

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Pathologie und Neuropathologie

Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und
Pathologische Anatomie

**PD-L1-Expression in speziellen Subtypen von
Urothelkarzinomen. Eine vergleichende Studie mit 3
Antikörpern**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Langer, Jule Carolin, geb. Kohler

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. H.-C. Bösmüller

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Bedke

Tag der Disputation: 21.06.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	5
1.1 Programmed cell death protein 1 (PD-1) und Programmed cell death protein 1 ligand 1 (PD-L1)	5
1.2 PD-L1 in Tumoren, Therapieprinzip	5
1.3 Das Urothelkarzinom und seine Sonderformen	7
1.4 PD-L1 und Blasenkrebs	12
1.5 PD-L1 in der histopathologischen Diagnostik	14
1.6 Fragestellung	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Erstellung der Studienkollektive	17
2.2 Immunhistochemie	18
2.2.1 Vorbereitung der Schnitte	18
2.2.2 Funktionsweise der Immunhistochemie	18
2.2.3 Auswahl und Charakteristika der Antikörper	18
2.2.4 Durchführung der Färbung	20
2.3 Auswertung	20
2.3.1 Anwendung von Scores	20
2.3.2 Statistik	22
3 Ergebnisse	23
3.1 Charakteristika der Studienkollektive	23
3.2 Ergebnisse der Auswertung der Immunhistochemie	25
3.2.1 Beispiele positiver Sonderformen	27
3.2.2 Performance der Antikörper, diskordante Fälle	30
3.2.3 Sonderfall: Plattenepithelkarzinom mit Urothelkarzinom-Anteil	34
3.2.4 Beispielfälle mit nicht-reaktiven Immuninfiltraten	37
4 Diskussion	41

4.1	Studienziel: PD-L1-Expression in Sonderformen von Blasenkrebs im Vergleich mit herkömmlichen Urothelkarzinomen _____	41
4.2	Performance der eingesetzten Antikörper _____	41
4.3	Immunhistochemische Expression von PD-L1 bei Sonderformen von Blasenkrebs im Vergleich zu herkömmlichen Urothelkarzinomen _____	44
4.4	Interpretation der Ergebnisse in Bezugnahme auf bisherigen klinischen Einsatz von Checkpointinhibitoren _____	45
4.5	Alternativen zur Immunhistochemie _____	49
4.5.1	Tumor mutational burden als molekulares Gegenstück zur IHC	49
4.5.2	Tumor-infiltrierende Lymphozyten/Microenvironment _____	50
4.5.3	Morphologischer Phänotyp _____	52
4.6	Limitationen der Studie _____	52
5	Zusammenfassung und Ausblick _____	54
6	Literaturverzeichnis _____	56
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	67
8	Danksagung _____	68

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Die schematische Präsentation des PD-L1-Mechanismus (aus Dongkui Song et al, Bladder cancer, a unique model to understand cancer immunity and develop immunotherapy approaches, *J Pathol* 2019; 249: 151–165)

Abb. 2 Darstellung der für das Urothelkarzinom von der FDA zugelassenen Medikamente (aus Dongkui Song et al, Bladder cancer, a unique model to understand cancer immunity and develop immunotherapy approaches, *J Pathol* 2019; 249: 151–165)

Tab. 1 T – Primärtumor (Wittekind, International Union against Cancer, and Wiley-VCH 2020)

Tab. 2 N – regionäre Lymphknoten (Wittekind, International Union against Cancer, and Wiley-VCH 2020)

Tab. 3 M – Fernmetastasen (Wittekind, International Union against Cancer, and Wiley-VCH 2020)

Tab. 4 Charakteristika der verwendeten Antikörper

Tab. 5 Geschlechterverteilung und Alter bei Diagnosestellung

Tab. 6 Tumorstaging der Patientenkohorte - Sonderformen

Tab. 7 Tumorstaging der Patientenkohorte - Urothel-Karzinom

Tab. 8 Anteil der im Kollektiv enthaltenen Sonderform-Typen

Tab. 9 Absoluter und prozentualer Wert der PD-L1 positiven Fälle beider Gesamt-Kollektive

Tab. 10 Einzelergebnisse des Sonderformkollektivs bezogen auf die Subtypen

Tab. 11 Score-Werte der drei diskordanten Fälle je Antikörper

Abkürzungsverzeichnis

PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1
Ca	Karzinom
FDA	U.S. Food and Drugs Administration
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
TURB	Transurethrale Resektion der Blase
CPS	Combined positivity score
IC	Immunzellen
IHC	Immunhistochemie
TC	Tumorzellen
MIC	Mononukleäre inflammatorische Zellen
ORR	Objective Response Rate
HE	Hämatoxylin-Eosin
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
LEL	lymphoepithelioma-like
PLECA	Plattenepithelkarzinom
MHC	Major histocompatibilitycomplex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NSCLC	non-small cell lung cancer (Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
TMB	Tumor mutational burden (Tumorale Mutationslast)
CK	Cytokeratin
TIC	Tumorerfiltrierende Immunzellen
TIL	Tumorerfiltrierende Lymphozyten
LD	Lymphozytendichte

1 Einleitung

1.1 Programmed cell death protein 1 (PD-1) und Programmed cell death protein 1 ligand 1 (PD-L1)

Das Zusammenspiel zwischen Überleben und dem kontrollierten Untergang von Zellen ist Voraussetzung für das korrekte Funktionieren des menschlichen Organismus. Bereits vor mehr als 2 Jahrzehnten wurde das Protein Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) durch die Induktion eines programmierten Zelltodes in bestimmten Zelllinien als wichtiger Mitspieler bei der Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts beschrieben (Ishida et al. 1992). Es handelt sich um ein Transmembranprotein der Immunglobulin-Superfamilie, welches in der Telomer-Region des langen Arms des Chromosoms 2 kodiert ist (Shinohara et al. 1994).

PD-1 wird auf der Zelloberfläche von aktivierten T- und B-Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert und hemmt bei Interaktion mit seinem Liganden, dem Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PD-L1), deren Proliferation und damit deren immunologische Aktivität (Freeman et al. 2000). Dies hat im physiologischen Zustand zum Ziel, eine überschießende Immunantwort und autoimmune Aktivität dieser Zellen zu unterbinden. Das zugehörige Liganden-Protein PD-L1 wird überwiegend von Zellen der Makrophagen-Linie exprimiert (Dong et al. 2002; Gordon et al. 2017), die zugehörige mRNA-Transkription findet man jedoch ubiquitär in einer Vielzahl an Geweben (Dong and Chen 2003).

1.2 PD-L1 in Tumoren, Therapieprinzip

Im gesunden Organismus werden entartete Zellen vom Immunsystem erkannt und eliminiert (Schreiber, Old, and Smyth 2011). Die inadäquate Bekämpfung von Tumorzellen durch das Immunsystem unterliegt verschiedenen Mechanismen, man spricht von „immune escape“ des Tumors. Hierbei spielt das PD-1-Protein eine wichtige Rolle, denn auch eine Reihe von Tumoren exprimieren PD-L1 auf der Oberfläche ihrer Zellen und mildern so die körