägte Heterogenität auf, die durch die molekularbiologische Subtypisierung nach Lehmann et al. (TNBCtype-6 und TNBCtype-4) erfasst wird.

Die molekularbiologischen Subtypen des TNBC basieren auf unterschiedlichen biologischen Eigenschaften der Tumoren, was sich auch in den variierenden Krankheitsverläufen der Patientinnen widerspiegelt. Durch die histopathologische Befundung, ergänzt um die Subtypisierung auf RNA-Ebene, kann die Prognose von TNBC-Patientinnen präziser eingeschätzt werden.

Die Verteilung der molekularbiologischen Subtypen in der PiA-TNBC-Studie entspricht weitgehend den publizierten Daten. Patientinnen mit TNBC des LAR-Subtyps zeigen unter Berücksichtigung von Alter und Nodalstatus die meisten krankheitsbedingten Ereignisse. Diese Tumoren exprimieren häufiger den Androgenrezeptor und weisen einen besseren Differenzierungsgrad auf. Möglicherweise resultiert die geringere Sensitivität gegenüber Chemotherapie in diesem Subtyp aus der niedrigeren Zellteilungsaktivität. Im Gegensatz dazu ist der BL1-Subtyp schlechter differenziert und spricht gut auf Chemotherapie an, was zu einem besseren Krankheitsverlauf führt.

Die Tumoren des BL1- oder BL2-Subtyps sind in der PiA-TNBC-Kohorte klassifiziert nach PAM50 ausschließlich basal-like. Allerdings zeigen Patientinnen mit Tumoren vom BL1-Subtyp eine deutlich bessere pCR-Rate als Patientinnen mit Tumoren vom BL2-

Subtyp. Ursächlich könnte eine höhere Proliferationsrate der Tumoren vom BL1-Subtyp sein.

Die Zuordnung zu den molekularbiologischen Subtypen nach Lehmann scheint der Zuordnung zu den intrinsischen Typen nach PAM50 hinsichtlich Prognoseabschätzung überlegen zu sein. Die Identifikation der molekularbiologischen Subtypen verbessert die Optionen für die Patientinnen im Rahmen der Präzisionsonkologie.

Für die Zukunft stellen sich folgende Fragen:

- 1) Der LAR-Subtyp scheint klinisch von besonderem Interesse zu sein. Es sollte untersucht werden, ob die Bestimmung dieses Subtyps über den Androgenrezeptor mittels Immunhistochemie in der klinischen Routine etabliert werden kann. Diskutiert werden muss, ob der Einsatz von Chemotherapie beim LAR-Subtyp wegen Ineffektivität sinnvoll ist oder zumindest durch eine antiandrogene Therapie ergänzt werden sollte.
- 2) Die bisherigen Versuche einer molekularbiologischen Subtypisierung des TNBCs, die im klinischen Alltag sinnvoll durchgeführt werden können, sind unzureichend. Mit der unselektierten Kohorte der PiA-TNBC-Studie könnte mit einer eigenen Clusteranalyse möglicherweise eine relevantere Auftrennung in die molekularen Subtypen erreicht werden.
- 3) Zielkriterium einer idealen molekularen Subtypisierung sollte nicht nur die prognostische Aussage sein, sondern auch die Prädiktion von Therapieansprechen. Dies könnte von Relevanz sein, um eine Übertherapie (Platin-haltige Chemotherapie, Immuncheckpoint-Inhibitoren, ADCs) zu vermeiden.

Neben der Subtypisierung können Hochrisiko-Patientinnen innerhalb der TNBCs zusätzlich durch die Bestimmung des Anteils an TILs im Tumorgewebe identifiziert werden. Patientinnen mit < 10 % TILs im Tumorgewebe zeigen einen schlechteren Krankheitsverlauf als Patientinnen mit > 10 % TILs. Angesichts der klinischen Relevanz, könnte in Zukunft die Bestimmung der TILs im Residualgewebe bei non-pCR nach NACT an Bedeutung gewinnen (vgl. Cao et al. 2023; Dieci et al. 2023).

Der HER2-Status ist als prädiktiver Marker etabliert, für TNBC-Patientinnen bislang aber nicht relevant, da diese nach histopathologischer Befundung als HER2-negativ eingruppiert werden. Für TNBC-Patientinnen, deren Tumore als HER2-low bzw. HER2-

ultralow klassifiziert werden, könnte eine HER2-Antikörpertherapie klinisch von Bedeutung sein.

Die Heterogenität des TNBCs kann durch molekularbiologische Analysen des Primärtumors charakterisiert werden. Zur Vorhersage des Therapieerfolgs könnten künftig verschiedene Parameter genutzt werden. Für die Hochrisiko-Patientinnen innerhalb der TNBC-Gruppe sollte folglich nicht nur eine gute Nachsorge gewährleistet werden, sondern auch die Suche nach zielgerichteten Therapien im Fokus stehen.

2.8 Limitationen und Stärken

Obwohl die Ergebnisse dieser Studie von einer prospektiven Kohorte stammen, was eine Stärke darstellt, handelt es sich bei der durchgeführten Fragestellung um eine retrospektive Analyse. Diese liefert hauptsächlich Daten zur Hypothesengenerierung und ist daher für weiterführende Studien von Nutzen.

Eine Limitation der Studie betrifft die Auswertungen zur Assoziation der molekularbiologischen Subtypen mit der pCR-Rate. Aufgrund der kleinen Stichprobe neoadjuvant therapierter TNBC-Patientinnen (n=33) mit durchgeführter Subtypisierung der Tumoren konnte nur ein Trend abgebildet werden.

Wegen fehlender Daten zum *gBRCA*-Mutationsstatus bei einem Großteil der Patientinnen der PiA-TNBC-Studie, ist eine Aussage zur Verteilung des Mutationsstatus innerhalb der Subtypen-Gruppen nicht möglich. Bei Lehmann et al. waren Patientinnen mit BL1- und BL2- Subtyp häufiger als die anderen Subtypen *gBRCA*-mutiert. Fast drei Viertel (70 %) der Tumoren von Patientinnen mit *gBRCA*-Mutation wurden nach PAM50 gleichzeitig als basal-like klassifiziert (Lehmann et al. 2011). Zur Empfehlung individualisierter Therapien sollte der Zusammenhang von *gBRCA*-Mutationen und der molekularbiologischen Subtypisierung sowie dem PAM-50-Algorithmus Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Die Auswahl der Endpunkte in klinischen Studien kann einen erheblichen Einfluss auf die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen haben. In der PiA-TNBC-Studie wird durch die Fokussierung auf brustkrebsbedingte Ereignisse (RFI) eine klare und spezifische Analyse des Krankheitsverlaufs ermöglicht, was als Stärke angesehen werden kann. Im Gegensatz dazu berücksichtigt die Studie von Lehmann et al. auch Todesfälle, die nicht direkt mit dem Mammakarzinom in Verbindung stehen (RFS), was die Überlebensanalysen breiter anlegt. Diese unterschiedlichen Ansätze können die Interpretation der Ergebnisse beeinflussen und erschweren den direkten Vergleich

zwischen den Studien. Es ist wichtig, diese Limitationen zu erkennen, um die Ergebnisse der Studien korrekt einordnen zu können.

Eine besondere Stärke der Studie stellt die prospektive Rekrutierung der Patientinnen aus fünf zertifizierten Brustkrebszentren Deutschlands durch dieses Forscherteam dar. Die erhobene Biomarker-Analyse der PiA-TNBC-Studie basiert auf den Daten von konsekutiv eingeschlossenen Patientinnen, die den klinischen Alltag repräsentieren. In einer Kohortenstudie wie der PiA-TNBC-Studie wurden Patientinnen nach den Ergebnissen der lokalen Pathologien sowie dem lokalem Tumorboard entsprechend der Leitlinien therapiert, sodass im Rahmen der Studie keine Therapieempfehlung erfolgte. Die TNBC-Patientinnen der PiA-Studie stammen also aus einer prospektiv gesammelten Kohorte (n= 152 TNBC-Patientinnen) und zeigen im Vergleich mit den Ergebnissen von Li et al. (n= 158.358 Patientinnen aus der SEER-Datenbank; SEER= Surveillance, Epidemiology and End Results) hinsichtlich klinischer und histopathologische Parameter eine gleiche Verteilung. Das mittlere Alter bei Primärdiagnose lag in der PiA-TNBC-Kohorte bei 56 Jahren, bei Li et al. bei 58,9 Jahren. Die TNBC-Tumoren der PiA-TNBC-Kohorte waren deutlich schlechter differenziert als die non-TNBC Tumoren (1 % G1, 39 % G2, 60 % G3), vergleichbar war es bei Li et al. (2 % G1, 17 % G2, 75 % G3, 1 % G4, 5 % unbekannt) (Hartung et al. 2021; Li et al. 2017).

Obwohl die FFPE-Proben der PiA-TNBC-Studie die empfohlene Aufbewahrungszeit von vier Jahren für die erfolgreiche TNBC-Subtypisierung bereits überschritten hatten (Jovanović et al. 2017), war die RNA-Isolation von allen TNBC-Proben in ausreichender Qualität möglich. An einem Großteil der Kohorte konnte der molekulare Subtyp und die Verteilung der TILs in den Tumorproben bestimmt werden.

In der PiA-TNBC-Kohorte wurden vier von 128 (3 %) getesteten Tumorproben mittels molekularbiologischer Subtypisierung als ESR1-positiv identifiziert. Die histopathologische Nachkontrolle ergab eine Hormonrezeptor-Positivität, sodass diese Proben aus der Analyse ausgeschlossen wurden. In anderen Studien wurden ebenfalls TNBC-Proben als ESR1-positiv identifiziert. In der Studie von Echavarría et al. waren es 7 % der Proben, wobei unklar bleibt, ob diese histopathologisch nachkontrolliert wurden (Echavarría et al. 2018). Bei Prat et al. waren es 17 % (60 von 350) der Proben, wobei die ESR1-Expression signifikant geringer war als bei ER-positiven Tumoren (Prat et al. 2015). Im Vergleich dazu war die Anzahl an ESR1-positiven Proben in der PiA-TNBC-Studie gering, was für eine hohe Qualität der durchgeführten Pathologie spricht.

3 Literaturverzeichnis

- AGO - Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (2024): *Empfehlungen gynäkologische Onkologie Kommission Mamma. Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome*. Hg. v. Marc Thill, Michael Friedrich und Hans H. Kreipe. <https://www.ago-online.de/leitlinien-empfehlungen/leitlinien-empfehlungen/kommission-mamma> [Stand: 05.06.2024]
- ASCO Daily News (2024): *Dr. Jennifer A. Pietenpol Honored With the 2024 Science of Oncology Award for Groundbreaking Discoveries in Triple-Negative Breast Cancer*. <https://dailynews.ascopubs.org/do/dr-jennifer-pietenpol-honored-2024-science-oncology-award-groundbreaking-discoveries> [Stand: 06.07.2024]
- Baez-Navarro, X.; van Bockstal, M. R.; Andrinopoulou, E.-R.; van Deurzen, C. H. M. (2023): HER2-Low Breast Cancer: Incidence, Clinicopathologic Features, and Survival Outcomes From Real-World Data of a Large Nationwide Cohort. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 36 (4), S. 100087. <https://doi.org/10.1016/j.modpat.2022.100087>.
- Bardia, A.; Rugo, H. S.; Tolaney, S. M.; Loirat, D.; Punie, K.; Oliveira, M. et al. (2024): Final Results From the Randomized Phase III ASCENT Clinical Trial in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer and Association of Outcomes by Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 and Trophoblast Cell Surface Antigen 2 Expression. In: *Journal of Clinical Oncology* 42 (15), S. 1738–1744. <https://doi.org/10.1200/JCO.23.01409>.
- Bonnefoi, H.; Grellety, T.; Tredan, O.; Saghatchian, M.; Dalenc, F.; Mailliez, A. et al. (2016): A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1). In: *Annals of oncology* 27 (5), S. 812–818. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw067>.
- Brown, R. W.; Allred, C. D.; Clark, G. M.; Osborne, C. K.; Hilsenbeck, S. G. (1996): Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2 (3), S. 585–592.
- Burstein, M. D.; Tsimelzon, A.; Poage, G. M.; Covington, K. R.; Contreras, A.; Fuqua, S. A. W. et al. (2015): Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (7), S. 1688–1698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>.
- Candelaria, R. P.; Adrada, B. E.; Wei, Wei; Thompson, A. M.; Santiago, L.; Lane, D. L. et al. (2019): Imaging features of triple-negative breast cancers according to androgen receptor status. In: *European journal of radiology* 114, S. 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2019.03.017>.
- Cao, B.; Zhang, Z.; Wang, C.; Lv, X. (2023): Prognostic relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in residual tumor tissue from patients with triple-negative breast cancer following neoadjuvant chemotherapy: A systematic review and

meta-analysis. In: *Oncology Letters* 26 (4), Artikel 441.
<https://doi.org/10.3892/ol.2023.14028>.

- Cortes, J.; Cescon, D. W.; Rugo, H. S.; Nowecki, Z.; Im, S.-A.; Yusof, M. et al. (2020): Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. In: *Lancet (London, England)* 396 (10265), S. 1817–1828.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32531-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32531-9).
- Denkert, C.; Loibl, S.; Noske, A.; Roller, M.; Müller, B. M.; Komor, M. et al. (2010): Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (1), S. 105–113.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.7370>.
- Denkert, C.; Minckwitz, G. v.; Darb-Esfahani, S.; Lederer, B.; Heppner, B. I.; Weber, K. E. et al. (2018): Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. In: *The Lancet Oncology* 19 (1), S. 40–50.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30904-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30904-X).
- Dent, R.; Trudeau, M.; Pritchard, K. I.; Hanna, W. M.; Kahn, H. K.; Sawka, C. A. et al. (2007): Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (15 Pt 1), S. 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>.
- Desalegn, Z.; Yohannes, M.; Porsch, M.; Stückerath, K.; Anberber, E.; Santos, P. et al. (2022): Intrinsic subtypes in Ethiopian breast cancer patient. In: *Breast cancer research and treatment* 196 (3), S. 495–504. <https://doi.org/10.1007/s10549-022-06769-z>.
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe (2021): *S3-Leitlinie Mammakarzinom, Version 4.4*. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> [Stand: 12.12.2023]
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe (2024): *S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Version 7.0*. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom> [Stand: 06.06.2024]
- Dieci, M. V.; Mathieu, M. C.; Guarneri, V.; Conte, P.; Delalogue, S.; Andre, F.; Goubar, A. (2015): Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 26 (8), S. 1698–1704.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdv239>.
- Dieci, M. V.; Carbognin, L.; Miglietta, F.; Canino, F.; Giorgi, C. A.; Cumerlato, E. et al. (2023): Incorporating weekly carboplatin in anthracycline and paclitaxel-containing neoadjuvant chemotherapy for triple-negative breast cancer: propensity-score matching analysis and TIL evaluation. In: *British journal of cancer* 128 (2), S. 266–274. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-02050-8>.

- Gasparini, P.; Fassan, M.; Cascione, L.; Guler, G.; Balci, S.; Irkkan, C. et al. (2014): Androgen Receptor Status Is a Prognostic Marker in Non-Basal Triple Negative Breast Cancers and Determines Novel Therapeutic Options. In: *PloS one* 9 (2), Artikel e88525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088525>.
- Gemeinsamer Bundesausschuss (2024): *Nutzenbewertungsverfahren zum Wirkstoff Trastuzumab deruxtecán (Mammakarzinom, HER2+, nach 1 Vortherapie)* <https://www.g-ba.de/bewertungsverfahren/nutzenbewertung/864/> [Stand: 05.06.2024]
- Gerdes, J.; Lelle, R. J.; Pickartz, H.; Heidenreich, W.; Schwarting, R.; Kurtsiefer, L. et al. (1986): Growth fractions in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67. In: *Journal of Clinical Pathology* 39 (9), S. 977–980. <https://doi.org/10.1136/jcp.39.9.977>.
- Goldhirsch, A.; Wood, W. C.; Coates, A. S.; Gelber, R. D.; Thürlimann, B.; Senn, H.-J. (2011): Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. In: *Annals of Oncology* 22 (8), S. 1736–1747. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr304>.
- Gucalp, A.; Tolaney, S.; Isakoff, S. J.; Ingle, J. N.; Liu, M. C.; Carey, L. A. et al. (2013): Phase II Trial of Bicalutamide in Patients with Androgen Receptor–Positive, Estrogen Receptor–Negative Metastatic Breast Cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (19), S. 5505–5512. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3327>.
- Hartung, C.; Porsch, M.; Stückerath, K.; Kaufhold, S.; Staeger, M. S.; Hanf, V. et al. (2021): Identifying High-Risk Triple-Negative Breast Cancer Patients by Molecular Subtyping. In: *Breast care (Basel, Switzerland)* 16 (6), S. 637–647. <https://doi.org/10.1159/000519255>.
- Hudis, C. A.; Barlow, W. E.; Costantino, J. P.; Gray, R. J.; Pritchard, K. I.; Chapman, J.-A. W. et al. (2007): Proposal for standardized definitions for efficacy end points in adjuvant breast cancer trials: the STEEP system. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (15), S. 2127–2132. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.10.3523>.
- Jong, V. M. T. de; Wang, Y.; Ter Hoeve, N. D.; Opdam, M.; Stathonikos, N.; Jóźwiak, K. et al. (2022): Prognostic Value of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Young, Node-Negative, Triple-Negative Breast Cancer Patients Who Did Not Receive (neo)Adjuvant Systemic Therapy. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 40 (21), S. 2361–2374. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01536>.
- Jovanović, B.; Sheng, Q.; Seitz, R. S.; Lawrence, K. D.; Morris, S. W.; Thomas, L. R. et al. (2017): Comparison of triple-negative breast cancer molecular subtyping using RNA from matched fresh-frozen versus formalin-fixed paraffin-embedded tissue. In: *BMC cancer* 17 (1), S. 241. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3237-1>.
- Kaufmann, M.; Minckwitz, G. v.; Bear, H. D.; Buzdar, A.; McGale, P.; Bonnefoi, H. et al. (2007): Recommendations from an international expert panel on the use of

neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 18 (12), S. 1927–1934. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm201>.

Lehmann, B. D.; Bauer, J. A.; Chen, X.; Sanders, M. E.; Chakravarthy, A. B.; Shyr, Y.; Pietenpol, J. A. (2011): Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. In: *The Journal of clinical investigation* 121 (7), S. 2750–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>.

Lehmann, B. D.; Jovanović, B.; Chen, X.; Estrada, M. V.; Johnson, K. N.; Shyr, Y. et al. (2016): Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. In: *PloS one* 11 (6), Artikel e0157368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368>.

Li, X.; Yang, J.; Peng, L.; Sahin, A. A.; Huo, L.; Ward, Kevin C. et al. (2017): Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. In: *Breast cancer research and treatment* 161 (2), S. 279–287. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-4059-6>.

Liedtke, C.; Mazouni, C.; Hess, K. R.; André, F.; Tordai, A.; Mejia, J. A. et al. (2008): Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (8), S. 1275–1281. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.4147>.

Lim, B.; Seth, S.; Yam, C.; Huo, L.; Fujii, T.; Lee, J. et al. (2024): Phase 2 study of neoadjuvant enzalutamide and paclitaxel for luminal androgen receptor-enriched TNBC: Trial results and insights into “ARness”. In: *Cell Reports Medicine* 5 (6), Artikel 101595. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101595>.

Lin, N. U.; Claus, E.; Sohl, J.; Razzak, A. R.; Arnaout, A.; Winer, Eric P. (2008): Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases. In: *Cancer* 113 (10), S. 2638–2645. <https://doi.org/10.1002/cncr.23930>.

Loibl, S.; André, F.; Bachelot, T.; Barrios, C. H.; Bergh, J.; Burstein, H. J. et al. (2024): Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 35 (2), S. 159–182. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.11.016>.

Loibl, S.; O'Shaughnessy, J.; Untch, M.; Sikov, W. M.; Rugo, H. S.; McKee, M. D. et al. (2018): Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial. In: *The Lancet. Oncology* 19 (4), S. 497–509. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30111-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30111-6).

Masuda, H.; Baggerly, K. A.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Gonzalez-Angulo, A. M.; Meric-Bernstam, F. et al. (2013): Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. In: *Clinical cancer*

research : an official journal of the American Association for Cancer Research 19 (19), S. 5533–5540. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0799>.

- Masuda, N.; Lee, S.-J.; Ohtani, S.; Im, Y.-H.; Lee, E.-S.; Yokota, I. et al. (2017): Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. In: *The New England journal of medicine* 376 (22), S. 2147–2159. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1612645>.
- Metzger-Filho, O.; Tutt, A.; Azambuja, E.; Saini, K. S.; Viale, G.; Loi, S. et al. (2012): Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (15), S. 1879–1887. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.2010>.
- Miles, D.; Gligorov, J.; André, F.; Cameron, D.; Schneeweiss, A.; Barrios, C. et al. (2021): Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 32 (8), S. 994–1004. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.05.801>.
- Minckwitz, G. v.; Untch, M.; Blohmer, J.-U.; Costa, S. D.; Eidtmann, H.; Fasching, P. A. et al. (2012): Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (15), S. 1796–1804. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.8595>.
- Modi, S.; Jacot, W.; Yamashita, T.; Sohn, J.; Vidal, M.; Tokunaga, E. et al. (2022): Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. In: *The New England journal of medicine* 387 (1), S. 9–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2203690>.
- Oleinika, K.; Nibbs, R. J.; Graham, G. J.; Fraser, A. R. (2012): Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. In: *Clinical and Experimental Immunology* 171 (1), S. 36–45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04657.x>.
- Paijens, S. T.; Vledder, A.; Bruyn, M.; Nijman, H. W. (2021): Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. In: *Cellular & molecular immunology* 18 (4), S. 842–859. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00565-9>.
- Parker, J. S.; Mullins, M.; Cheang, M. C. U.; Leung, S.; Voduc, D.; Vickery, T. et al. (2009): Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (8), S. 1160–1167. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.1370>.
- Park-Simon, T.-W.; Müller, V.; Albert, U.; Banys Paluchowski, M.; Bauerfeind, I.; Blohmer, J.-U. et al. (2024): Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Early Breast Cancer: Update 2024. In: *Breast care (Basel, Switzerland)* 19 (3), S. 165–182. <https://doi.org/10.1159/000538596>.

- Perou, C. M.; Sørlie, T.; Eisen, M. B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S. S.; Rees, C. A. et al. (2000): Molecular portraits of human breast tumours. In: *Nature* 406 (6797), S. 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>.
- Ronckers, C.; Spix, C.; Trübenbach, C.; Katalinic, A.; Christ, M.; Cicero, A. et al. (2023): Krebs in Deutschland für 2019/2020. Robert Koch-Institut.
- Roy, R.; Chun, J.; Powell, S. N. (2011): BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. In: *Nature reviews. Cancer* 12 (1), S. 68–78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181>.
- Salgado, R.; Denkert, C.; Demaria, S.; Sirtaine, N.; Klauschen, F.; Pruneri, G. et al. (2014): The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. In: *Annals of Oncology* 26 (2), S. 259–271. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl450>.
- Sanomachi, T.; Okuma, H. S.; Kitadai, R.; Kawachi, A.; Yazaki, S.; Tokura, M. et al. (2023): Low HER2 expression is a predictor of poor prognosis in stage I triple-negative breast cancer. In: *Frontiers in oncology* 13, Artikel 1157789. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1157789>.
- Santonja, A.; Sánchez-Muñoz, A.; Lluch, A.; Chica-Parrado, M.; Albanell, Joan; Chacón, J. I. et al. (2018): Triple negative breast cancer subtypes and pathologic complete response rate to neoadjuvant chemotherapy. In: *Oncotarget* 9 (41), S. 26406–26416. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25413>.
- Schüler, K.; Bethmann, D.; Kaufhold, S.; Hartung, C.; Stückrath, K.; Lantzsch, T. et al. (2022): Prognostic Value of Tumour-Infiltrating Lymphocytes in an Unselected Cohort of Breast Cancer Patients. In: *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 12 (10), Artikel 2527. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12102527>.
- Shah, S. P.; Roth, A.; Goya, R.; Oloumi, A.; Ha, Gavin; Zhao, Y. et al. (2012): The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. In: *Nature* 486 (7403), S. 395–399. <https://doi.org/10.1038/nature10933>.
- Sørlie, T.; Perou, C. M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H. et al. (2001): Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (19), S. 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>.
- Spano, J.-P.; Costagliola, D.; Katlama, C.; Mounier, N.; Oksenhendler, E.; Khayat, D. (2008): AIDS-related malignancies: state of the art and therapeutic challenges. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (29), S. 4834–4842. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.8252>.
- Stanton, S. E.; Adams, S.; Disis, M. L. (2016): Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. In: *JAMA oncology* 2 (10), S. 1354–1360. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1061>.

- Thompson, K. J.; Leon-Ferre, R. A.; Sinnwell, J. P.; Zahrieh, D. M.; Suman, V. J.; Metzger, F. O. et al. (2022): Luminal androgen receptor breast cancer subtype and investigation of the microenvironment and neoadjuvant chemotherapy response. In: *NAR cancer* 4 (2), Artikel zcac018. <https://doi.org/10.1093/narcan/zcac018>.
- Tolaney, S. M.; Garrett-Mayer, E.; White, J.; Blinder, V. S.; Foster, J. C.; Amiri-Kordestani, L. et al. (2021): Updated Standardized Definitions for Efficacy End Points (STEEP) in Adjuvant Breast Cancer Clinical Trials: STEEP Version 2.0. In: *Journal of Clinical Oncology* 39 (24), S. 2720–2731. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.03613>.
- Traina, T. A.; Miller, K.; Yardley, D. A.; Eakle, J.; Schwartzberg, L. S.; O’Shaughnessy, J. et al. (2018): Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor–Expressing Triple-Negative Breast Cancer. In: *Journal of Clinical Oncology* 36 (9), S. 884–890. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.3495>.
- Tutt, A.N.J.; Garber, J. E.; Kaufman, B.; Viale, G.; Fumagalli, D.; Rastogi, P. et al. (2021): Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1- or BRCA2-Mutated Breast Cancer. In: *The New England journal of medicine* 384 (25), S. 2394–2405. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2105215>.
- Wang, K.; Xu, J.; Zhang, T.; Xue, D. (2016): Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: A meta-analysis. In: *Oncotarget* 7 (28), S. 44288–44298. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9988>.
- Wolff, A. C.; Somerfield, M. R.; Dowsett, M.; Hammond, M. E. H.; Hayes, D. F.; McShane, L. M. et al. (2023): Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 41 (22), S. 3867–3872. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.02864>.
- Yerushalmi, R.; Woods, R.; Ravdin, P. M.; Hayes, M. M.; Gelmon, K. A. (2010): Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. In: *The Lancet. Oncology* 11 (2), S. 174–183. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70262-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70262-1).
- Zhang, H.; Peng, Y. (2022): Current Biological, Pathological and Clinical Landscape of HER2-Low Breast Cancer. In: *Cancers* 15 (1), Artikel 126. <https://doi.org/10.3390/cancers15010126>.
- Zhang, L.; Fang, C.; Xu, X.; Li, A.; Cai, Q.; Long, X. (2015): Androgen receptor, EGFR, and BRCA1 as biomarkers in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. In: *BioMed research international* 2015, S. 357485. <https://doi.org/10.1155/2015/357485>.
- Zitvogel, L.; Kepp, O.; Kroemer, G. (2011): Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 8 (3), S. 151–160. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.223>.

4 Thesen

1. Mittels Genexpressionsanalyse können tripelnegative Mammakarzinome molekularbiologisch in sechs, bzw. vier Subtypen unterteilt werden: TNBCtype-6, TNBCtype-4 (Lehmann et al. 2011; Lehmann et al. 2016).
2. Tripelnegative Tumoren sind nach Einteilung in die intrinsischen Typen nach PAM50 nicht ausschließlich basal-like (88 % basal-like, 12 % nonbasal-like).
3. Die einzelnen molekularbiologischen Subtypen lassen sich in unterschiedliche intrinsischen Typen nach PAM50 einteilen, wobei der LAR-Subtyp den Großteil an nonbasal-like Tumoren ausmacht.
4. Es besteht eine Assoziation der molekularbiologischen Subtypen nach Lehmann sowie der intrinsischen Typen nach PAM50 zu klinischen und histopathologischen Parametern wie Alter, Grading und Nodalstatus. Patientinnen mit Tumoren vom BL1-Subtyp sind häufig jünger, ihre Tumoren eher high-grade, während LAR-Tumoren eher low-grade sind.
5. Tripelnegative Tumoren haben im Vergleich zu HR-negativen und/oder HER2-positiven Tumoren einen höheren Anteil an TILs im Tumorgewebe (72,2 % > 10 % TILs im Tumorgewebe).
6. Der Anteil der TILs im Tumorgewebe variiert innerhalb der molekularbiologischen Subtypen. Nach TNBCtype-6 hat der IM-Subtyp, nach TNBCtype-4 der BL1-Subtyp die meisten TILs.
7. Patientinnen mit TNBC zeigen einen schlechteren Krankheitsverlauf als Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiven Tumoren.
8. Patientinnen mit TNBC haben eine bessere pCR-Rate (48 %) als Patientinnen mit non-TNBC (25 %).
9. Die pCR-Rate unterscheidet sich auch innerhalb der molekularbiologischen Subtypen (LAR 50 %, non-LAR 48 %)

Publikationsteil

Publikation 1:

Hartung, C.; Porsch, M.; Stückrath, K.; Kaufhold, S.; Staeger, M. S.; Hanf, V. et al. (2021): Identifying High-Risk Triple-Negative Breast Cancer Patients by Molecular Subtyping. In: *Breast care (Basel, Switzerland)* 16 (6), S. 637–647.

<https://doi.org/10.1159/000519255>.

Abdruck des Open Access Artikels mit CC-BY Lizenz, Copyright beim Autor. Finale publizierte Version des Artikels verfügbar unter

<https://www.karger.com/?doi=10.1159/000519255>

Mein Beitrag als Autorin: Neben der Vernetzung der einzelnen beteiligten Institute, war ich vor allem für die Organisation der Experimente verantwortlich. Ich habe die Tumorproben in den entsprechenden Pathologien rausgesucht und die Array-Analysen mit Unterstützung der MTLA durchgeführt. Den Krankheitsverlauf der Patientinnen der gesamten PiA-Kohorte komplettiert und im Verlauf immer wieder aktualisiert. Die Ergebnisse der Array-Analysen habe ich in engem Kontakt mit den KollegInnen der Bioinformatik interpretiert sowie nach statistischer Beratung alle Auswertungen selbstständig durchgeführt. Alle Tabellen und Abbildungen habe ich erstellt. Das Manuskript habe ich verfasst und nach Rücksprache mit den KoautorInnen entsprechende Korrekturen vorgenommen.

Publikation 2:

Schüler, K.; Bethmann, D.; Kaufhold, S.; Hartung, C.; Stückrath, K.; Lantsch, T. et al. (2022): Prognostic Value of Tumour-Infiltrating Lymphocytes in an Unselected Cohort of Breast Cancer Patients. In: *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 12 (10), Artikel 2527.

<https://doi.org/10.3390/diagnostics12102527>.

Abdruck des Open Access Artikels mit CC-BY Lizenz mit freundlicher Genehmigung von K. Schüler. Finale publizierte Version des Artikels verfügbar unter

<https://doi.org/10.3390/diagnostics12102527>

Mein Beitrag als Autorin: Wie bei Publikation 1 beschrieben wurden die von mir erhobenen Daten über den Krankheitsverlauf der Patientinnen der PiA-Kohorte für die Auswertung der Experimente dieser Publikation genutzt. Gemeinsam mit der Erstautorin habe ich die Ergebnisse zum Anteil der TILs innerhalb der PiA-TNBC-Kohorte interpretiert und diskutiert. Den Entwurf des Manuskripts der Erstautorin habe ich gelesen, bearbeitet und konstruktive Vorschläge zur Verbesserung angebracht.

Identifying High-Risk Triple-Negative Breast Cancer Patients by Molecular Subtyping

Carolin Hartung^a Martin Porsch^b Kathrin Stückerath^a Sandy Kaufhold^a
Martin S. Staeger^c Volker Hanf^d Tilmann Lantzsch^e Christoph Uleer^f
Susanne Peschel^g Jutta John^h Marleen Pöhlerⁱ Edith Weigert^j
Jörg Buchmann^k Karl-Friedrich Bürrig^l Kathleen Schüler^a Daniel Bethmann^m
Ivo Große^{b,n} Eva Johanna Kantelhardt^a Christoph Thomssen^a
Martina Vetter^a

^aDepartment of Gynecology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany; ^bInstitute of Computer Science, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany; ^cDepartment of Surgical and Conservative Pediatrics and Adolescent Medicine, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany; ^dDepartment of Gynecology, Nathanstift, Hospital Fürth, Fürth, Germany; ^eDepartment of Gynecology, Hospital St. Elisabeth and St. Barbara, Halle (Saale), Germany; ^fGynäkologisch-Onkologische Praxis, Hildesheim, Germany; ^gDepartment of Gynecology, St. Bernward Hospital, Hildesheim, Germany; ^hDepartment of Gynecology, Helios Hospital Hildesheim, Hildesheim, Germany; ⁱDepartment of Gynecology, Asklepios Hospital Goslar, Goslar, Germany; ^jInstitute of Pathology, Hospital Fürth, Fürth, Germany; ^kInstitute of Pathology, Hospital Martha-Maria, Halle (Saale), Germany; ^lInstitute of Pathology Hildesheim, Hildesheim, Germany; ^mInstitute of Pathology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany; ⁿGerman Centre for Integrative Biodiversity Research (iDiv), Halle-Jena-Leipzig, Germany

Keywords

Early breast cancer · Triple-negative breast cancer · Molecular triple-negative breast cancer subtypes · Luminal androgen receptor · Prognosis

Abstract

Introduction: Triple-negative breast cancer (TNBC) is considered the most aggressive type of breast cancer (BC) with limited options for therapy. TNBC is a heterogeneous disease and tumors have been classified into TNBC subtypes using gene expression profiling to distinguish basal-like 1, basal-like 2, immunomodulatory, mesenchymal, mesenchymal stem-like, luminal androgen receptor (LAR), and one non-classifiable group (called unstable). **Objectives:** The aim of this study was to verify the clinical relevance of molecular

subtyping of TNBCs to improve the individual indication of systemic therapy. **Patients and Methods:** Molecular subtyping was performed in 124 (82%) of 152 TNBC tumors that were obtained from a prospective, multicenter cohort including 1,270 histopathologically confirmed invasive, non-metastatic BCs (NCT 01592825). Treatment was guideline-based. TNBC subtypes were correlated with recurrence-free interval (RFI) and overall survival (OS) after 5 years of observation. **Results:** Using PAM50 analysis, 87% of the tumors were typed as basal with an inferior clinical outcome compared to patients with nonbasal tumors. Using the TNBC-type-6 classifier, we identified 23 (15%) of TNBCs as LAR sub-

C. Hartung and M. Porsch contributed equally. C. Thomssen and M. Vetter are joint senior authors.

type. After standard adjuvant or neoadjuvant chemotherapy, patients with LAR subtype showed the most events for 5-year RFI (66.7 vs. 80.6%) and the poorest probability of 5-year OS (60.0 vs. 84.4%) compared to patients with non-LAR disease (RFI: adjusted hazard ratio [aHR] = 1.87, 95% confidence interval [CI] 0.69–5.05, $p = 0.211$; OS: aHR = 2.74, 95% CI 1.06–7.10, $p = 0.037$). **Conclusion:** Molecular analysis and subtyping of TNBC may be relevant to identify patients with LAR subtype. These cancers seem to be less sensitive to conventional chemotherapy, and new treatment options, including androgen receptor-blocking agents and immune checkpoint inhibitors, have to be explored.

© 2021 The Author(s).
Published by S. Karger AG, Basel

Introduction

Triple-negative breast cancer (TNBC) comprises 10–15% of newly diagnosed invasive breast cancers (BCs). TNBC is characterized by lack of expression of estrogen receptor (ER), lack of progesterone receptor (PR), and lack of expression or amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). The steroid hormone receptor status and HER2 status of tumors are routinely determined at the time of diagnosis by histopathology. Therapeutic decisions are based on status information according to current guidelines. Compared to patients with hormone receptor-positive cancers, TNBC patients are often younger, their tumors are larger in size, and triple-negative cancers are more likely of undifferentiated grading [1].

Both the biology of TNBC and the clinical course of the disease are characterized by a strong heterogeneity [2]. This heterogeneity is probably caused by a rather high rate of somatic mutations and genetic instabilities followed by differential gene expression [3]. Patients with no residual invasive disease in breast and lymph nodes after conventional neoadjuvant chemotherapy (NACT), defined as pathological complete responders, have a high likelihood of cure. In contrast, for those with a generally poor prognosis, TNBC patients without pathological complete response (pCR) can be offered additional post-neoadjuvant therapies after surgery, such as capecitabine, but with limited effect [4]. Hence, there is an urgent medical need to identify those TNBC patients who are at very high risk of recurrence and who may benefit from additional therapy [5].

Roughly 75% of TNBCs are classified as basal tumors based on respective gene expression signatures [6, 7]. Most of the remaining TNBC tumors represent a non-basal intrinsic expression pattern, mostly HER2-enriched, followed by Luminal B and Luminal A [8]. Focusing on TNBC tumors as a clinically heterogeneous group, Lehmann et al. [9] used gene expression profiles from 14

public data sets and identified 18% of cases with TNBCs. Furthermore, the authors defined six stable subtypes, all of which could be identified by specific biological pathways, and one unstable group (UNS), which included all samples that could not be allocated to one of the six stable subtypes [10]. The basal-like 1 (BL1) subtype is marked by genes involved in cell cycle and cell division pathways as well as in DNA damage response. Basal-like 2 (BL2) is associated with growth factor enrichment. These two basal-like subtypes show a high rate of mutations. The mesenchymal (M) subtype is characterized by genes involved in cell motility, extracellular receptor interaction, and cell differentiation. The luminal androgen receptor (LAR) subtype could be identified by genes involved in hormonally regulated pathways, including steroid synthesis as well as androgen and estrogen metabolism. The remaining two subtypes are the mesenchymal stem-like (MSL) subtype that expresses genes involved in cell motility and processes of epithelial to mesenchymal transition, and the immunomodulatory (IM) subtype characterized by immune cell signaling. Both subtypes were excluded from the subtyping TNBCtype-6 classifier, arguing that their signatures may originate from cancer-associated stromal and immune cells (e.g., tumor-infiltrating lymphocytes [TILs]) rather than from cancer cells directly. This led to the condensed TNBCtype-4 classifier with four stable subtypes (BL1, BL2, M, and LAR) [11]. The web-based TNBC subtyping tool (<https://cbc.app.vumc.org/tNBC/>) can be used for calculation of subtype-specific coefficients and p values which can be used for classification of TNBC samples according to the TNBCtype-6 and TNBCtype-4 classifier [12].

Applying these classifications, TNBC subtypes show different responses to NACT and are associated with different clinical outcomes [11, 13]. The BL1 subtype has the highest pCR rate, BL2 and LAR the lowest [14]. As there are several ways to split TNBC into subgroups, currently molecular approaches may help to overlook the diversity of this heterogeneous disease [15].

We designed a multicenter study ($n = 1,270$; NCT 01592825) to evaluate the clinical, histopathological, and biological markers of BC in routine clinical care [16–18]. Here, we focused on patients with TNBC ($n = 152$, 12% of the total BC cohort) to assess whether molecular subtyping would uncover the heterogeneity of TNBC in our patient cohort as a prerequisite to potentially integrate this information into clinical routine. To this end, we applied recurrence-free interval (RFI) and overall survival (OS) as endpoints and found that the classifier was indeed helpful in subtyping TNBC tumors and identifying patients with LAR tumors at particularly high risk. The ultimate goal of this approach is to hopefully improve the tailoring of treatment.

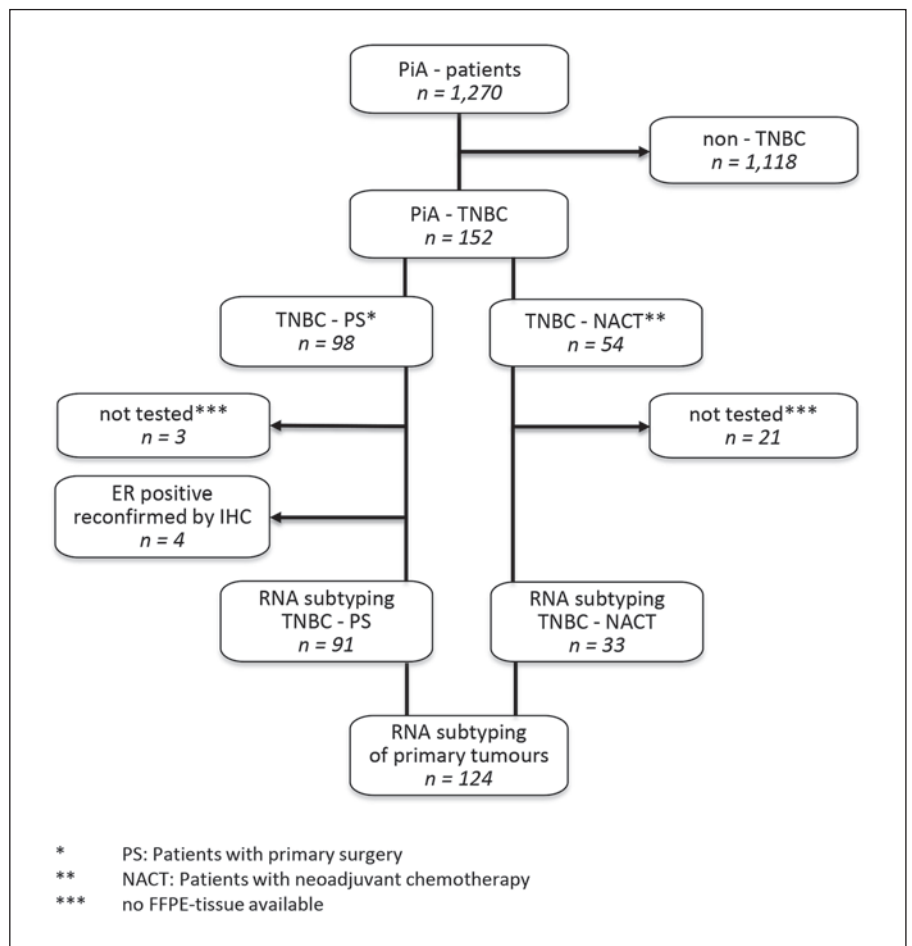


Fig. 1. Enrolment of TNBC patients ($n = 152$) of the PiA cohort ($n = 1,270$) and RNA samples for molecular subtyping ($n = 124$). TNBC, triple-negative breast cancer.

Subjects and Methods

Study Design, Patients, and Tumors

We designed a prospective and unselected cohort of early BC patients in accordance with the REMARK recommendations for prognostic markers [19]. Between 2009 and 2011, 1,270 patients from five certified breast cancer centers in Germany were enrolled in the PiA study (Prognostic Assessment in Routine Application; NCT 01592825). Patients were consecutively included at the time of diagnosis and received either primary surgery ($n = 1,070$) or neoadjuvant treatment before surgery ($n = 200$). All procedures for diagnosis and treatment were applied according to the annually updated German AGO Guideline valid at the respective time (<https://www.ago-online.de/leitlinien-empfehlungen/leitlinien-empfehlungen/kommission-mamma>).

Patients were recruited if the following inclusion criteria were met: female, invasive, nonmetastasized BC; aged 18 years or older, any tumor size, lymph node involvement, grading or receptor status (ER, PR, HER2) available. Patients with nonbreast second cancers were excluded. Tumors were staged according to the Union for International Cancer Control TNM rules [20] and graded according to Elston and Ellis [21]. TNBC was diagnosed using formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor material from surgical excision on primary surgery or from core needle biopsies before neoadjuvant treatment. Local pathology results were used. According to respective guideline recommendations, tumors staining for ER and PR protein expression in <1% of tumor cells or having an immune reactivity score <2 [22, 23] were considered

hormone receptor-negative. HER2 status was determined applying the DAKO score and, if necessary, by in situ hybridization (ISH) [24]. Applying the recommendations of the International TILs Working Group [25], the tumors were classified using H&E staining according to the percentage of tumor stroma covered by TILs, including the invasive margin (<10%, 10–60%, >60%). TILs outside the tumor border, necrosis, and tertiary lymphoid structures were not considered [25].

In the total cohort of 1,270 patients, TNBC was diagnosed in 152 patients, and molecular subtyping was performed with 124 tumors (Fig. 1, GEO accession number GSE167213). Due to old age or frailty, 10 TNBC patients (6.6%) did not receive any chemotherapy. These patients were included into the subtyping analysis, but excluded from all survival analyses.

Following NACT, pCR was defined as the absence of invasive cancer (ypT0/Tis ypN0) [26], and “total pCR” was used for the stricter definition of no cancer cells at all (ypT0 ypN0, total pCR) in breast and axilla at the time of surgery.

Patient and Tumor Characteristics

The median age of patients in the TNBC cohort was 56 years; 37% were younger than 51 years at the time of diagnosis compared to 24% in the non-TNBC group. Seventy percent of the TNBC tumors were larger than 2 cm compared to 47% in non-TNBC cases. Axillary involvement was 49 and 37%, respectively, and tumors were undifferentiated (G3) in 60 and 20%, respectively.

The distribution of patient characteristics, as well as the histopathological parameters of those TNBC tumors that were studied

Table 1. Patient characteristics and histopathological parameters of the tumors used for subtyping

Parameters	TNBC all (n = 152)	TNBC and subtyping (n = 124)	TNBC chemotherapy and subtyping (n = 115)	TNBC primary surgery (n = 98)	TNBC primary surgery and subtyping (n = 91)	TNBC NACT (n = 54)	TNBC NACT and subtyping (n = 33)
<i>Age at diagnosis</i>							
<35 years	11 (7%)	8 (6%)	8 (7%)	5 (5%)	5 (5%)	6 (11%)	3 (10%)
35–50 years	45 (30%)	35 (28%)	35 (30%)	22 (23%)	20 (22%)	23 (43%)	15 (45%)
51–75 years	74 (49%)	60 (49%)	58 (51%)	50 (51%)	45 (50%)	24 (44%)	15 (45%)
>75 years	22 (14%)	21 (17%)	14 (12%)	21 (21%)	21 (23%)	1 (2%)	0 (0%)
p value, χ^2		0.280 ^a	0.535 ^a	0.433 ^b		0.559 ^b	
<i>Tumor histology</i>							
Ductal (NST)	131 (86%)	106 (86%)	98 (85%)	82 (84%)	75 (83%)	49 (91%)	31 (94%)
Lobular	7 (5%)	4 (3%)	4 (4%)	2 (2%)	2 (2%)	5 (9%)	2 (6%)
Others	14 (9%)	14 (11%)	13 (11%)	14 (14%)	14 (15%)	0 (0%)	0 (0%)
p value, χ^2		0.050 ^a	0.165 ^a	0.479 ^b		0.309 ^b	
<i>Tumor size at time of diagnosis</i>							
<2 cm	46 (30%)	41 (33%)	39 (34%)	43 (44%)	38 (42%)	3 (6%)	3 (9%)
2–5 cm	84 (55%)	68 (55%)	61 (53%)	50 (51%)	48 (53%)	34 (63%)	20 (61%)
>5 cm	22 (15%)	15 (12%)	15 (13%)	5 (5%)	5 (5%)	17 (31%)	10 (30%)
p value, χ^2		0.111 ^a	0.205 ^a	0.296 ^b		0.364 ^b	
<i>Nodal status at time of diagnosis</i>							
Negative	77 (51%)	64 (52%)	58 (51%)	58 (59%)	45 (59%)	19 (35%)	10 (30%)
Positive	75 (49%)	60 (48%)	57 (49%)	40 (41%)	37 (41%)	35 (65%)	23 (70%)
p value, χ^2		0.620 ^a	0.923 ^a	0.909 ^b		0.346 ^b	
<i>Tumor differentiation</i>							
G1	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)
G2	60 (39%)	50 (40%)	46 (40%)	36 (37%)	32 (35%)	24 (44%)	18 (55%)
G3	91 (60%)	73 (59%)	68 (59%)	61 (62%)	58 (64%)	30 (56%)	15 (45%)
p value, χ^2		0.794 ^a	0.820 ^a	0.500 ^b		0.061 ^b	
Parameters	TNBC all (n = 133)	TNBC and subtyping (n = 124)	TNBC chemotherapy and subtyping (n = 115)	TNBC primary surgery (n = 95)	TNBC primary surgery and subtyping (n = 91)	TNBC NACT (n = 38)	TNBC NACT and subtyping (n = 33)
<i>TILs</i>							
<10%	37 (28%)	34 (28%)	31 (27%)	23 (24%)	21 (23%)	14 (37%)	13 (39%)
10–60%	71 (53%)	66 (53%)	60 (52%)	51 (54%)	49 (54%)	20 (53%)	17 (52%)
>60%	25 (19%)	24 (19%)	24 (21%)	21 (22%)	21 (23%)	4 (10%)	3 (9%)
p value, χ^2		0.812 ^a	0.312 ^a	0.353 ^b		0.608 ^b	

Values are n (%) unless indicated otherwise. NACT, neoadjuvant chemotherapy; TNBC, triple-negative breast cancer. ^a The p value describes the difference of parameters to all TNBCs (n = 152). ^b The p value describes the difference of parameters within the groups (n = 91 vs. n = 98 and n = 33 vs. n = 51).

for molecular subtypes, was not statistically different (χ^2) from the entire TNBC cohort. With regard to TIL evaluation, the TNBC cohort contained more frequent high infiltration than the non-TNBC cohort [27], and over half of the TNBC tumors (53%) were assigned to the intermediate group with 10–60% TILs, 28% to the low group, and 19% to the high group.

While two-thirds of TNBC patients received primary surgery (n = 98), 54 patients had surgery after NACT, with significant differences for age, tumor size, and nodal status: 28 and 54% were younger than 51 years, respectively; 56 and 94% had tumors larger than 2 cm, respectively; and 41 and 65% were node-positive, respectively (important parameters are summarized in Table 1). Most of the TNBC patients treated with chemotherapy (n = 142)

received taxane-anthracycline combination (67%, n = 96), 13% (n = 18) anthracycline-free taxane-based chemotherapy, and 20% (n = 28) anthracycline-based chemotherapy.

Endpoints and Outcome Assessment

We chose RFI as the first endpoint applying the Standardized Definitions of Efficacy Endpoints criteria [28] which consider local invasive recurrence, distant recurrence, and death from BC as events. The second endpoint was OS (death from BC, non-BC cause, and unknown causes). The median observation time was 63 months (9–88 months). For all survival analyses, only patients treated with chemotherapy were considered (n = 115, Table 1).

Table 2. Patient characteristics and histopathological parameters of the tumors distributed into subtypes by TNBCtype-6 and PAM50 classification ($n = 115$)

Parameters	TNBC (IHC)	TNBC molecular subtypes							PAM50	
	TNBC chemotherapy & subtyping ($n = 115$) (100%)	BL1 ($n = 20$) (17%)	BL2 ($n = 14$) (12%)	IM ($n = 27$) (24%)	M ($n = 15$) (13%)	MSL ($n = 5$) (4%)	LAR ($n = 15$) (13%)	UNS ($n = 19$) (17%)	basal ($n = 100$) (87%)	nonbasal ($n = 15$) (13%)
<i>Age at diagnosis</i>										
≤50 years	41 (100%)	12 (30%)^a	5 (12%)	9 (22%)	3 (7%)	0 (0%)	5 (12%)	7 (17%)	37 (90%)	4 (10%)
>50 years	74 (100%)	8 (11%)	9 (12%)	18 (24%)	12 (16%)	5 (7%)	10 (14%)	12 (16%)	63 (85%)	11 (15%)
<i>Tumor size at time of diagnosis</i>										
<2 cm	39 (100%)	6 (15%)	3 (8%)	10 (26%)	5 (13%)	4 (10%)	6 (15%)	5 (13%)	32 (82%)	7 (18%)
≥2 cm	76 (100%)	14 (19%)	11 (14%)	17 (22%)	10 (13%)	1 (1%)	9 (12%)	14 (19%)	68 (89%)	8 (11%)
<i>Nodal status at time of diagnosis</i>										
Negative	58 (100%)	12 (21%)	6 (10%)	16 (27%)	9 (16%)	5 (9%)	6 (10%)	4 (7%)	50 (86%)	8 (14%)
Positive	57 (100%)	8 (14%)	8 (14%)	11 (19%)	6 (11%)	0 (0%)	9 (16%)	15 (26%)	50 (88%)	7 (12%)
<i>Tumor differentiation</i>										
G1, G2	47 (100%)	2 (4%)^b	6 (13%)	10 (21%)	7 (15%)	3 (6%)	12 (26%)^b	7 (15%)	36 (77%)^b	11 (23%)^b
G3	68 (100%)	18 (26%)	8 (12%)	17 (25%)	8 (12%)	2 (3%)	3 (4%)	12 (18%)	64 (94%)	4 (6%)
<i>TILs</i>										
<10%	31 (100%)	5 (16%)	2 (67%)	1 (3%)^c	9 (29%)	0 (0%)	9 (29%)^c	5 (16%)	23 (74%)^c	8 (26%)^c
10–60%	60 (100%)	11 (18%)	12 (20%)	10 (17%)	6 (10%)	5 (8%)	5 (8%)	11 (18%)	54 (90%)	6 (10%)
>60%	24 (100%)	4 (17%)	0 (0%)	16 (66%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	3 (13%)	23 (96%)	1 (4%)

Values are n (%). Bold indicates statistical significance. BL1, basal-like 1; BL2, basal-like 2; IHC, immunohistochemistry; IM, immunomodulatory; LAR, luminal androgen receptor; M, mesenchymal; MSL, mesenchymal stem-like; TILs, tumor-infiltrating lymphocytes; TNBC, triple-negative breast cancer; UNS, unstable. ^a Pearson's χ^2 test with Yates continuity correction. ^b Fisher's exact test (cell frequency <5). ^c Pearson's χ^2 test.

Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out by using SPSS 25 (IBM, Armonk, NY, USA) including the subtype-specific probability of RFI and OS of the patients. Survival curves were generated as Kaplan-Meier estimates, differences described by log-rank test and Cox regression model were applied to calculate hazard ratios for selected parameters with 95% confidence intervals (CIs), and p values <0.05 were defined as significant. Only cases with information for all covariates (including chemotherapy) were taken into account for all survival analyses.

Microdissection and RNA Extraction

After identification of the tumor areas on H&E-stained slides by the pathologist, 3–5 adjacent unstained tumor slices (10 μ m) were processed for RNA isolation using the miRNeasy FFPE kit (Qiagen, Hilden, Germany). The DNA microarray analysis was started with a standard amount of 25 ng RNA.

DNA Microarray Analysis and Gene Expression Profiling

The GeneChip 3'IVT Pico Reagent Kit was used for sample preparation followed by hybridization on HG U133 Plus 2.0 microarrays (both Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems, formerly known as Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) applying standard protocols. Raw data were imported using the simpleaffy R package [29] using the "robust multi-array average" normalization [30]. From this point onwards, all further analyses were conducted with log₂ expression values. For probe set annotation the bioconductor package hgu133plus2.db was used [31]. Gene expression was estimated by averaging the expression of all

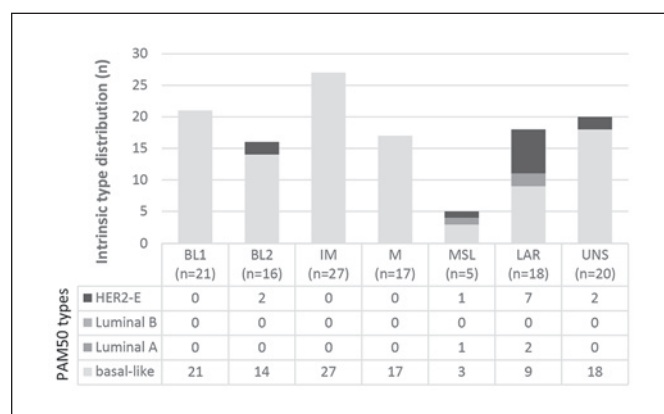


Fig. 2. TNBC subtypes correlated with PAM50 intrinsic molecular types ($n = 124$). TNBC, triple-negative breast cancer.

probe sets targeting the same gene. Please note that taking the arithmetic mean of the logarithms is equivalent to taking the geometric mean of the original expression values.

TNBCtype and PAM50 Subtyping

Gene expression values were entered into the TNBCtype online analysis tool [12], and correlation results were used to compute TNBCtype-6 classifications [9]. Considering stromal tissue including TILs [32], we used TNBCtype-6 for the main analyses [9].

Additional analyses were made for TNBCtype-4. To do so, we determined the highest correlation of the subtypes and requested according to the TNBCtype classification (1) a minimum correlation coefficient of 0.1, (2) a p value <0.05 , and (3) a difference of at least 0.05 from the best correlation coefficient to the second-best coefficient if this value also conformed to (2). PAM50 intrinsic subtypes [33] were calculated in R. Bias correction for our pure TNBC study cohort was performed according to Zhao et al. [34].

Results

Molecular Subtyping and Clinical and Histopathological Differences in the TNBC Subtypes and PAM50 Intrinsic Types

Microarray analysis was feasible in 84% of the TNBC tumors (128 of 152) (Fig. 1). Molecular subtyping was performed for 97% of the FFPE RNAs from surgical and for 61% from core needle biopsy material. Most failures were caused by missing FFPE blocks or no remaining tumor tissue in the FFPE blocks (mostly affecting the core needle biopsies). Four tumors were reclassified as ER-positive based on the gene expression results and were excluded from further analyses after confirmation by immunohistochemistry (IHC). Finally, 124 tumors (82%) were successfully classified by TNBCtype-6 into BL1 (17%, $n = 21$), BL2 (13%, $n = 16$), M (14%, $n = 17$), MSL (4%, $n = 5$), IM (22%, $n = 27$), LAR (15%, $n = 18$), and UNS (16%, $n = 20$) (online suppl. Table 2; see www.karger.com/doi/10.1159/000519255 for all online suppl. material). The same tumors were classified according to TNBCtype-4 into BL1 (29%, $n = 36$), BL2 (20%, $n = 25$), M (16%, $n = 20$), LAR (20%, $n = 24$), and UNS (15%, $n = 19$) (online suppl. Table 2).

BL1 tumors were significantly less differentiated, and in this group were the youngest patients. Most of the LAR tumors (80%) were significantly better differentiated compared to non-LAR tumors (10–60%) and the intrinsic nonbasal group better than the basal group (73 vs. 36%). Although not significant, there was an enrichment of lymph node metastases in LAR and BL2 patients. As for the evaluation of TILs, the IM group was the subtype showing significantly the highest TIL proportion with $>60\%$ TILs. Conversely, LAR was the subtype with the significantly fewest TILs. We further classified the TNBC tumors into the PAM50 intrinsic types, classifying the majority of TNBCs as basal ($n = 109$ of 124, 88%). This is in accordance with previous reports [11] also reported from our group [35]. The distribution of the parameters in the distinct molecular subtypes and in the intrinsic types is summarized in Table 2, considering patients who underwent chemotherapy.

Details of the distribution of the nonbasal subtypes are shown in Figure 2. All BL1, IM, and M subtypes were PAM50 basal; amongst the BL2, MSL, and LAR types a

variable proportion of nonbasal tumors was detected. Importantly, most of these nonbasal tumors were significantly well-differentiated, had fewer TILs, and expressed the LAR profile (9 of 15). Two of nonbasal LAR tumors ($n = 9$) were Luminal A and 7 were HER2-enriched. For 6 of the 7 HER2-enriched tumors, by IHC low HER2 expression (DAKO 1 or 2, chromogenic ISH negative) was reported. In comparison, in non-LAR tumors we found weak HER2 protein expression less frequently (71% in LAR vs. 20% in non-LAR tumors). Neither tumor size nor nodal status were associated with the PAM50 intrinsic types.

Clinical Outcome and LAR Subtype

With a median observation time of 61 months, 107 patients of all TNBCs with chemotherapy were recurrence-free (RFI 74.9%, 95% CI 67.6–82.2) and 77.1% were still alive (95% CI 70.0–84.2).

Patients with LAR subtype, although treated with chemotherapy ($n = 15$), experienced the worst clinical outcome, visualized by Kaplan-Meier plots in Figure 3A and B. Free of an RFI event were 66.7% patients with LAR subtype (95% CI 42.8–90.6) compared to 80.6% (95% CI 72.8–88.4) in the non-LAR TNBC group ($n = 100$). These results were not significant for RFI but significant for OS (Fig. 3C, D). We showed a nearly doubled risk for RFI of the LAR versus the non-LAR group even if adjusted for tumor size and nodal status (adjusted hazard ratio [aHR] 1.87, 95% CI 0.60–5.05, $p = 0.211$). The LAR subtype was a significant, independent predictor for OS (aHR 2.74, 95% CI 1.06–7.10, $p = 0.037$) (Table 3). These subtype results demonstrate a distinct clinical course of patients within the TNBC group. Patients with a LAR nonbasal tumor showed a better outcome than patients with a LAR basal tumor, significant for OS (online suppl. Fig. 1).

Androgen receptor mRNA levels were correlated to subtypes with the highest expression in LAR subtype [36] and associated with low MKI67 transcript levels (Fig. 4A, B).

pCR and Subtypes

The pCR rate (ypT0/Tis ypN0) was 48% (26 of 54 patients) (online suppl. Table 1); 80.0% (95% CI 64.3–95.7) of them had no disease-specific event. Due to the small number of core needle biopsies with subtyping results before NACT ($n = 33$), no significant association could be found between TNBC subtypes and pCR. We emphasize that the best chemosensitivity as demonstrated by no residual invasive tumor tissue in the breast and axilla was observed in the IM subtype (4 of 6). No residual disease after NACT was diagnosed in 45% (13 of 29) of the patients with non-LAR subtype and in only 25% (1 of 4) of the patients with LAR subtype.

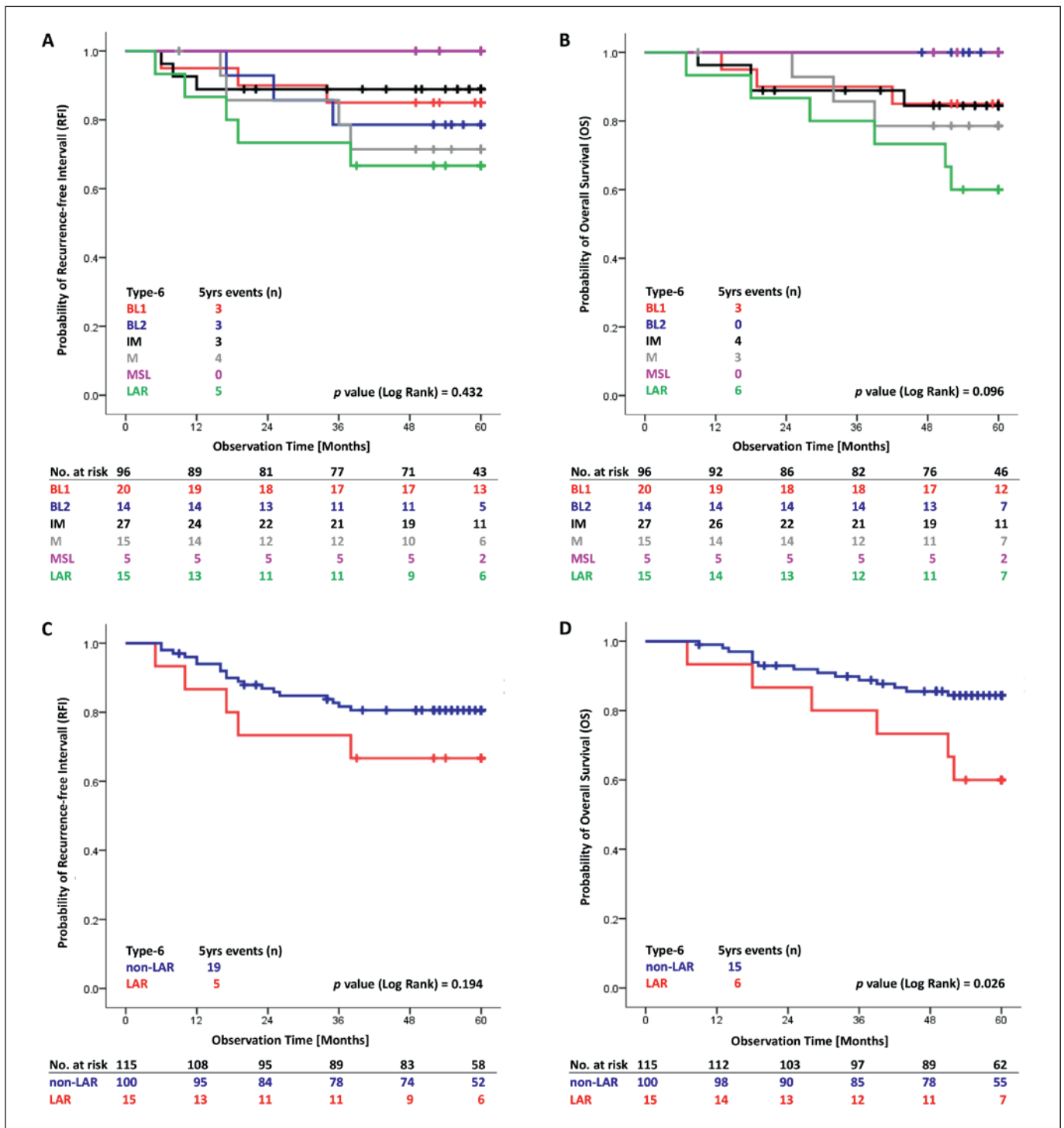


Fig. 3. TNBCtype-6 Kaplan-Meier plots. The tables present the effective sample size for each interval (number at risk). **A, B** All subdivided stable subtypes RFI (**A**) and OS (**B**). **C, D** Summarized groups LAR versus non-LAR subtypes RFI (**C**) and OS (**D**). LAR, luminal androgen receptor; OS, overall survival; RFI, recurrence-free interval.

Discussion

In this study, we evaluated the distribution of TNBC-type-6 subtypes according to Lehmann et al. [9], also displaying the heterogeneity of the outcome (RFI, OS) of the TNBC patients.

Firstly, we successfully classified 84% of triple-negative tumors of an unselected clinical cohort ($n = 124$ of 152 TNBCs, total BC cohort $n = 1,270$). The array experiments and the subsequent subtyping was performed with each prepared RNA. None of the immunohistochemically detected TNBC tumors were classified as

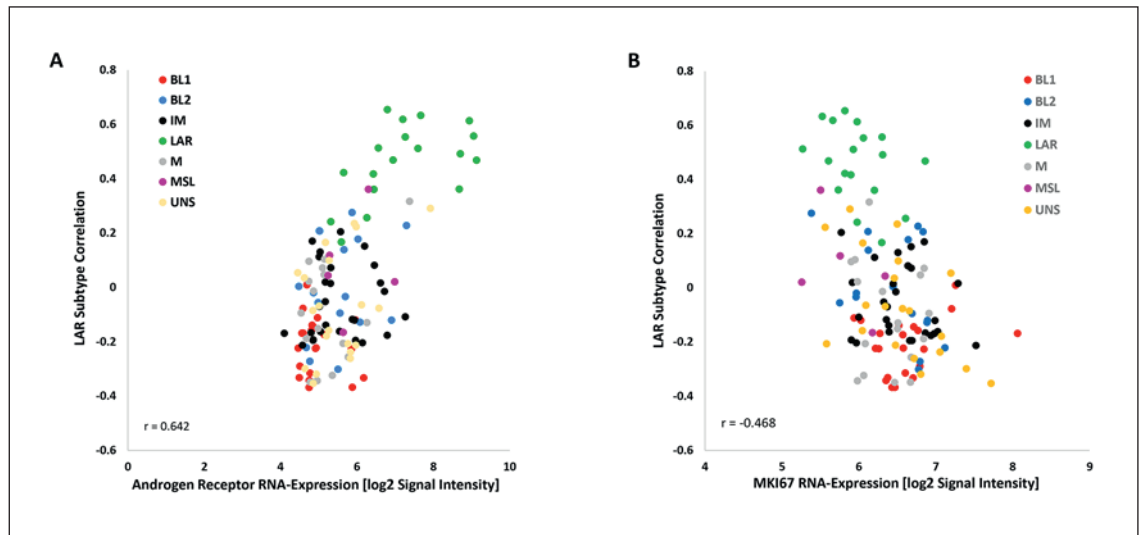


Fig. 4. Correlation of androgen receptor (A) and MKI67 (Ki-67) (B) RNA expression to LAR subtype ($n = 124$). LAR, luminal androgen receptor.

Table 3. Multivariate analysis of RFI and OS for TNBC patients with chemotherapy and available TNBCtype-6 subtyping ($n = 115$)

Parameters	RFI (24 events)						OS (21 events)					
	univariate analysis			multivariate analysis			univariate analysis			multivariate analysis		
	HR	95% CI	<i>p</i> value	HR	95% CI	<i>p</i> value	HR	95% CI	<i>p</i> value	HR	95% CI	<i>p</i> value
<i>Age at diagnosis</i>												
≤50 years	1.24	0.53–2.93	0.618				1.22	0.44–3.36	0.705			
51–75 years	ref.											
>75 years	1.16	0.32–4.15	0.082				3.48	1.20–10.04	0.021			
<i>Tumor size at time of diagnosis</i>												
<2 cm	ref.											
≥2 cm	4.03	1.20–13.50	0.024	3.30	0.95–11.41	0.059	5.46	1.27–23.44	0.022	3.95	0.89–17.54	0.071
<i>Nodal status at time of diagnosis</i>												
Negative	ref.											
Positive	2.74	1.13–6.60	0.025	2.05	0.83–5.08	0.119	4.73	1.59–14.07	0.005	3.32	1.08–10.14	0.035
<i>Tumor differentiation</i>												
G1, G2	ref.											
G3	0.49	0.22–1.09	0.082				0.63	0.27–1.49	0.293			
<i>TNBCtype-6</i>												
Non-LAR	ref.											
LAR	1.89	0.70–5.07	0.204	1.87	0.69–5.05	0.211	2.79	1.08–7.20	0.033	2.74	1.06–7.10	0.037

CI, confidence interval; HR, hazard ratio; LAR, luminal androgen receptor; OS, overall survival; ref., reference group; RFI, recurrence-free interval; TNBC, triple-negative breast cancer.

mRNA-ER-positive, as reported elsewhere [37], indicating high quality of the IHC/chromogenic ISH tests performed in the respective peripheral pathology centers. The reliable group segregation might be a consequence of the application of a lower cutoff for hormone receptor negativity (<1% stained cancer cells, immune reactivity score <2). The four reconfirmed ER-positive samples

(Fig. 1) were excluded from all subtyping and survival analyses.

Secondly, using both TNBC classifiers (TNBCtype-6, TNBCtype-4), the subtype distribution was very similar to reports by other investigators [9, 38]. The IM subtype was most frequent (26% by excluding the UNS subtype; online suppl. Table 2). These tumors are enriched in

genes linked to immune processes, also seen in our cohort with 57% with a high TIL score (16 of 28 of the IM samples; online suppl. Fig. 2A). Applying the condensed TNBCtype-4 classifier (online suppl. Fig. 2B), 66% of the IM samples (by TNBCtype-6) switched to the BL1 group (online suppl. Fig. 2C), suggesting a more favorable prognosis. Excluding the unclassifiable tumors by definition (see Subjects and Methods), we found that by TNBCtype-6 analysis more than one-third were BL1 and BL2 (combined 35%), 16% M, 17% LAR, and MSL was under-represented (5%) (online suppl. Table 2), which is in line with other studies [38, 39].

Thirdly, each TNBC subtype showed a distinct clinical outcome for RFI and OS. As mentioned before, 15% of the TNBC samples of our study expressed the LAR profile by the TNBCtype-6 and 20% by the TNBCtype-4 classifier, representing 2% of all BCs in our cohort, as also shown by other studies [38–40]. Compared to the non-LAR group, patients with LAR subtype suffered the highest number of events with an adjusted 1.87-fold trend (aHR) for local recurrence, distant metastasis, and death caused by BC. We further emphasize a significant aHR of 2.74 of death for the LAR group compared to the non-LAR group classified by TNBCtype-6. Applying the TNBCtype-4 classifier we determined an aHR of 1.74 for RFI and a significant aHR of 2.62 for OS for the LAR subtype (online suppl. Table 3 and Fig. 3).

Fourthly, as expected, the PAM50 classification predominantly clustered intrinsic basal type (88%), followed by HER2-enriched (10%) and Luminal A (2%) (for a review, see Lehmann and Pietenpol [10]). Focusing on non-basal tumors ($n = 15$), 9 of them belonged to the LAR subtype, which is in line with published data, e.g., Masuda et al. [13]. Most of them (78%, 7 of 9) showed HER2-enriched profiling (Fig. 2) as also reported by Prat et al. [37] (20 of 28, 71%). For clinical practice, it could be of relevance that immunohistochemically clinical HER2-negative (DAKO 1 or 2, chromogenic ISH negative) tumors might still be sensitive to anti-HER2 therapy. These special TNBC groups can be identified by TNBC subtyping and additional PAM50 intrinsic classification using the same RNA expression data of the tumor.

Combining molecular TNBC subtyping and PAM50 classification, we identified six of 15 LAR tumors as LAR-basal and the patients as the group with most events for RFI or OS (50%, 95% CI 10–90, 3 events and 33.3%, 95% CI <1–70.9, 4 events, respectively). These patients have a three times (3.28) higher risk of inferior RFI ($p = 0.172$) and a 5.39 times higher risk of inferior OS ($p = 0.034$).

As previously reported by other authors, LAR tumors are characterized by low MKI67 mRNA expression (Fig. 4B) and intermediate grading as an indicator for low proliferation and pronounced chemoresistance [41]. Also, Witzel et al. [42] figured out that low chemotherapy

response can be predicted by high androgen receptor mRNA expression that is overexpressed in the LAR subtype (Fig. 4A). In a phase I/II study, metastasized patients with a positive androgen receptor status at mRNA level benefited from anti-androgen receptor-hormonal therapy, so that may be an option to bypass chemoresistance and to de-escalate chemotherapy [36]. Considering the unfavorable prognosis of patients with LAR subtype, a combination of immune checkpoint inhibitors and androgen receptor-inhibiting treatment should also be studied [43].

Last, residual disease after NACT predicts inferior outcome [44]. Also, patients in our study without pCR suffered from worse RFI or OS compared to patients with pCR.

Even taking into account the limitations of low case numbers with subtyping data, a better pCR rate can be predicted for the non-LAR group than for the LAR group. Hence, patients with LAR subtype and residual disease showed the worst outcome for RFI and OS.

Some notable strengths of our study should be mentioned. In comparison to other studies, we analyzed a clinical cohort of patients rather than data from a web-based data repository. TNBC patients were consecutively and routinely enrolled in our prospective, unselected multicenter cohort evaluating prognostic factors safeguarding a well-documented follow-up. Our TNBC group showed characteristics representative of a typical TNBC population with respect to age, tumor size, nodal status, and grading [45]. For all survival analyses, we exclusively included patients treated with chemotherapy.

There are some limitations. Patients were treated at the discretion of the local tumor boards of the participating certified breast centers, but decisions were based on current national guideline recommendations. There is only a small sample size of patients treated with NACT, so no meaningful response and survival analyses for this subgroup could be performed. Due to the retrospective analysis of TNBC subtyping, only 82% of the FFPE blocks for RNA preparation were still available for this retrospective analysis.

Conclusion

TNBC subtyping using RNA profiling data that were generated in a clinical routine setting is feasible and differentiates TNBC patients into groups with distinct clinical outcomes. We found a clear trend for the LAR subtype as a predictor for worse RFI and OS. Since these cancers appear to be less sensitive to standard adjuvant chemotherapy new treatment options, androgen receptor-blocking agents and immune checkpoint inhibitors have to be explored.

Outlook

TNBC remains the challenge of BC treatment. There is further merit in prospective validation of pCR rates amongst TNBC subtypes and correlation with clinical outcomes of these neoadjuvantly treated patients. It appears clinically relevant to identify patients with the LAR subtype, since these cancers are less sensitive to chemotherapy and require other options.

Acknowledgements

We thank all patients participating the PiA study as well as the study nurses Katrin Losse (St. Elisabeth and St. Barbara Halle), Birgit Mauder (Fürth), and Andrea Meyer-Kühn (Hildesheim) for excellent documentation. We thank the core facility Cellular Analysis of our medical faculty, specifically Vesselin Christov providing the Affymetrix chip platform.

Statement of Ethics

The study complied with the guidelines for human studies and was conducted in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethical Board of the Medical Faculty of Martin Luther University Halle-Wittenberg (#214/16.12.09/11). All patients provided written informed consent.

Conflict of Interest Statement

C. Hartung, M. Porsch, K. Stückrath, S. Kaufhold, M.S. Staeger, V. Hanf, S. Peschel, J. John, M. Pöhler, E. Weigert, J. Buchmann, K.-F. Bürrig, K. Schüler, D. Bethmann, I. Große, and

E.J. Kantelhardt have no conflicts of interest to declare. T. Lantzsich reports personal honoraria from Pfizer, Astra Zeneca, Lilly, Roche, and Novartis, all outside the submitted work. C. Uleer reports personal honoraria from Astra Zeneca, Novartis, Onkowitz, Pierre Fabre, Roche, and Seagen, all outside the submitted work. C. Thomssen reports personal honoraria from Amgen, Astra Zeneca, Celgene, Daiichi-Sankyo, Eisai, Lilly, MEDA-Pharma, MSD, Novartis, Pfizer, Pierre-Fabre, Roche, and Vifor, all outside the submitted work. M. Vetter got travel support from NanoString.

Funding Sources

This work was supported by the Wilhelm Roux Program of the Medical Faculty, Martin Luther University Halle-Wittenberg (FKZ 25/36), and the German Federal Ministry of Education and Research (e:Med FKZ: 031A429).

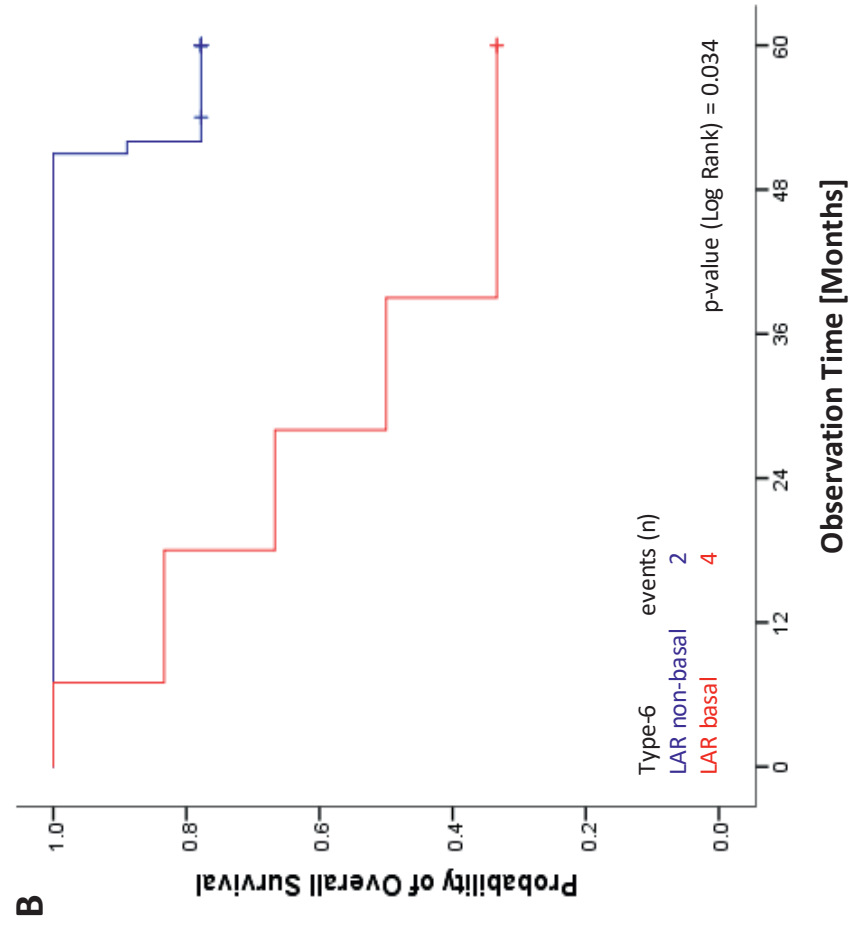
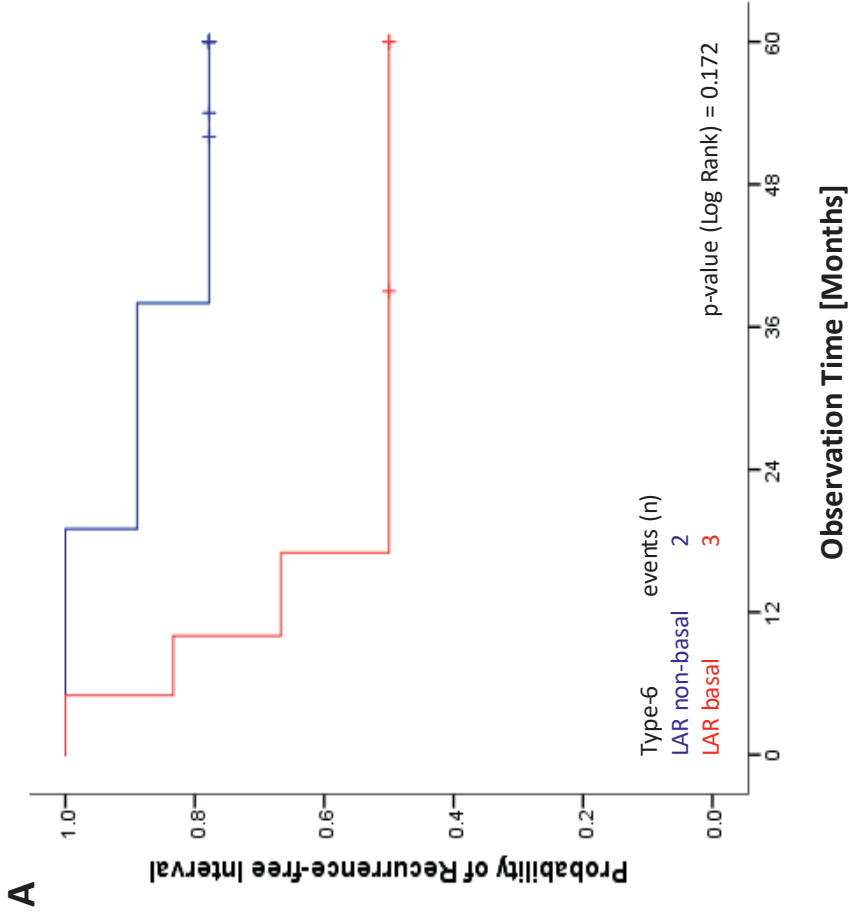
Author Contributions

E.J. Kantelhardt and M. Vetter designed the PiA study. C. Hartung, C. Thomssen, and M. Vetter conceived the TNBC analysis. C. Hartung and M. Vetter wrote the manuscript. V. Hanf, T. Lantzsich, C. Uleer, S. Peschel, J. John, M. Pöhler, E. Weigert, J. Buchmann, and K.-F. Bürrig contributed substantial input to the conception and acquisition of the work. K. Stückrath and S. Kaufhold carried out the DNA microarray experiments. M. Porsch, M.S. Staeger, and I. Große performed the bioinformatics analyses of the DNA microarray data. D. Bethmann and K. Schüler defined and analyzed the TIL proportion. E.J. Kantelhardt was responsible for statistical evaluation. M. Vetter, C. Hartung, and C. Thomssen performed data interpretation. All authors revised the manuscript critically.

References

- 1 Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, Saini KS, Viale G, Loi S, et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30:1879–87.
- 2 Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13:674–90.
- 3 Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*. 2012;486:395–9.
- 4 Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*. 2014;384:164–72.
- 5 Rida P, Ogden A, Ellis IO, Varga Z, Wolff AC, Traina TA, et al. First international TNBC conference meeting report. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;169:407–12.
- 6 Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747–52.
- 7 Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10869–74.
- 8 Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist*. 2013;18:123–33.
- 9 Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121:2750–67.
- 10 Lehmann BD, Pietenpol JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol*. 2014;232:142–50.
- 11 Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PLoS One*. 2016;11:e0157368.
- 12 Chen X, Li J, Gray WH, Lehmann BD, Bauer JA, Shyr Y, et al. TNBCtype: a subtyping tool for triple-negative breast cancer. *Cancer Inform*. 2012;11:147–56.
- 13 Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2013;19:5533–40.
- 14 Lehmann BD, Pietenpol JA. Clinical implications of molecular heterogeneity in triple negative breast cancer. *Breast*. 2015;24(Suppl 2):S36–40.

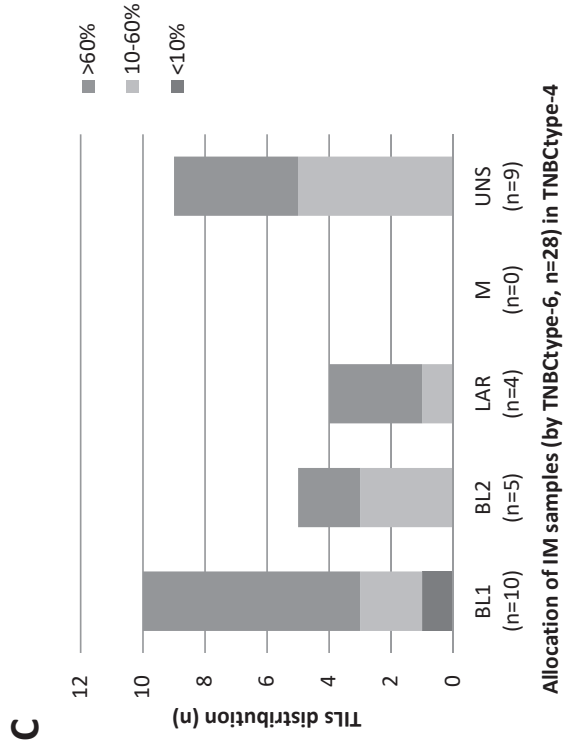
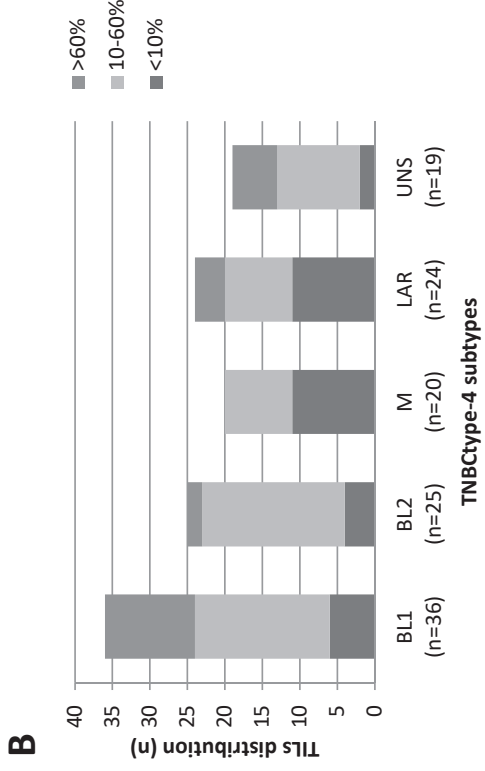
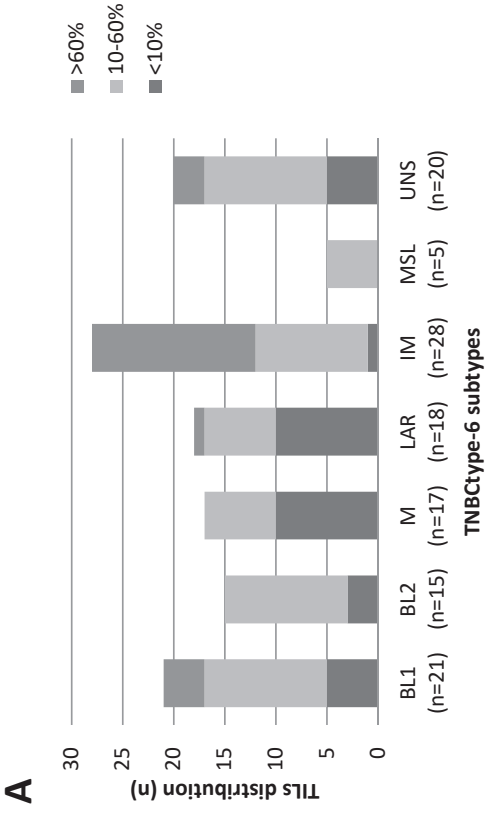
- 15 Herrera Juarez M, Tolosa Ortega P, Sanchez de Torre A, Ciruelos Gil E. Biology of the triple-negative breast cancer: immunohistochemical, RNA, and DNA features. *Breast Care (Basel)*. 2020;15:208–16.
- 16 Bernhardt S, Bayerlová M, Vetter M, Wachter A, Mitra D, Hanf V, et al. Proteomic profiling of breast cancer metabolism identifies SHMT2 and ASCT2 as prognostic factors. *Breast Cancer Res*. 2017;19:112.
- 17 Breunig C, Erdem N, Bott A, Greiwe JF, Reinz E, Bernhardt S, et al. TGFβ1 regulates HGF-induced cell migration and hepatocyte growth factor receptor MET expression via C-ets-1 and miR-128-3p in basal-like breast cancer. *Mol Oncol*. 2018;12:1447–63.
- 18 Bauer M, Kantelhardt EJ, Stiewe T, Nist A, Mernberger M, Politt K, et al. Specific allelic variants of SNPs in the MDM2 and MDMX genes are associated with earlier tumor onset and progression in Caucasian breast cancer patients. *Oncotarget*. 2019;10:19751992.
- 19 McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Eur J Cancer*. 2005;41:1690–6.
- 20 Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7th ed. Somerset: Wiley; 2011.
- 21 Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403–10.
- 22 Remmele W, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe*. 1987;8:138–40.
- 23 Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*. 2009;20:1319–29.
- 24 Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31:3997–4013.
- 25 Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. International TILs Working Group 2014. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259–71.
- 26 Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012;30:1796–804.
- 27 Kuhlmann JD, Bachmann HS, Link T, Wimmerberger P, Kröber E, Thomssen C, et al. Association of caspase 8 polymorphisms -652 6N InsDel and Asp302His with progression-free survival and tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer. *Sci Rep*. 2019;9:12594.
- 28 Hudis CA, Barlow WE, Costantino JP, Gray RJ, Pritchard KI, Chapman JA, et al. Proposal for standardized definitions for efficacy end points in adjuvant breast cancer trials: the STEEP system. *J Clin Oncol*. 2007;25:2127–32.
- 29 Wilson CL, Miller CJ. Simpleaffy: a BioConductor package for Affymetrix Quality Control and data analysis. *Bioinformatics*. 2005;21:3683–5.
- 30 Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4:249–64.
- 31 Carlson M. hgu133plus2.db: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array annotation data (chip hgu133plus2). R package version 3.2.3. 2016. DOI: 10.18129/B9.bioc.hgu133plus2.db.
- 32 Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SA, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21:1688–98.
- 33 Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27:1160–7.
- 34 Zhao X, Rødland EA, Tibshirani R, Plevritis S. Molecular subtyping for clinically defined breast cancer subgroups. *Breast Cancer Res*. 2015;17:29.
- 35 Berchtold E, Vetter M, Gündert M, Csaba G, Fathke C, Ulbrich SE, et al. Comparison of six breast cancer classifiers using qPCR. *Bioinformatics*. 2019;35:3412–20.
- 36 Lehmann BD, Abramson VG, Sanders ME, Mayer EL, Haddad TC, Nanda R, et al. TBCRC 032 IB/II multicenter study: molecular insights to AR antagonist and PI3K inhibitor efficacy in patients with AR+ metastatic triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2020;26:2111–23.
- 37 Prat A, Fan C, Fernández A, Hoadley KA, Martinello R, Vidal M, et al. Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. *BMC Med*. 2015;13:303.
- 38 Santonja A, Sánchez-Muñoz A, Lluch A, Chica-Parrado MR, Albanell J, Chacón JI, et al. Triple negative breast cancer subtypes and pathologic complete response rate to neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget*. 2018;9:26406–16.
- 39 Echavarría I, López-Tarruella S, Picornell A, García-Saenz JÁ, Jerez Y, Hoadley K, et al. Pathological response in a triple-negative breast cancer cohort treated with neoadjuvant carboplatin and docetaxel according to Lehmann's refined classification. *Clin Cancer Res*. 2018;24:1845–52.
- 40 Mayer IA, Abramson VG, Lehmann BD, Pietenpol JA. New strategies for triple-negative breast cancer – deciphering the heterogeneity. *Clin Cancer Res*. 2014;20:782–90.
- 41 Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, et al. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Ann Oncol*. 2018;29:895–902.
- 42 Witzel I, Loibl S, Wirtz R, Fasching PA, Denkert C, Weber K, et al. Androgen receptor expression and response to chemotherapy in breast cancer patients treated in the neoadjuvant TECHNO and PREPARE trial. *Br J Cancer*. 2019;121:1009–15.
- 43 Yuan Y, Lee JS, Yost SE, Frankel PH, Ruel C, Egelston CA, et al. A phase II clinical trial of pembrolizumab and enobosarm in patients with androgen receptor-positive metastatic triple-negative breast cancer. *Oncologist*. 2021;26(2):99–e217.
- 44 Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:1275–81.
- 45 Li X, Yang J, Peng L, Sahin AA, Huo L, Ward KC, et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;161:279–87.



No. at risk	15	13	11	11	9	5
LAR non-basal	9	9	8	8	7	4
LAR basal	6	4	3	3	2	1

No. at risk	15	14	13	12	11	6
LAR non-basal	9	9	9	9	9	5
LAR basal	6	5	4	3	2	1

Supplementary Fig. 1. LAR non-basal and LAR-basal Kaplan-Meier plots for RFI (A) and OS (B) classified by TNBtype-6, the tables present the effective sample size for each interval.

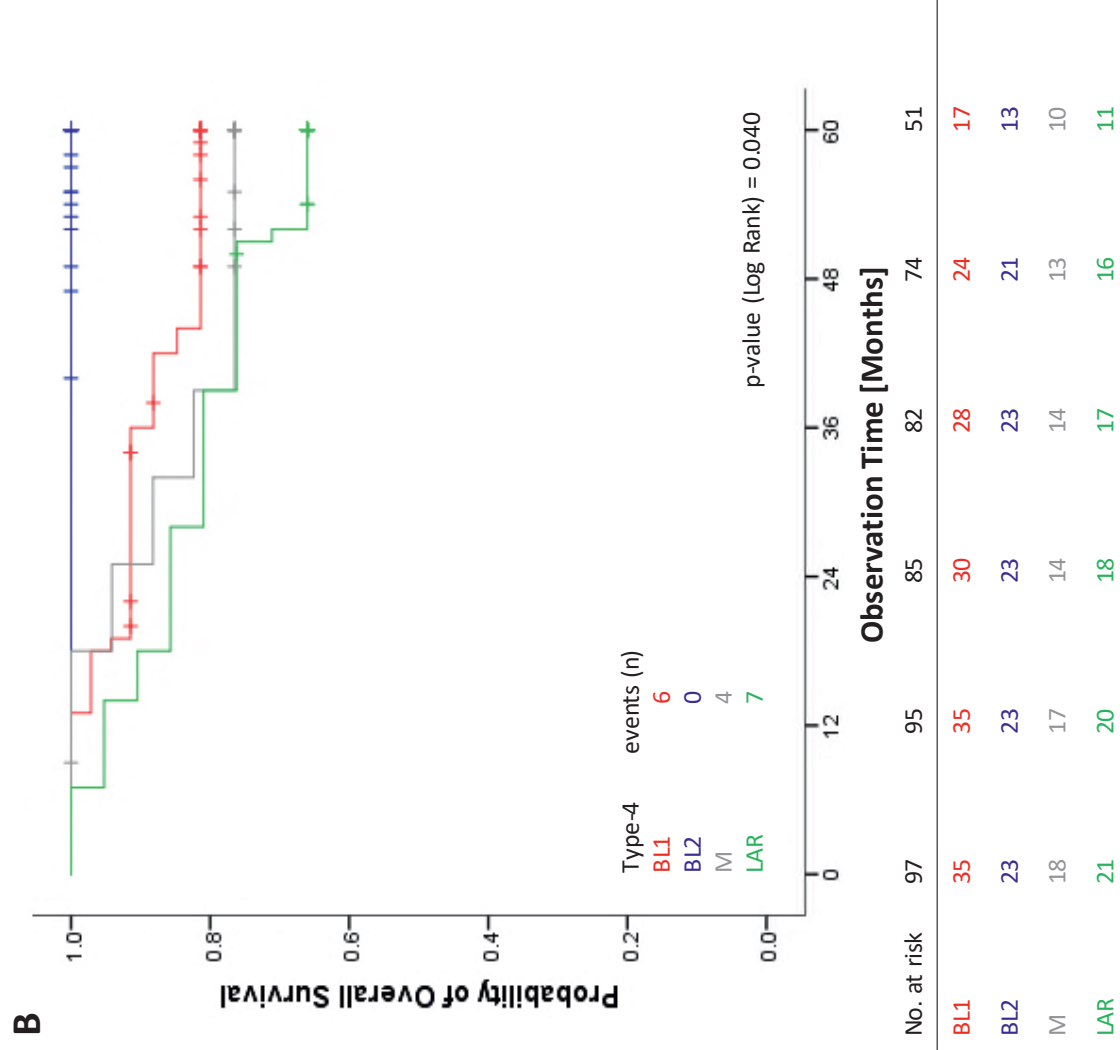
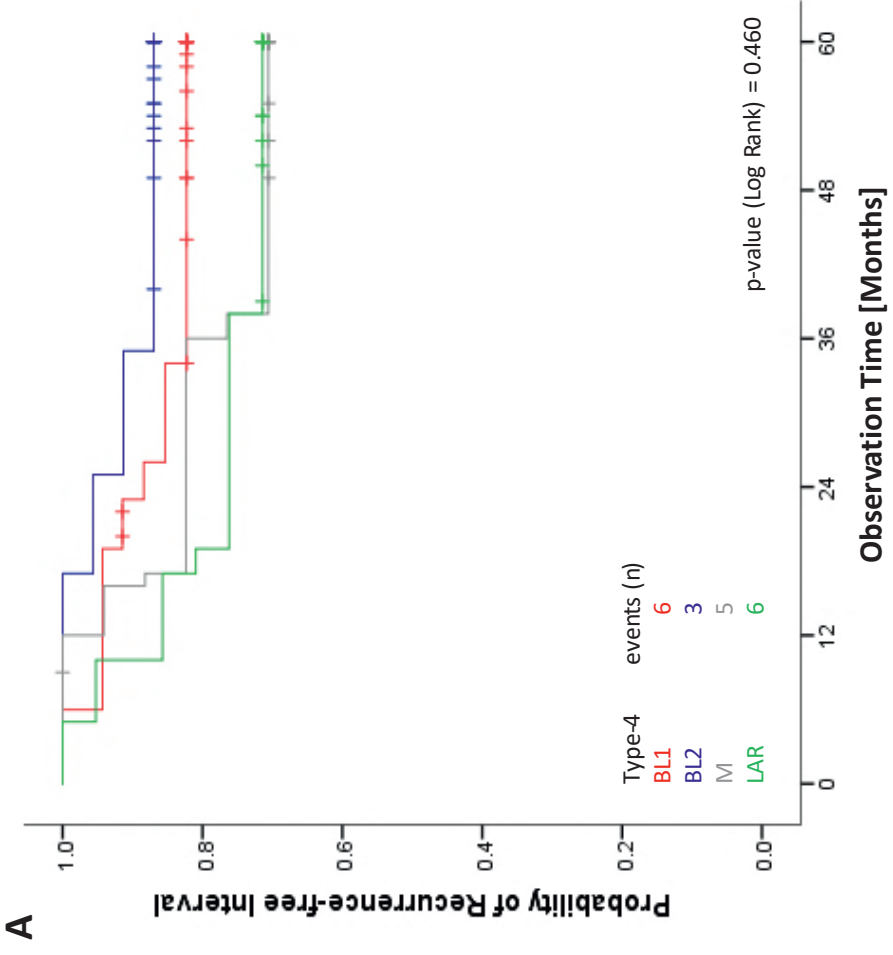


Supplementary Fig. 2. Distributions of TILs within TNBC subtype (n = 124).

A within the TNBCtype-6 subtypes

B within the TNBCtype-4 subtypes

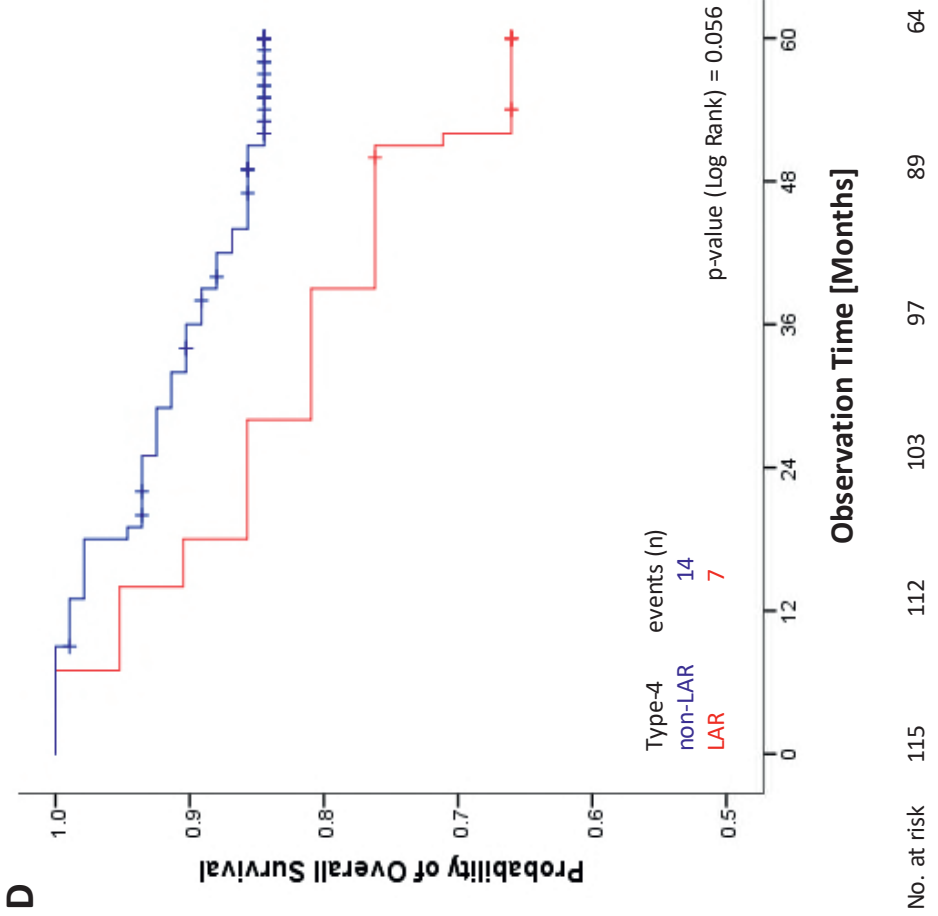
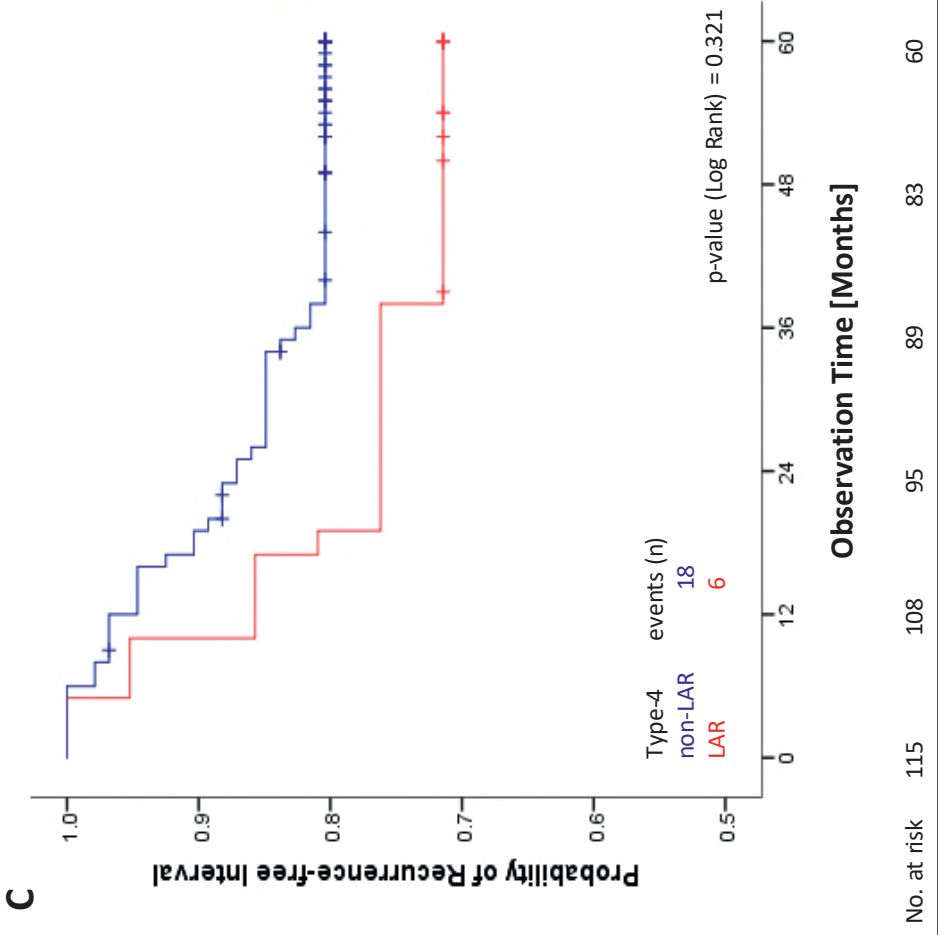
C Allocation of IM samples (by TNBCtype-6, n=28) in TNBCtype-4



	No. at risk	97	95	85	82	74	51
BL1	35	35	35	30	28	24	17
BL2	23	23	23	23	23	21	13
M	18	18	17	14	14	13	10
LAR	21	21	20	18	17	16	11

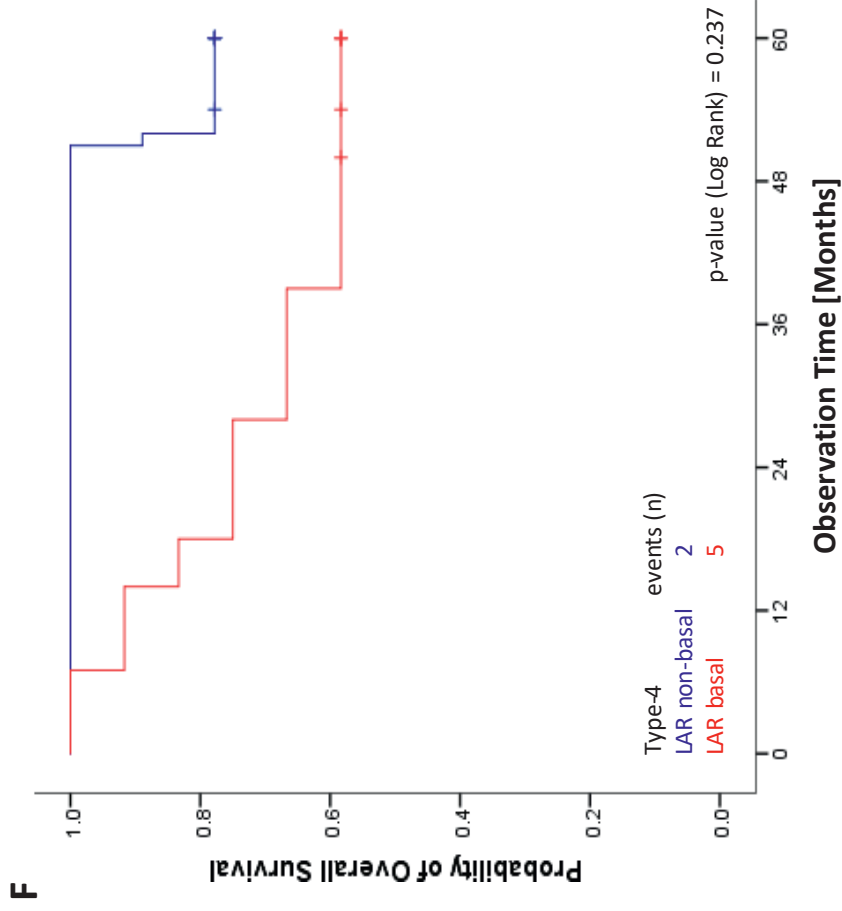
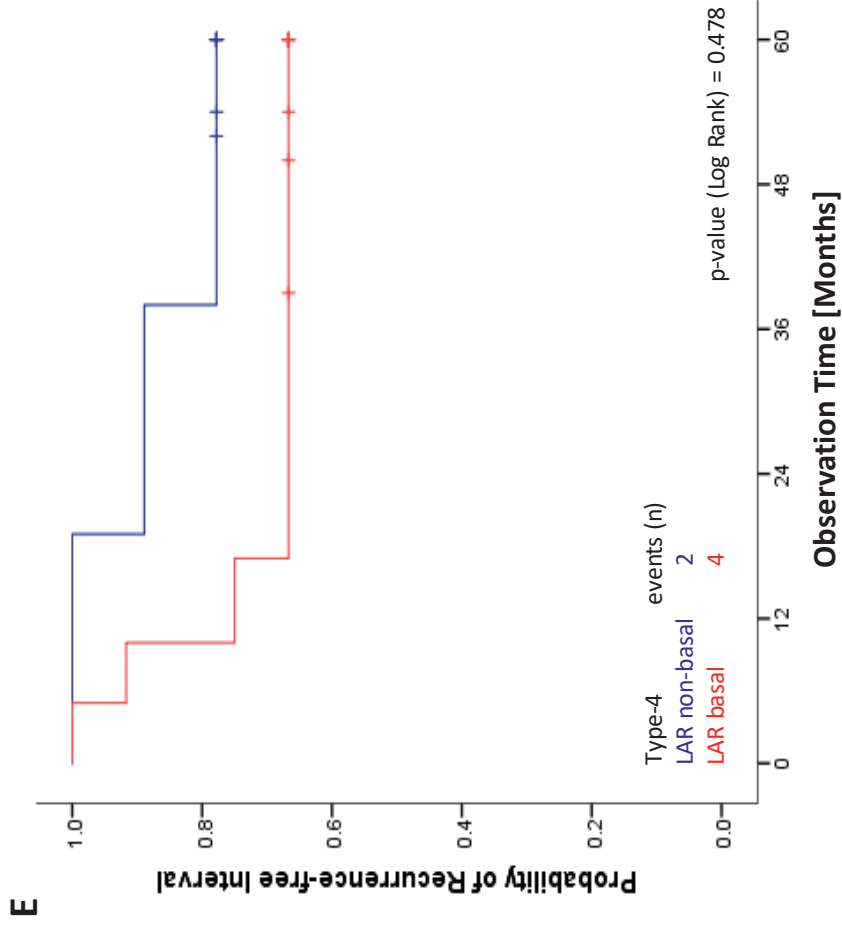
Supplementary Fig. 3. TNBC type-4 Kaplan-Meier plots, the tables present the effective sample size for each interval.

A, B: all subdivided stable subtypes RFI (A) and OS (B)



Supplementary Fig. 3. TNBtype-4 Kaplan-Meier plots, the tables present the effective sample size for each interval (No. at risk).

C, D: summarized groups LAR versus non-LAR subtypes RFI (C) and OS (D)



No. at risk	21	18	16	16	14	10	10
LAR non-basal	9	9	8	8	7	5	5
LAR basal	12	9	8	8	7	5	5

No. at risk	21	20	18	17	16	7
LAR non-basal	9	9	9	9	9	6
LAR basal	12	11	9	8	7	1

Supplementary Fig. 3. TNBType-4 Kaplan-Meier plots, the tables present the effective sample size for each interval-

E, F: LAR non-basal and LAR basal for RFI (E) and OS (F)

Supplementary Table 1. pCR rates [%] of patients treated with neoadjuvant chemotherapy

pCR definitions	all NACT n=200	TNBC n=54	non-TNBC n=146	TNBC subtyping n=33	TNBC basal n=27	TNBC non-basal n=6	TNBC LAR n=4	TNBC non-LAR n=29
ypT0 ypN0 [%]	23.5	44.4	15.8	42.4	44.4	33.3	25.0	44.8
ypT0/Tis ypN0 [%]	31.5	48.1	25.3	48.5	48.2	50.0	50.0	48.2
ypT0/Tis ypN any [%]	40.0	57.4	33.6	60.6	63.0	50.0	50.0	62.0

Supplementary Table 2. Distribution of Molecular subtypes and PAM50 intrinsic types (A, B) and excluding unclassifiable subtypes (C).

A	sample ID	TNBCtype-6	TNBCtype-4	PAM50 intrinsic type
	1	M	M	basal-like
	2	BL1	BL1	basal-like
	3	BL1	BL1	basal-like
	4	BL1	BL1	basal-like
	5	BL2	BL2	basal-like
	6	UNS	UNS	basal-like
	7	BL2	BL2	basal-like
	8	IM	BL1	basal-like
	9	BL1	BL1	basal-like
	10	BL1	BL1	basal-like
	11	IM	BL1	basal-like
	12	BL2	BL2	basal-like
	13	BL1	BL1	basal-like
	14	BL1	BL1	basal-like
	15	BL1	BL1	basal-like
	16	BL1	BL1	basal-like
	17	IM	BL1	basal-like
	18	UNS	UNS	basal-like
	19	IM	BL1	basal-like
	20	IM	BL1	basal-like
	21	IM	UNS	basal-like
	22	UNS	UNS	basal-like
	23	M	M	basal-like
	24	BL2	BL2	basal-like
	25	M	M	basal-like
	26	BL2	BL2	basal-like
	27	BL1	BL1	basal-like
	28	M	M	basal-like
	29	BL1	BL1	basal-like
	30	MSL	LAR	basal-like
	31	UNS	UNS	basal-like
	32	IM	BL2	basal-like
	33	IM	UNS	basal-like
	34	UNS	BL2	basal-like
	35	UNS	BL1	basal-like
	36	BL1	BL1	basal-like
	37	BL2	BL2	basal-like
	38	LAR	LAR	basal-like
	39	LAR	LAR	HER2 enriched
	40	BL2	BL2	basal-like
	41	BL1	BL1	basal-like
	42	UNS	UNS	basal-like
	43	LAR	LAR	basal-like
	44	M	M	basal-like
	45	IM	BL1	basal-like
	46	LAR	LAR	HER2 enriched
	47	IM	UNS	basal-like
	48	M	M	basal-like
	49	UNS	UNS	basal-like
	50	LAR	LAR	HER2 enriched
	51	BL1	BL1	basal-like
	52	MSL	M	basal-like
	53	IM	LAR	basal-like
	54	M	M	basal-like
	55	MSL	BL2	basal-like
	56	IM	BL1	basal-like
	57	UNS	UNS	basal-like
	58	BL1	BL1	basal-like
	59	BL2	BL2	HER2 enriched

sample ID	TNBCtype-6	TNBCtype-4	PAM50 intrinsic ttype
60	BL2	BL2	basal-like
61	LAR	LAR	basal-like
62	UNS	UNS	basal-like
63	IM	LAR	basal-like
64	IM	LAR	basal-like
65	UNS	BL1	basal-like
66	M	M	basal-like
67	BL2	BL2	basal-like
68	BL1	BL1	basal-like
69	IM	UNS	basal-like
70	LAR	LAR	basal-like
71	LAR	LAR	HER2 enriched
72	IM	BL2	basal-like
73	M	M	basal-like
74	UNS	M	basal-like
75	M	M	basal-like
76	BL1	BL1	basal-like
77	LAR	LAR	basal-like
78	MSL	BL2	HER2 enriched
79	IM	UNS	basal-like
80	LAR	LAR	Luminal A
81	BL2	BL2	basal-like
82	BL2	BL2	basal-like
83	IM	UNS	basal-like
84	LAR	LAR	HER2 enriched
85	M	M	basal-like
86	UNS	UNS	basal-like
87	M	M	basal-like
88	UNS	BL1	basal-like
89	IM	BL1	basal-like
90	LAR	LAR	basal-like
91	UNS	BL1	basal-like
92	M	M	basal-like
93	IM	UNS	basal-like
94	UNS	UNS	HER2 enriched
95	BL2	BL2	basal-like
96	M	M	basal-like
97	M	M	basal-like
98	IM	UNS	basal-like
99	BL2	BL2	basal-like
100	LAR	LAR	HER2 enriched
101	IM	UNS	basal-like
102	UNS	M	basal-like
103	UNS	BL1	basal-like
104	BL2	BL2	HER2 enriched
105	MSL	BL2	Luminal A
106	LAR	LAR	basal-like
107	IM	LAR	basal-like
108	LAR	LAR	Luminal A
109	LAR	LAR	basal-like
110	M	M	basal-like
111	IM	BL1	basal-like
112	LAR	LAR	basal-like
113	IM	BL2	basal-like
114	BL1	BL1	basal-like
115	BL1	BL1	basal-like
116	LAR	LAR	HER2 enriched
117	BL2	BL2	basal-like
118	BL1	BL1	basal-like
119	BL1	BL1	basal-like
120	IM	BL2	basal-like
121	UNS	LAR	basal-like
122	M	M	basal-like
123	UNS	BL2	HER2 enriched
124	IM	BL1	basal-like

B

	TNBCtype-6	PAM50 intrinsic	
	n=124 (100 %)	basal-like n=109 (88 %)	non basal-like n=15 (12 %)
BL1	21 (17 %)	21 (19 %)	0 (0 %)
BL2	16 (13 %)	14 (13 %)	2 (13 %)
M	17 (14 %)	17 (16 %)	0 (0 %)
LAR	18 (15 %)	9 (8 %)	9 (60 %)
IM	27 (22 %)	27 (25 %)	0 (0 %)
MSL	5 (4 %)	3 (3 %)	2 (13 %)
UNS	20 (16 %)	18 (16 %)	2 (13 %)

	TNBCtype-4	PAM50 intrinsic types	
	n=124 (100 %)	basal-like n=109 (88 %)	non basal-like n=15 (12 %)
BL1	36 (29 %)	36 (33 %)	0 (0 %)
BL2	25 (20 %)	20 (18 %)	5 (33 %)
M	20 (16 %)	20 (18 %)	0 (0 %)
LAR	24 (20 %)	15 (14 %)	9 (60 %)
UNS	19 (15 %)	18 (17 %)	1 (7 %)

C

	TNBCtype-6	PAM50 intrinsic	
	n=104 (100 %)	basal-like n=91 (88 %)	non basal-like n=13 (12 %)
BL1	21 (20 %)	21 (23 %)	0 (0 %)
BL2	16 (15 %)	14 (15 %)	2 (15 %)
M	17 (16 %)	17 (19 %)	0 (0 %)
LAR	18 (17 %)	9 (10 %)	9 (69 %)
IM	27 (26 %)	27 (30 %)	0 (0 %)
MSL	5 (5 %)	3 (3 %)	2 (15 %)

	TNBCtype-4	PAM50 intrinsic types	
	n=105 (100 %)	basal-like n=91 (87 %)	non basal-like n=14 (13 %)
BL1	36 (34 %)	36 (39 %)	0 (0 %)
BL2	25 (24 %)	20 (22 %)	5 (36 %)
M	20 (19 %)	20 (22 %)	0 (0 %)
LAR	24 (23 %)	15 (16 %)	9 (64 %)


Supplementary Table 3. Multivariate analysis of RFI and OS for TNBC patients with chemotherapy and available TNBCtype-4 subtyping (n = 115)

Parameters	Recurrence-free interval (24 events)				Overall survival (21 events)			
	HR	95% CI	P value	Multivariate analysis	HR	95% CI	P value	Multivariate analysis
Age at diagnosis in years								
≤ 50	1.24	0.53-2.93	0.618		1.22	0.44-3.36	0.705	
51-75 (reference group)								
> 75	1.16	0.32-4.15	0.082		3.48	1.20-10.04	0.021	
Tumour size at time of diagnosis								
< 2cm (reference group)								
≥ 2 cm	4.03	1.20-13.50	0.024	3.33	0.96-11.58	0.058	4.00	0.89-17.89
Nodal status at time of diagnosis								
negative (reference group)								
positive	2.74	1.13-6.60	0.025	2.09	0.84-5.18	0.109	3.42	1.12-10.49
Tumour differentiation								
G1, G2 (reference group)								
G3	0.49	0.22-1.09	0.082		0.63	0.27-1.49	0.293	
TNBCtype-4								
non LAR (reference group)								
LAR	1.58	0.63-4.00	0.327	1.74	0.69-4.40	0.238	2.62	1.05-6.50

Abbreviation: CI Confidence Interval, HR Hazard Ratio, LAR Luminal Androgen Receptor

Article

Prognostic Value of Tumour-Infiltrating Lymphocytes in an Unselected Cohort of Breast Cancer Patients

Kathleen Schüler¹, Daniel Bethmann² , Sandy Kaufhold¹, Carolin Hartung¹, Kathrin Stückrath¹, Tilmann Lantzsich³, Christoph Uleer⁴, Volker Hanf⁵, Susanne Peschel⁶, Jutta John⁷, Marleen Pöhler⁸, Jörg Buchmann⁹, Karl-Friedrich Bürrig¹⁰, Edith Weigert¹¹, Christoph Thomssen¹, Eva Johanna Kantelhardt^{1,12} and Martina Vetter^{1,*}

¹ Department of Gynaecology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany

² Institute of Pathology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany

³ Department of Gynaecology, Hospital St. Elisabeth and St. Barbara, 06110 Halle (Saale), Germany

⁴ Gynäkologisch-Onkologische Praxis, 31134 Hildesheim, Germany

⁵ Department of Gynaecology, Nathanstift, Hospital Fürth, 90766 Fürth, Germany

⁶ Department of Gynaecology, St. Bernward Hospital, 31134 Hildesheim, Germany

⁷ Department of Gynaecology, Helios Hospital Hildesheim, 31135 Hildesheim, Germany

⁸ Department of Gynaecology, Asklepios Hospital Goslar, 38642 Goslar, Germany

⁹ Institute of Pathology, Hospital Martha-Maria, 81479 Halle (Saale), Germany

¹⁰ Institute of Pathology Hildesheim, 31135 Hildesheim, Germany

¹¹ Institute of Pathology, Hospital Fürth, 90766 Fürth, Germany

¹² Institute of Epidemiology, Biometry and Informatics, Martin Luther University Halle-Wittenberg, 06108 Halle (Saale), Germany

* Correspondence: martina.vetter@uk-halle.de



Citation: Schüler, K.; Bethmann, D.; Kaufhold, S.; Hartung, C.; Stückrath, K.; Lantzsich, T.; Uleer, C.; Hanf, V.; Peschel, S.; John, J.; et al. Prognostic Value of Tumour-Infiltrating Lymphocytes in an Unselected Cohort of Breast Cancer Patients. *Diagnostics* **2022**, *12*, 2527. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12102527>

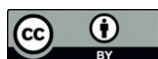
Academic Editor: Dario De Biase

Received: 9 September 2022

Accepted: 12 October 2022

Published: 18 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) are considered to have prognostic and predictive value for patients with early breast cancer. We examined 1166 breast cancer patients from a prospective, multicentre cohort (Prognostic Assessment in Routine Application (PiA), $n = 1270$, NCT 01592825) following recommendations from the International TILs Working Group. TIL quantification was performed using predefined groups and as a continuous variable in 10% increments. The primary objective was the distribution of TILs in different breast cancer types. The second objective was the association with the recurrence-free interval (RFI) and overall survival (OS). Stromal infiltration with more than 60% TILs appeared in 2% of hormone receptor (HR)-positive and HER2-negative tumours, in 9.8% of HER2-positive tumours (any HR) and 19.4% of triple-negative breast cancers (TNBCs). Each 10% increment was associated with an improvement in the prognosis in HER2-positive samples (RFI, hazard ratio 0.773, 95% CI 0.587–1.017; OS, hazard ratio 0.700, 95% CI 0.523–0.937). When defining exploratory cut-offs for TILs, the use of a 30% threshold for the HR-positive and HER2-negative group, a 20% threshold for the HER2 group and a 60% threshold for the TNBC group appeared to be the most suitable. TILs bore prognostic value, especially in HER2-positive breast cancer. For clinical use, additional research on the components of immune infiltration might be reasonable.

Keywords: tumor infiltrating lymphocytes; early breast cancer; prognosis; cohort study

1. Introduction

Breast carcinoma (BC) is a heterogeneous disease and, in addition to established clinical and histopathological parameters, tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) are discussed as additional biomarkers that predict clinical outcomes. Knowing that tumour development and progression are influenced by the microenvironment of the tumour tissue consisting of, e.g., cancer cells, cancer-associated fibroblasts, endothelial cells, nerves, vasculature and lymphocytes [1], TILs have emerged as a reproducible biomarker for BC groups (see Dieci et al. for a current review) [2,3]. The impact of lymphocyte stromal infiltration in

breast cancer and a strategy for the evaluation of these TILs were defined as standardised factors in tumour tissue in the recommendations of the International TILs Working Group for assessing TILs in breast cancer several years ago [4]. TILs were shown to be an independent prognostic factor for TNBC, as a 10% TIL increase is associated with a 17% risk reduction for recurrence or death. For HER2-positive tumours, the studies are more controversial, but TILs may help to predict benefits from anti-HER2 therapy or T-cell checkpoint inhibitors (see review [5,6]).

2. Materials and Methods

Our prospective biomarker study was designed and reported according to the RE-MARK recommendations (Reporting Recommendations for Tumour Marker) [7], using an unselected cohort of early BC patients ($n = 1270$) that were enrolled from five certified German breast cancer centres from 2009 to 2011 (PiA study—Prognostic Assessment in Routine Application, NCT 01592825). An observation time of five years with a median follow-up time of 63.3 months (1–132) was available.

Patients were included at the time of diagnosis if the following inclusion criteria were met: female patients aged 18 years or older with early invasive, non-metastasised breast cancer and no other malignancy. There was no limitation regarding tumour size; lymph node status; grading; or receptor status, e.g., oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). The tumour staging was performed in accordance with the UICC TNM rules [8] and the grading was performed according to Elston and Ellis [9]. The receptor statuses for ER, PgR and HER2 were assessed by the local pathologist of the centres using FFPE tissue from surgical excisions or core needle biopsies before any treatment. Tumours were considered HR-positive if more than 1% of the tumour cells expressed ER or PgR, or if the samples had an immune reactivity score of at least 3 [10]. The HER2 status was defined on the basis of the DAKO-score; samples were considered positive with a DAKO-score of 3, and *in situ* hybridisation was performed in the case of a DAKO-score of 2 [11]. Patients were treated in accordance with the annually updated German Guidelines (AGO) at the time of enrolment [12]. From the total cohort of 1270 patients, 1070 underwent primary surgery or neoadjuvant chemotherapy (NACT) ($n = 200$).

2.1. TIL Evaluation

TILs were assessed using haematoxylin and eosin (HE)-stained FFPE sections of tumour tissue before any treatment according to the recommendations of the International TILs Working Group [4]. TILs were recorded depending on the percentage of stromal area covered by mononuclear immune cells, determining the average TIL proportion for the entire tumour area. Only lymphocytes inside the borders of the invasive tumour, including the invasive margin, were evaluated; immune infiltration outside the tumour border, necrosis and tertiary lymphoid structures were excluded.

HE-stained slides were available for 1166 of the 1270 tumours (91.8%, Figure 1). Since core biopsies were taken outside of the participating centres, more HE slides were missing from NACT patients compared with tumour tissue from patients with the primary surgery (34% versus 3.4%). We grouped samples into three predefined IHC types by considering the steroid hormone receptor and HER2. HE slides were available for 93.6% of the HR-positive and HER2-negative group ($n = 849$), 86.7% of the HER2-positive group irrespective of the HR status ($n = 183$) and 88.2% of TNBC group ($n = 134$) (Supplementary Table S1).

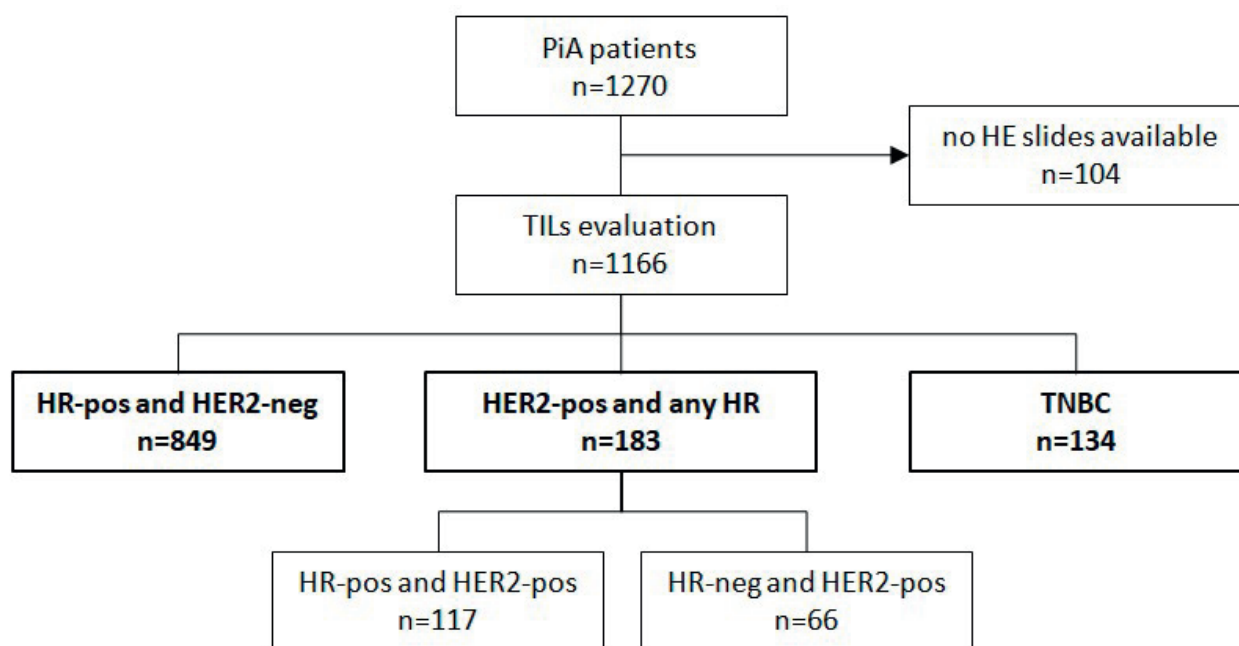


Figure 1. CONSORT diagram: patients with TIL evaluations ($n = 1166$) and in the subgroups according to HR and HER2 expressions. Abbreviations: hormone receptor (HR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), triple-negative breast cancer (TNBC).

The median age of the TILs cohort was 61 years, but patients with HER2-positive tumours and TNBCs were younger (median age 56 years) than the HR-positive and HER2-negative patients (median age 62 years), the tumours were larger and less differentiated and the patients had more lymph node involvement than patients with an HR-positive status (Table 1). In 36 cases (3.1%), patients in the TILs cohort did not receive the recommended therapy due to patient choice or frailty.

Table 1. Patients’ characteristics and histopathological parameters regarding TIL evaluations of the tumours at the time of diagnosis.

Parameters	HR-Pos and HER2-Neg, $n = 849$			HER2-Pos and Any HR, $n = 183$			TNBC, $n = 134$		
	<10%	10–60%	>60%	<10%	10–60%	>60%	<10%	10–60%	>60%
	$n = 605$ $n (%)$	$n = 227$ $n (%)$	$n = 17$ $n (%)$	$n = 83$ $n (%)$	$n = 82$ $n (%)$	$n = 18$ $n (%)$	$n = 37$ $n (%)$	$n = 71$ $n (%)$	$n = 26$ $n (%)$
Age									
≤50 years	118 (60.8) **	70 (36.1)	6 (3.1)	24 (38.1)	32 (50.8)	7 (11.1)	14 (29.2)	24 (50.0)	10 (20.8)
>50 years	487 (74.4)	157 (24.0)	11 (1.7)	59 (49.2)	50 (41.7)	11 (9.2)	23 (26.7)	47 (54.7)	16 (18.6)
Tumour size									
<2 cm	335 (68.9)	141 (29.0)	10 (2.1)	26 (35.6)	37 (50.7)	10 (13.7)	7 (15.9) *	22 (50.0)	15 (34.1)
≥2 cm	270 (74.4)	86 (23.7)	7 (1.9)	57 (51.8)	45 (40.9)	8 (7.3)	30 (33.3)	49 (54.4)	11 (12.2)
Nodal status									
Negative	393 (71.6)	146 (26.6)	10 (1.8)	53 (50.5)	43 (41.0)	9 (8.6)	18 (26.5)	37 (54.4)	13 (19.1)
Positive	212 (70.7)	81 (27.0)	7 (2.3)	30 (38.5)	39 (50.0)	9 (11.5)	19 (28.8)	34 (51.5)	13 (19.7)
Tumour differentiation									
G1	115 (74.7) *	37 (24.0)	2 (1.3)	7 (87.5)	1 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0) *	1 (100.0)	0 (0.0)
G2	416 (72.6)	147 (25.7)	10 (1.7)	48 (46.6)	45 (43.7)	10 (9.7)	24 (42.9)	25 (44.6)	7 (12.5)
G3	74 (60.7)	43 (35.2)	5 (4.1)	28 (38.9)	36 (50.0)	8 (11.1)	13 (16.9)	45 (58.4)	19 (24.7)

* p -value (Pearson χ^2 test) < 0.05, ** p -value (Pearson χ^2 test) < 0.005. Abbreviations: hormone receptor (HR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), triple-negative breast cancer (TNBC).

Two independent TIL researchers were blinded to any diagnostic and clinical data. In the case of inconsistencies, the slides were observed together and subsequently reevaluated. TILs were scored as a continuous parameter in 10% increments and additionally assigned to one of these three TIL groups: low TILs (<10%), intermediate TILs (10–60%) and high TILs (>60%). The 10% cut-off was chosen to form a group with almost no TILs in the stroma; the 60% threshold was chosen to characterise a group with strong lymphocyte infiltration,

as proposed by Denkert C. et al. in 2015 [13]. We performed an exploratory univariate analysis using the Cox model to define the most suitable cut-offs for our TILs cohort.

2.2. Outcome Assessment and Statistical Analysis

The primary objective of this study was to investigate the distribution of stromal TILs in the predefined and clinically relevant immunohistochemical (IHC) groups. The secondary objectives were the association of TILs with the recurrence-free interval (RFI) and overall survival (OS) in univariate and multivariate analyses. The endpoints were determined according to the standardised definitions for efficacy endpoint (STEEP) criteria [14]. The RFI was defined as the interval from diagnosis until any event, including local recurrence, distant recurrence and death from breast cancer and OS was defined as the time from diagnosis until death from any cause. For univariate analysis of the three TILs groups, we used Kaplan–Meier estimates and differences were described using a log-rank test. The univariate and multivariate proportional hazard regression models were used to estimate the impact of a 10% TIL increase and the dichotomous parameters.

Our findings in the multivariate analysis in the different IHC groups were visualised as forest plots (Review Manager Version 5.3) using 10% TIL increments. A recursive partitioning analysis (classification and regression tree (CART)) was performed to define homogeneous risk groups with regard to the potential prognostic impact of TILs [15,16] using a cut-off of 20%.

To estimate the association between TILs and therapy success in patients who had been treated with neoadjuvant chemotherapy (NACT), we used the pathological complete response (pCR) with the strict definition with no cancer cells in the breast or axilla (ypT0, ypN0) [17].

The clinical and histopathological parameters of the TILs study group were assessed using the chi-squared test. All *p*-values were two-sided and those less than 0.05 were considered significant. We performed all these analyses using SPSS 25 (IMB, Armonk, NY, USA).

3. Results

3.1. TIL Evaluation in Different Histopathological Types

Almost two third of the tumours showed less than 10% TILs in the stroma and 5% showed more than 60% TILs. Considering the different IHC types, a distinct distribution of TILs was detected. In HR-positive HER2-negative tumours, almost three quarters showed less than 10% TILs, whereas HER2-positive tumours and TNBCs showed higher amounts of TILs (55.4% and 72.2%, respectively, with more than 10% TILs) (see Figure 2).

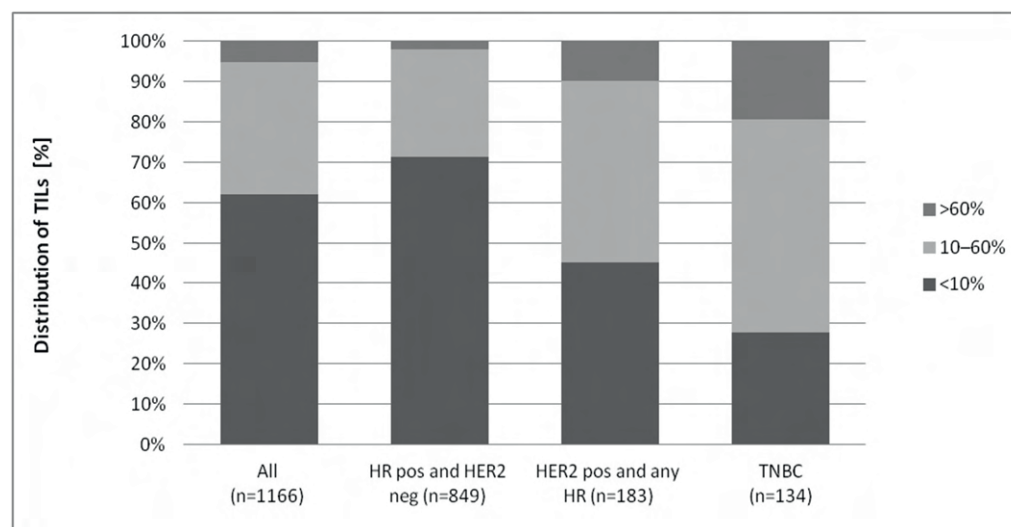


Figure 2. Distributions of TILs ($n = 1166$).

3.2. TILs and Association with Clinical Outcome

We found a weak association between TILs and survival in the entire TILs cohort ($n = 1166$); when applying 10% TIL increments, the multivariate analysis revealed a hazard ratio of 0.92 (95% CI 0.821–1.026) for the RFI and a hazard ratio of 0.92 (95% CI 0.826–1.023) for the OS (Supplementary Table S2). The impact of TILs when considering the RFI and OS was different in the three IHC groups (summarised in Table 2). In the HR-positive group ($n = 849$), patients with low and intermediate TILs infiltration (<60%) had a similar course of disease; in contrast, patients with 60% and more TILs had the worst probability regarding their RFI and OS in this group (Supplementary Figure S1A,B). In the context of stepwise 10% TIL increments and the cut-off analysis, no impact of TILs was observed (Table 2).

Table 2. Multivariate analyses of TILs considering the recurrence-free interval (RFI) and overall survival (OS).

	Multivariate Analyses of RFI			Multivariate Analyses of OS			
	Hazard Ratio	95% CI	<i>p</i> -Value	Hazard Ratio	95% CI	<i>p</i> -Value	
TILs per 10% increment							
HR-pos and HER2-neg	1.088	0.925–1.280	0.310	1.062	0.918–1.229	0.416	
HER2-pos and any HR	0.773	0.587–1.017	0.066	0.700	0.523–0.937	0.016	
TNBC	0.903	0.768–1.063	0.220	0.94	0.794–1.113	0.476	
TILs cut-offs							
HR-pos and HER2-neg	≥30% vs <30%	1.834	0.833–4.038	0.132	1.374	0.666–2.835	0.390
HER2-pos and any HR	<20% vs ≥20%	2.469	0.892–6.837	0.082	3.877	1.339–11.226	0.012
TNBC	<60% vs ≥60%	2.034	0.601–6.878	0.254	1.645	0.485–5.582	0.424

Abbreviations: hormone receptor (HR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), triple-negative breast cancer (TNBC).

A notable effect of TILs was detected for the HER2-positive group (irrespective of the HR status, $n = 183$). All 18 patients with more than 60% TILs were free of any recurrence; nine events occurred in the intermediate TILs group (88.4, 95% CI 81.3–95.5), while the TILs group with less than 10% showed the worst outcome (81.9, 95% CI 73.3–90.5). A significant impact of TILs was seen for the OS, with only 71.6% (95% CI 61.4–81.8) of the patients having less than 10% TILs and 90.8% (95% CI 84.3–97.3) of the intermediate TILs group and 94.4% (95% CI 83.8–≥99.9) of the high TILs group achieving a five-year survival (Supplementary Figure S1C,D). We detected a lower risk of recurrence with each 10% TILs increment (hazard ratio 0.76, 95% CI 0.586–0.993, $p = 0.044$); furthermore, after an adjustment for tumour size and grading, there was a 22.7% reduction per 10% TILs increment (hazard ratio 0.77, 95% CI 0.587–1.017, $p = 0.066$). Additionally, a 10% TILs increment significantly predicted a 30% reduction in the risk of death in the adjusted analysis (see Table 2).

As expected, patients with TNBC ($n = 134$) had the most unfavourable prognosis of all BC patients, with 73.5% (95% CI 65.9–81.1) of the TNBC patients being recurrence-free after five years and 76.7% being still alive (95% CI 69.4–84.0). Patients with less than 10% TILs had the worst outcome, as 65.6% (95% CI 49.5–81.7) were free of RFI events compared with 72.1% (65% CI 61.3–82.9) and 88.5% (95% CI 76.2–≥99.9) of the intermediate and high TILs groups, respectively (Supplement Figure S1E,F). The same effect of TILs was seen for OS: 67.6% (95% CI 52.5–82.7) probability for less than 10% TILs, 77.7% (95% CI 67.7–87.7) for 10–60% TILs and 88.5% (95% CI 76.2–≥99.9) for more than 60% TILs. Considering the 10% increase in the multivariate analysis, we observed a 9.7% reduced risk for any disease-specific event and a 6.0% reduction for OS (Table 2).

TILs showed a greater prognostic impact in the HR-negative group than in the HR-positive group (Figure 3). For patients with HR-negative and node-negative tumours, we found a significantly improved recurrence-free interval via a CART analysis using 20% TILs as a cut-off for 9% of our study patients ($n = 100$), as shown in Supplementary Figure S2.

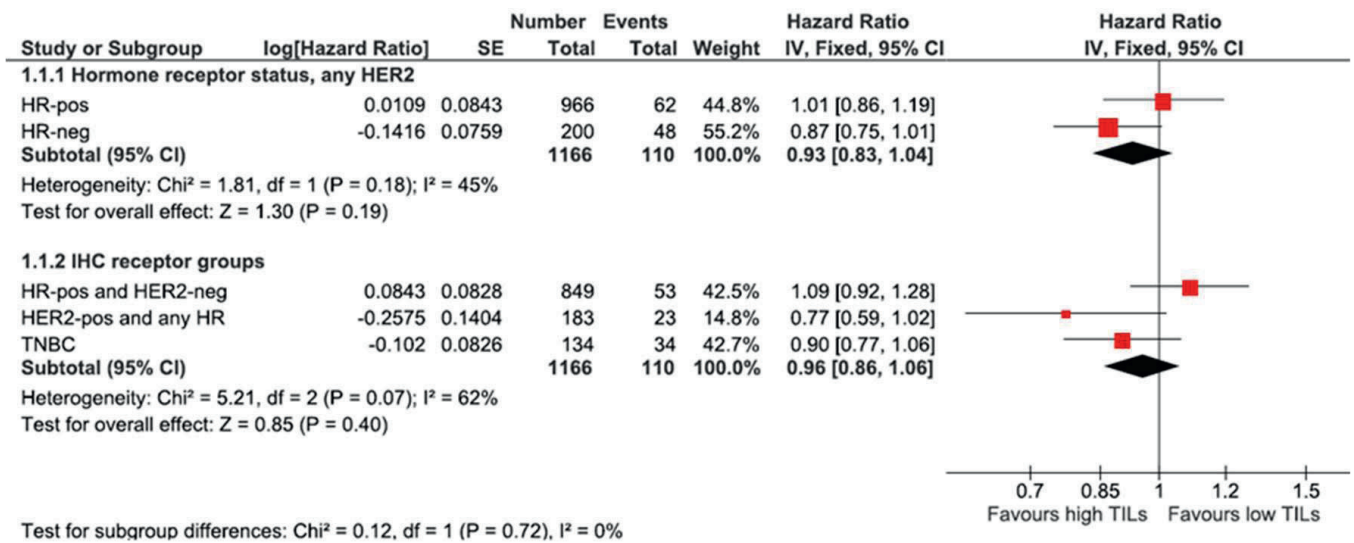


Figure 3. Forest plot for the effect of TILs infiltration per 10% increment in different receptor groups regarding the RFI. Red box: point estimate of the effect for a single group, diamond: overall effect estimate of all groups.

3.3. TILs and Association with pCR

TILs analysis was available for 132 of the 200 neoadjuvant-treated patients. Overall, neoadjuvant therapy resulted in a pCR rate of 26.5%. Due to the small number of cases with NACT in the different IHC types, further association analyses were not feasible.

3.4. TILs and Cut-Off Analyses

We tried to estimate the optimal cut-off value of TILs with regard to the RFI in the total cohort and the different IHC groups using the maximum likelihood method in an exploratory univariate analysis (see Supplementary Table S3). The most suitable threshold for risk assessment in the HR-positive group was found at 30%, demonstrating that patients with more than 30% TILs had a significantly worse RFI than those with 30% or less (hazard ratio 2.21, 95% CI 1.041–4.683) (Figure 4A,B; Table 2). No difference in outcome (RFI) between patients who received chemotherapy and patients who did not receive chemotherapy was observed (hazard ratio 2.04 vs. 2.09 respectively). In the HER2-positive group, the optimal cut-off was estimated at 20%, resulting in an improved RFI for patients with a high TIL infiltration (hazard ratio 2.71, 95% CI 1.004–7.290) and also an improved OS (hazard ratio 4.81, 95% CI 1.689–13.799) (Figure 4C,D). The effect was also detectable for patients who had received adjuvant trastuzumab ($n = 164$, RFI hazard ratio 3.00, 95% CI 1.001–8.962; OS hazard ratio 7.72, 95% CI 1.811–32.940). Using 60% TILs as a suitable threshold for dichotomous assessment regarding TNBC, patients had a 2.5-fold (95% CI 0.789–8.453) higher risk for RFI events and a 2.1-fold (95% CI 0.658–7.156) higher risk for death with a lower infiltration of TILs (<60%; Figure 4E,F). Again, the effect was independent of chemotherapy treatment. For the adjusted hazard ratio of TILs cut-offs with other clinical and pathological factors, see Supplementary Table S4.

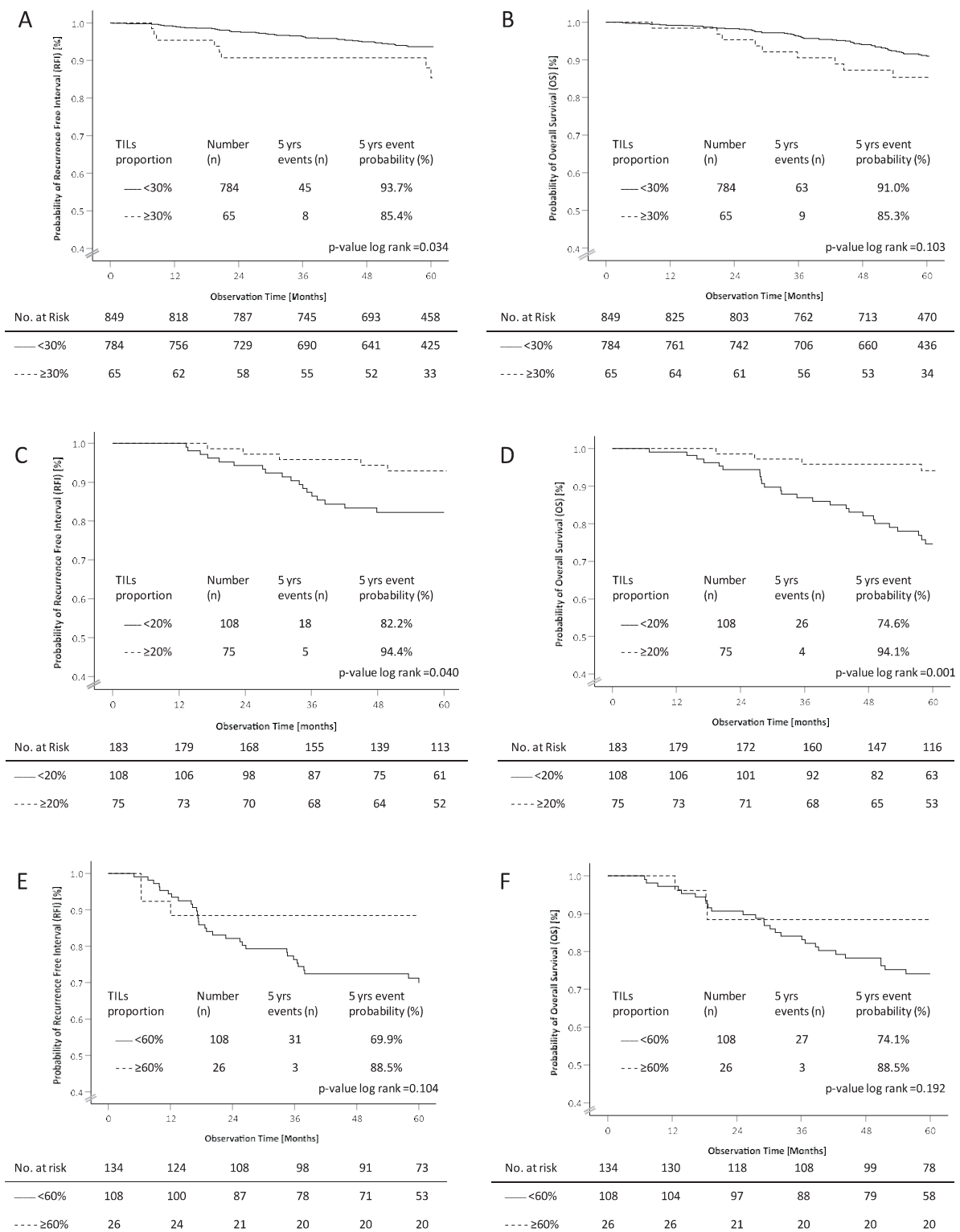


Figure 4. Kaplan–Meier plots for patients in the TILs groups with their cut-offs for the HR-pos and HER2-neg RFI (A) and OS (B), HER2-pos and any HR RFI (C) and OS (D), and TNBC RFI (E) and OS (F); the tables present the effective sample size for each interval (no. at risk).

4. Discussion

In our study ($n = 1166$), we investigated the distribution of TILs overall and in pre-specified and clinically relevant subgroups, as well as their association with the course of

the disease. According to the international guidelines, we focussed on the description of stromal TILs.

With regard to the distribution of TILs, our results were in line with published data, which shows that TILs are more likely in HER2-positive tumours, and the highest amount of TILs are found in TNBC [18]. These tumours with a high risk of recurrence seem to have more immunogenic characteristics and subsequently gain from higher amounts of TILs [3].

For our patients with HER2-positive tumours, a 10% increment in TILs corresponded to a better prognosis. In a pooled analysis of NACT trials, Denkert and colleagues found a significantly longer disease-free survival in the HER2-positive group for tumours with high TILs [13], which was also shown by Heppner et al. [19] and Loi et al. [20]. In addition, dichotomous discrimination revealed a survival benefit for HER2 patients with 20% or more TILs, as was previously seen in the retrospective analysis of the ShortHER trial, where the same cut-off was used [21]. In summary, the amount of TILs was confirmed as a prognostic factor in this group.

In the heterogeneous group of TNBC patients, our results were comparable with the findings of the above-mentioned pooled analysis (hazard ratio 0.92, 95% CI 0.87–0.98, DFS) [13], as well as the meta-analysis of Gao and colleagues, who calculated a pooled hazard ratio of 0.93 for DFS (95% CI 0.90–0.96) from ten retrospective single studies. Focussing only on TNBC, Adams and colleagues showed an association between a 10% TILs increase and survival when considering metastasis and death from breast cancer [22]. In addition to published data, the benefit of high infiltration in HER2-positive breast cancer and TNBC manifested after two years of observation in our cohort, while in the first few years, other factors seemed to have a more dominant influence on event-free survival.

Corresponding to the low amounts of TILs, HR-positive and HER2-negative tumours generated a low immune response. Previous data on HR-positive tumours is contrary. The negative effect of immune infiltration in luminal breast cancer was described by Denkert et al. [13], whereas Lundgren et al. described a positive effect of TILs infiltration after 30 years of observation [23].

We showed no association with survival in our cohort regarding the 10% increment. This result was also seen in other studies, as summarized in the meta-analysis of He et al. [24]. In contrast to that, using a 30% cut-off, the prognostic effect of TILs was demonstrated in our study.

Our analysis results lead to the suggestion of detecting patients with low amounts of TILs in HER2-positive and TN cancers, as they form a group with an especially high risk of recurrences.

Our decision to use three groups of TIL proportions to determine the impact of TILs was found to be unsuitable for survival analysis and, as a result, not applicable in a clinical context. Up to now, no suitable cut-off has been recommended or implemented in the guidelines, as the definition of lymphocyte-predominant breast cancer even varies between studies. For routine clinical practise, not only recommendations for assessing TILs but also for their precise application are needed.

Given the uncertainty of the clinical use and the inconsistent results in different studies, there are many ideas for improving TILs evaluation. Characterisation of the immune infiltration by gene expression analysis might be one way, e.g., Kochi and colleagues analysed the genomic signatures of 22 TIL-associated genes and deduced their ability to predict clinical outcomes and the effect on the prognosis. A significant association between immune genes and survival benefit was again only detectable in HER2-positive tumours. Regarding the hypothesis of high amounts of TILs leading to a better outcome, in most studies without significant results, TILs alone were not shown to be a reliable biomarker. The distinction of different infiltrating immune cells could lead to more explicit results. In 2015, Salgado and colleagues mentioned in their recommendations about TILs evaluation that immune infiltration could be divided into tumour-suppressing cells, e.g., Th 1 cells and NK cells, as well as cells that support tumour progression, such as tumour-promoting macrophages and Tregs [4]. Moreover, the therapeutic consequence of interactions between

tumour cells and immune cells, such as the PD1 and PD-L1 signalling pathway and their relation to TILs, were examined [25].

In contrast to other costly and time-consuming techniques, TILs evaluation is a cheap and easily determined marker that is evaluated using haematoxylin and eosin (HE) slides and has potential prognostic value in a clinical context that still needs to be improved for reliable use.

5. Conclusions

Using these analyses of a prospective patient cohort, it was demonstrated that TILs infiltration differed in the IHC groups of breast cancer patients. The feasibility of TILs evaluation and its prognostic impact of TILs was presented by working with data from a clinical cohort. Our study showed that the cut-offs must be calculated separately for the IHC groups of breast cancer patients, with special attention given to patients with HER2-positive tumours.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded from <https://www.mdpi.com/article/10.3390/diagnostics12102527/s1>. Table S1: Patients' characteristics and histopathological parameters of the tumours (based on local pathology) used for TILs analyses. Table S2: Multivariate analysis of the entire TILs cohort ($n = 1166$). Table S3: Cut-off exploration for TILs in the three receptor groups. Table S4: Multivariate analyses of TILs and adjusted factors by considering the recurrence-free interval (RFI) and overall survival (OS). Figure S1: Kaplan–Meier plots for patients in the TILs groups with their cut-offs for the HR-pos and HER2-neg RFI (A) and OS (B), HER2-pos and any HR RFI (C) and OS (D), and TNBC RFI (E) and OS (F); the tables present the effective sample size for each interval (no. at risk). Figure S2: Classification and regression tree (CART) for TILs as a dichotomous parameter (cut-off of 20%).

Author Contributions: E.J.K. and M.V. designed the PiA study; K.S. (Kathleen Schüler) and D.B. did the TILs evaluation; K.S. (Kathleen Schüler) and M.V. wrote the manuscript; C.H., C.T., C.U., V.H., T.L., S.P., J.J., M.P., K.-F.B., E.W., J.B. and E.J.K. contributed substantial input to the conception and acquisition of the work; S.K. and K.S. (Kathrin Stückrath) accompanied the study in the lab; E.J.K. is responsible for the statistical evaluation; K.S. (Kathleen Schüler), M.V. and C.T. performed the data interpretation; and all authors critically revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Wilhelm Roux Program of the Medical Faculty, Martin Luther University Halle-Wittenberg, grant number FKZ 25/36, and the German Federal Ministry of Education and Research, grant number e:Med FKZ: 031A429. We acknowledge the financial support within the funding programme Open Access Publishing by the German Research Foundation (DFG). The programs had no involvement in the development of this study.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of the Medical Faculty of the Martin Luther University Halle Wittenberg.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data generated in this study are available within the article and its supplementary data files. Raw data were generated and processed from the authors and are available on request to the corresponding authors.

Acknowledgments: We thank all patients that participated in the PiA study and the study nurses Katrin Losse (St. Elisabeth and St. Barbara Halle), Birgit Mauder (Fürth) and Andrea Meyer-Kühn (Hildesheim) for their excellent documentation.

Conflicts of Interest: C.T. reports support from Martin Luther University, Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V., Sanofi-Aventis, American Diagnostica and BIOMED BMH4-98-9418, as well as honoraria from Amgen, AstraZeneca, Celgene, Daiichi-Sankyo, Eisai, Gilead, Lilly, MSD, Nanostring, Novartis, Pfizer, Pierre Fabre, Puma, Sanofi-Aventis, Roche, Vifor, Hexal, Mylan and Seagen. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results. The other authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

References

1. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
2. Dieci, M.; Miglietta, F.; Guarneri, V. Immune Infiltrates in Breast Cancer: Recent Updates and Clinical Implications. *Cells* **2021**, *10*, 223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Baxevanis, C.N.; Sofopoulos, M.; Fortis, S.P.; Perez, S.A. The role of immune infiltrates as prognostic biomarkers in patients with breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **2019**, *68*, 1671–1680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Salgado, R.; Denkert, C.; Demaria, S.; Sirtaine, N.; Klauschen, F.; Pruneri, G.; Wienert, S.; van den Eynden, G.; Baehner, F.L.; Penault-Llorca, F.; et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 259–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Savas, P.; Caramia, F.; Teo, Z.L.; Loi, S. Oncogene addiction and immunity. *Curr. Opin. Oncol.* **2014**, *26*, 562–567. [[CrossRef](#)]
6. Loi, S.; Michiels, S.; Adams, S.; Loibl, S.; Budczies, J.; Denkert, C.; Salgado, R. The journey of tumor-infiltrating lymphocytes as a biomarker in breast cancer: Clinical utility in an era of checkpoint inhibition. *Ann. Oncol.* **2021**, *32*, 1236–1244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. McShane, L.M.; Altman, D.G.; Sauerbrei, W.; Taube, S.E.; Gion, M.; Clark, G.M. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br. J. Cancer* **2005**, *93*, 387–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Sobin, L.H.; Gospodarowicz, M.K.; Wittekind, C. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th ed.; Wiley: Somerset, NJ, USA, 2011.
9. Elston, C.; Ellis, I. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **1991**, *19*, 403–410. [[CrossRef](#)]
10. Goldhirsch, A.; Ingle, J.N.; Gelber, R.D.; Coates, A.S.; Thürlimann, B.; Senn, H.-J. Thresholds for therapies: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Ann. Oncol.* **2009**, *20*, 1319–1329. [[CrossRef](#)]
11. Wolff, A.C.; Hammond, M.E.H.; Schwartz, J.N.; Hagerty, K.L.; Allred, D.C.; Cote, R.J.; Dowsett, M.; Fitzgibbons, P.L.; Hanna, W.M.; Langer, A.; et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 118–145. [[CrossRef](#)]
12. Thomssen, C.; Scharl, A.; Harbeck, N.; on behalf of the AGO Breast Committee. AGO Recommendations for Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer. Update 2011. *Breast Care* **2011**, *6*, 299–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Denkert, C.; Von Minckwitz, G.; Darb-Esfahani, S.; Lederer, B.; Heppner, B.I.; Weber, K.E.; Budczies, J.; Huober, J.; Klauschen, F.; Furlanetto, J.; et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: A pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* **2018**, *19*, 40–50. [[CrossRef](#)]
14. Hudis, C.A.; Barlow, W.E.; Costantino, J.P.; Gray, R.J.; Pritchard, K.I.; Chapman, J.-A.W.; Sparano, J.A.; Hunsberger, S.; Enos, R.A.; Gelber, R.D.; et al. Proposal for Standardized Definitions for Efficacy End Points in Adjuvant Breast Cancer Trials: The STEEP System. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 2127–2132. [[CrossRef](#)]
15. Hothorn, T.; Lausen, B.; Benner, A.; Radespiel-Tröger, M. Bagging survival trees. *Stat. Med.* **2003**, *23*, 77–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Breiman, L.; Friedman, J.H.; Olshen, R.A.; Stone, C.J. *Classification and Regression Trees*; Routledge: Boca Raton, FL, USA, 2017. [[CrossRef](#)]
17. Von Minckwitz, G.; Untch, M.; Blohmer, J.-U.; Costa, S.D.; Eidtmann, H.; Fasching, P.A.; Gerber, B.; Eiermann, W.; Hilfrich, J.; Huober, J.; et al. Definition and Impact of Pathologic Complete Response on Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy in Various Intrinsic Breast Cancer Subtypes. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 1796–1804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Juarez, M.H.; Ortega, P.T.; de Torre, A.S.; Gil, E.C. Biology of the Triple-Negative Breast Cancer: Immunohistochemical, RNA, and DNA Features. *Breast Care* **2020**, *15*, 208–216. [[CrossRef](#)]
19. Heppner, B.I.; Untch, M.; Denkert, C.; Pfitzner, B.M.; Lederer, B.; Schmitt, W.; Eidtmann, H.; Fasching, P.A.; Tesch, H.; Solbach, C.; et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Predictive and Prognostic Biomarker in Neoadjuvant-Treated HER2-Positive Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5747–5754. [[CrossRef](#)]
20. Loi, S.; Sirtaine, N.; Piette, F.; Salgado, R.; Viale, G.; van Eenoo, F.; Rouas, G.; Francis, P.; Crown, J.P.; Hitre, E.; et al. Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin with Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 860–867. [[CrossRef](#)]
21. Dieci, M.; Conte, P.; Bisagni, G.; Brandes, A.; Frassoldati, A.; Cavanna, L.; Musolino, A.; Giotta, F.; Rimanti, A.; Garrone, O.; et al. Association of tumor-infiltrating lymphocytes with distant disease-free survival in the ShortHER randomized adjuvant trial for patients with early HER2+ breast cancer. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 418–423. [[CrossRef](#)]
22. Adams, S.; Gray, R.J.; Demaria, S.; Goldstein, L.; Perez, E.A.; Shulman, L.N.; Martino, S.; Wang, M.; Jones, V.E.; Saphner, T.J.; et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers from Two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 2959–2966. [[CrossRef](#)]
23. Lundgren, C.; Bendahl, P.-O.; Ekholm, M.; Fernö, M.; Forsare, C.; Krüger, U.; Nordenskjöld, B.; Stål, O.; Rydén, L. Tumour-infiltrating lymphocytes as a prognostic and tamoxifen predictive marker in premenopausal breast cancer: Data from a randomised trial with long-term follow-up. *Breast Cancer Res.* **2020**, *22*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. He, L.; Wang, Y.; Wu, Q.; Song, Y.; Ma, X.; Zhang, B.; Wang, H.; Huang, Y. Association between levels of tumor-infiltrating lymphocytes in different subtypes of primary breast tumors and prognostic outcomes: A meta-analysis. *BMC Women's Health* **2020**, *20*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Noske, A.; Möbus, V.; Weber, K.; Schmatloch, S.; Weichert, W.; Köhne, C.-H.; Solbach, C.; Heppner, B.I.; Steiger, K.; Müller, V.; et al. Relevance of tumour-infiltrating lymphocytes, PD-1 and PD-L1 in patients with high-risk, nodal-metastasised breast cancer of the German Adjuvant Intergroup Node-positive study. *Eur. J. Cancer* **2019**, *114*, 76–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Prognostic value of tumour infiltrating lymphocytes in an unselected cohort of breast cancer patients

Kathleen Schüler 1, Daniel Bethmann 2, Sandy Kaufhold 1, Carolin Hartung 1, Kathrin Stückerath 1, Tilmann Lantzsch 3, Christoph Uleer 4, Volker Hanf 5, Susanne Peschel 6, Jutta John 7, Marleen Pöhler 8, Jörg Buchmann 9, Karl-Friedrich Bürrig 10, Edith Weigert 11, Christoph Thomssen 1, Eva Johanna Kantelhardt 1,12 and Martina Vetter 1,*

1 Department of Gynaecology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany

2 Institute of Pathology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany

3 Department of Gynaecology, Hospital St. Elisabeth and St. Barbara, 06110 Halle (Saale), Germany

4 Gynäkologisch-Onkologische Praxis, 31134 Hildesheim, Germany

5 Department of Gynaecology, Nathanstift, Hospital Fürth, 90766 Fürth, Germany

6 Department of Gynaecology, St. Bernward Hospital, 31134 Hildesheim, Germany

7 Department of Gynaecology, Helios Hospital Hildesheim, 31135 Hildesheim, Germany

8 Department of Gynaecology, Asklepios Hospital Goslar, 38642 Goslar, Germany

9 Institute of Pathology, Hospital Martha-Maria, 81479 Halle (Saale), Germany

10 Institute of Pathology Hildesheim, 31135 Hildesheim, Germany

11 Institute of Pathology, Hospital Fürth, 90766 Fürth, Germany

12 Institute of Epidemiology, Biometry and Informatics, Martin Luther University Halle-Wittenberg, 06108 Halle (Saale), Germany

* Correspondence: martina.vetter@uk-halle.de

Supplement Tab. S1: Patients' characteristics and histopathological parameters of the tumours (based on local pathology) used for TILs analyses

Parameters	All patients <i>n</i> =1270	All patients (TILs cohort) <i>n</i> =1166 <i>n</i> (%)	HR-pos and HER2 neg <i>n</i> =907 <i>n</i> (%)	HR-pos and HER2 neg (TILs cohort) <i>n</i> =849 <i>n</i> (%)	HER2-pos and any HR <i>n</i> =211 <i>n</i> (%)	HER2-pos and any HR (TILs cohort) <i>n</i> =183 <i>n</i> (%)	TNBC <i>n</i> =152 <i>n</i> (%)	TNBC (TILs cohort) <i>n</i> =134 <i>n</i> (%)
Age at diagnosis in years								
< 35	33 (2.6)	27 (2.3)	15 (1.7)	13 (1.5)	7 (3.3)	5 (2.7)	11 (7.2)	9 (6.7)
35-50	311 (24.5)	278 (23.8)	200 (22.1)	181 (21.3)	66 (31.3)	58 (31.7)	45 (29.6)	39 (29.1)
51-75	741 (58.3)	679 (58.2)	553 (61.0)	518 (61.0)	114 (54.0)	96 (52.5)	74 (48.7)	65 (48.5)
> 75	185 (14.6)	182 (15.6)	139 (15.3)	137 (16.1)	24 (11.4)	24 (13.1)	22 (14.5)	21 (15.7)
Tumour histology								
ductal (NST)	1039 (81.8)	945 (81.0)	712 (78.5)	661 (77.9)	196 (92.9)	168 (91.8)	131 (86.2)	116 (86.6)
lobular	172 (13.5)	164 (14.1)	154 (17.0)	149 (17.6)	11 (5.2)	11 (6.0)	7 (4.6)	4 (3.0)
others	59 (4.6)	57 (4.9)	41 (4.5)	39 (4.6)	4 (1.9)	4 (2.2)	14 (9.2)	14 (10.4)
Tumour size at time of diagnosis								
< 2cm	636 (50.1)	603 (51.7)	511 (56.3)	486 (57.2)	79 (37.4)	73 (39.9)	46 (30.3)	44 (32.8)
2-5cm	528 (41.6)	479 (41.1)	340 (37.5)	317 (37.3)	104 (49.3)	89 (48.6)	84 (55.3)	73 (54.5)
> 5cm	106 (8.3)	84 (7.2)	56 (6.2)	46 (5.4)	28 (13.3)	21 (11.5)	22 (14.5)	17 (12.7)
Nodal status at time of diagnosis								
negative	780 (61.4)	722 (61.9)	584 (64.4)	529 (64.7)	119 (56.4)	105 (57.4)	77 (50.7)	68 (50.7)
positive	490 (38.6)	444 (38.1)	323 (35.6)	300 (35.3)	91 (43.6)	78 (42.6)	75 (49.3)	66 (49.3)
Tumour differentiation								
G1	167 (13.1)	163 (14.0)	158 (17.4)	154 (18.1)	8 (3.8)	8 (4.4)	1 (0.7)	1 (0.7)
G2	794 (62.5)	732 (62.8)	619 (68.2)	573 (67.5)	115 (54.5)	103 (56.3)	60 (39.5)	56 (41.8)
G3	309 (24.3)	271 (23.2)	130 (14.3)	122 (14.4)	88 (41.7)	72 (39.3)	91 (59.9)	77 (57.5)

Supplement Table S2: Multivariate analysis of the entire TILs cohort n=1166

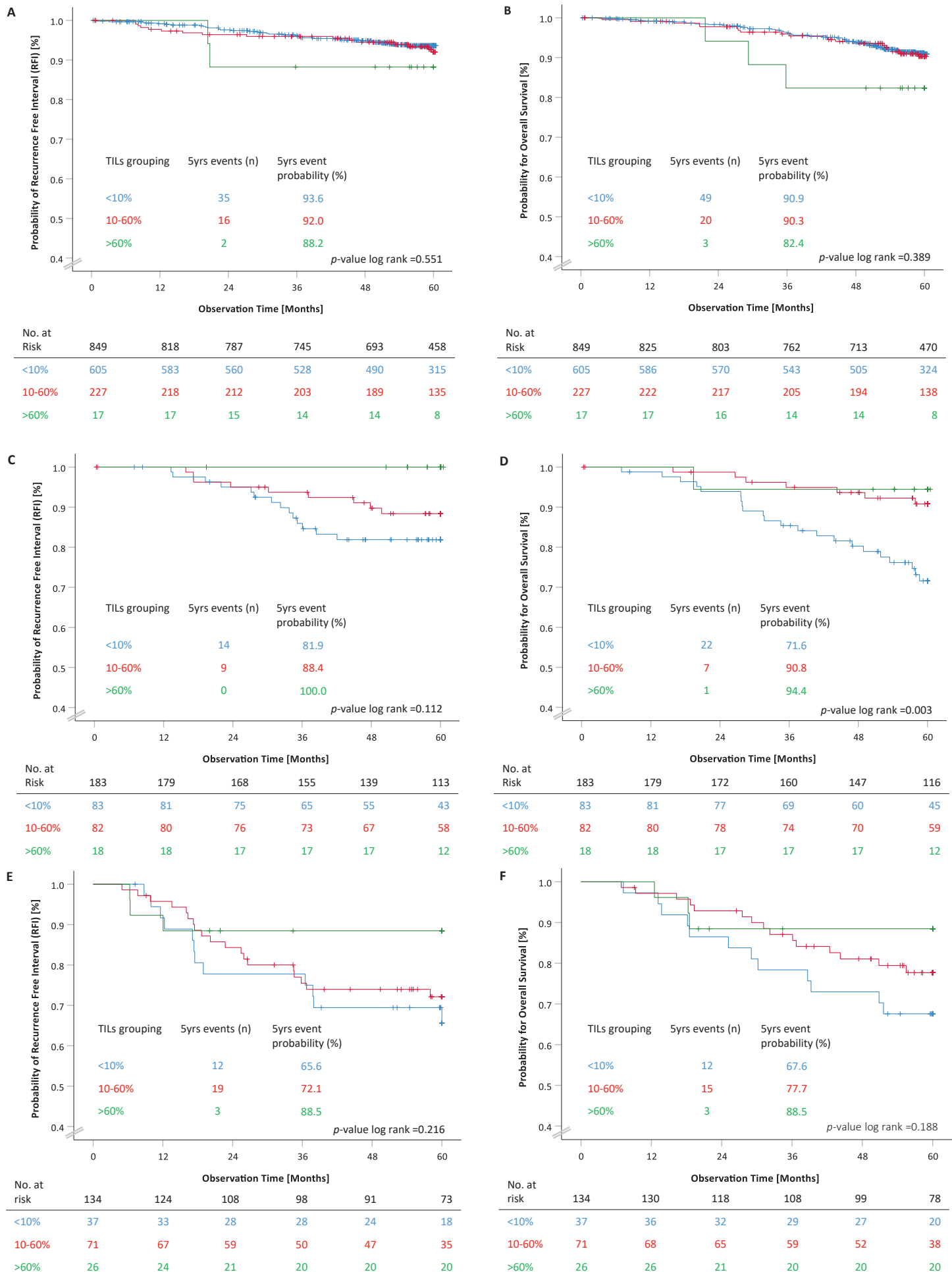
Parameters	sample size	Recurrence-Free Interval (110 events)						Overall Survival (132 events)					
		Univariate analysis			Multivariate analysis			Univariate analysis			Multivariate analysis		
		HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
Age at diagnosis in years													
≤ 50	305	1.536	1.039-2.270	0.031	1.239	0.834-1.840	0.289						
>50	861							1.424	0.933-2.173	0.102	1.764	1.151-2.703	0.009
Tumour size at time of diagnosis													
< 2cm	603												
≥ 2 cm	563	3.876	2.418-6.055	<0.001	2.275	1.409-3.674	<0.001	3.848	2.561-5.781	<0.001	2.631	1.704-4.063	<0.001
Nodal status at time of diagnosis													
negative	722												
positive	444	2.888	1.962-4.251	<0.001	2.024	1.354-3.025	<0.001	2.713	1.911-3.852	<0.001	1.981	1.375-2.854	<0.001
Tumour differentiation													
G1	163			<0.001			0.060			<0.001			0.005
G2	732	5.062	1.590-16.118	0.006	3.134	0.972-10.105	0.056	2.104	1.013-4.373	0.046	1.381	0.656-2.908	0.395
G3	271	9.864	3.063-31.770	<0.001	4.094	1.219-13.745	0.023	4.529	2.155-9.516	<0.001	2.480	1.129-5.449	0.024
Hormone receptor status													
positive	966												
negative	200	4.109	2.819-5.990	<0.001	3.171	2.049-4.906	<0.001	2.497	1.735-3.593	<0.001	1.796	1.183-2.728	0.006
HER2 Status													
negative	983												
positive	183	1.413	0.893-2.238	0.140	1.142	0.712-1.82	0.582	1.578	1.050-2.371	0.028	1.208	0.792-1.842	0.381
TILs per 10% increment	1,166	1.047	0.953-1.150	0.337	0.918	0.821-1.026	0.130	1.010	0.921-1.107	0.833	0.919	0.826-1.023	0.123

Supplement Table S3: Cut off exploration for TILs in the three receptor groups

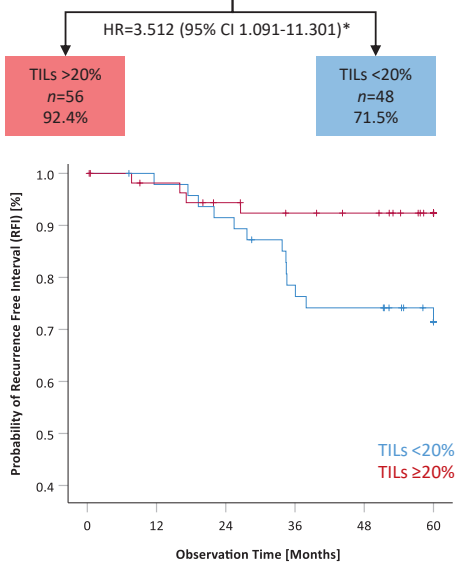
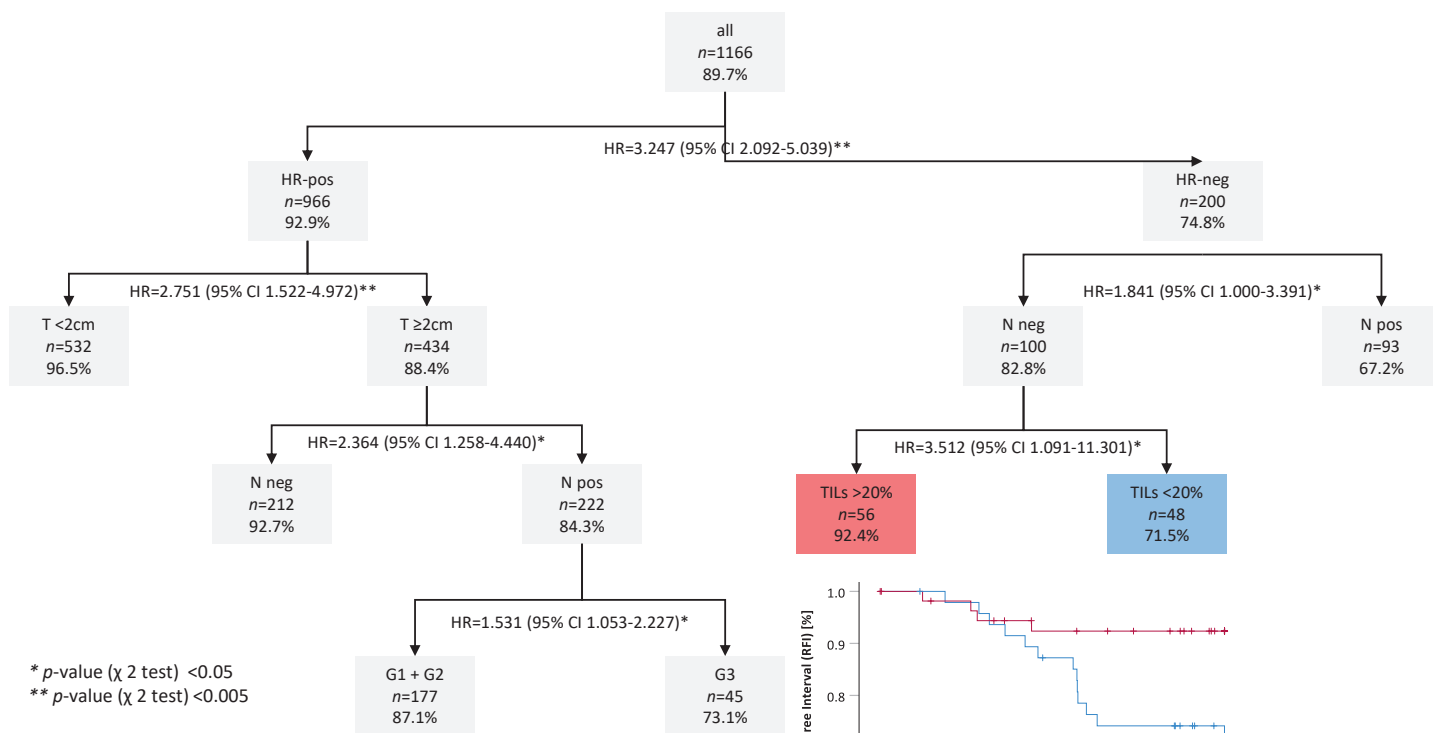
	TILs	n	RFI events	HR (95% CI)	p-value	OS events	HR (95% CI)	p-value
HR-pos and HER2-neg n=849	<10%	605	35			49		
	≥10%	244	18	1.249 (0.7007-2.205)	0.444	23	1.136 (0.692-1.864)	0.615
	<20%	729	43			59		
	≥20%	120	10	1.400 (0.703-2.785)	0.338	13	1.322 (0.725-2.410)	0.362
	<30%	784	45			63		
	≥30%	65	8	2.208 (1.041-4.683)	0.039	9	1.774 (0.882-3.566)	0.108
	<40%	808	48			65		
	≥40%	41	5	2.142 (0.853-5.380)	0.105	7	2.276 (1.044-4.964)	0.039
	<50%	821	50			68		
	≥50%	28	3	1.824 (0.569-5.847)	0.312	4	1.839 (0.671-5.042)	0.236
	<60%	816	51			69		
	≥60%	12	2	1.927 (0.469-7.916)	0.363	3	2.183 (0.687-6.935)	0.186
HER2-pos and any HR n=183	<10%	83	14	2.049 (0.886-4.736)	0.093	22	3.649 (1.624-8.201)	0.002
	≥10%	100	9			8		
	<20%	108	18	2.706 (1.004-7.290)	0.049	26	4.811 (1.679-13.789)	0.003
	≥20%	75	5			4		
	<30%	126	19	2.305 (0.784-6.777)	0.129	27	4.298 (1.304-14.169)	0.017
	≥30%	57	4			3		
	<40%	142	21	3.122 (0.732-13.319)	0.124	28	4.080 (0.972-17.130)	0.055
	≥40%	41	2			2		
	<50%	151	22	4.992 (0.673-37.040)	0.166	28	3.115 (0.742-13.076)	0.121
	≥50%	32	1			2		
	<60%	165	23	/	/	29	3.394 (0.462-24.920)	0.23
	≥60%	18	0			1		
TNBC n=134	<10%	37	12	1.486 (0.735-3.002)	0.27	12	1.806 (0.870-3.751)	0.113
	≥10%	97	22			18		
	<20%	58	18	1.500 (0.765-2.943)	0.238	15	1.283 (0.627-2.626)	0.495
	≥20%	76	16			15		
	<30%	73	21	1.401 (0.701-2.798)	0.34	17	1.085 (0.527-2.235)	0.824
	≥30%	61	13			13		
	<40%	97	28	1.834 (0.759-4.431)	0.178	23	1.256 (0.539-2.927)	0.598
	≥40%	37	6			7		
	<50%	105	30	2.153 (0.758-6.116)	0.173	26	1.829 (0.638-5.241)	0.261
	≥50%	29	4			4		
	<60%	108	31	2.583 (0.789-8.453)	0.117	27	2.171 (0.658-7.156)	0.203
	≥60%	26	3			3		

Supplement Table S4: Multivariate analyses of TILs and adjusted factors considering recurrence-free interval (RFI) and overall survival (OS)

		Multivariate analyses of Recurrence-Free Interval							Multivariate analyses of Overall Survival						
Group	Parameter	TILs per 10% increment			TILs as a dichotomous parameter			TILs per 10% increment			TILs as a dichotomous parameter				
		hazard ratio	95% CI	p-value	hazard ratio	95% CI	p-value	hazard ratio	95% CI	p-value	hazard ratio	95% CI	p-value		
HER2-pos and HER2-neg n=849 RFI 53 events OS 72 events	Tumour size	≥ 2 cm vs < 2 cm	2.399	1.277-4.504	0.006	2.450	1.303-4.608	0.005	1.944	1.155-3.271	0.012	1.951	1.159-3.285	0.012	
	Nodal status	pos vs neg	2.117	1.194-3.754	0.01	2.086	1.177-3.698	0.01	2.109	1.293-3.438	0.003	2.095	1.284-3.418	0.003	
	Tumour differentiation	G1		1.000		0.033	1.000		0.047	1.000		0.003	1.000		0.003
		G2		3.799	0.907-15.913	0.068	3.736	0.892-15.652	0.071	1.336	0.594-3.007	0.483	1.331	0.591-2.995	0.490
		G3		6.464	1.439-29.035	0.015	6.085	1.346-27.504	0.019	3.094	1.288-7.436	0.012	3.068	1.284-3.418	0.012
	TILs	per 10% increment		1.088	0.925-1.280	0.310				1.062	0.918-1.229	0.416			
≥ 30% vs < 30%						1.834	0.833-4.038	0.132				1.374	0.666-2.835	0.390	
HER2-pos and any HR n=183 RFI 23 events OS 30 events	Tumour size	≥ 2 cm vs < 2 cm	1.987	0.723-5.461	0.183	2.018	0.729-5.588	0.177	4.960	1.493-16.484	0.009	4.890	1.466-16.315	0.010	
	Tumour differentiation	G3 vs G1+2	1.464	0.967-2.218	0.072	1.466	0.969-2.219	0.070	1.368	0.954-1.961	0.089	1.379	0.962-1.976	0.081	
	TILs	per 10% increment		0.773	0.587-1.017	0.066				0.700	0.523-0.937	0.016			
		<20% vs ≥20%					2.469	0.892-6.837	0.082				3.877	1.339-11.226	0.012
TNBC n=134 RFI 34 events OS 30 events	Tumour size	≥ 2 cm vs < 2 cm	2.207	0.808-6.025	0.123	2.203	0.810-5.991	0.122	3.171	0.912-11.023	0.069	3.115	0.900-10.786	0.073	
	Nodal status	pos vs neg	2.360	1.103-5.049	0.027	2.384	1.115-5.095	0.025	3.671	1.473-9.149	0.005	3.713	1.489-9.257	0.005	
	TILs	per 10% increment		0.903	0.768-1.063	0.220				0.940	0.794-1.113	0.476			
		< 60% vs ≥ 60%					2.034	0.601-6.878	0.254				1.645	0.485-5.582	0.424



Supplement Fig. S1 : Kaplan-Meier plots for patients in TIL groups for HR-pos & HER2-neg RFI (A) and OS (B), HER2-pos & any HR RFI (C) and OS (D), and TNBC RFI (E) and OS (F), the tables present the effective sample size for each interval (No. at Risk)



Supplement Fig. S2. Classification and Regression Tree (CART) for TILs as a dichotomous parameter (cut off 20%)

Analysis parameters: tumour size, lymph node status, grading, hormone receptor status, HER2 status, TILs (cut off 20%)

Each square shows the group, number of patients and the probability of 5 years event free survival (RFI)

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Birkenwerder, den 23.05.2025

Carolin Hartung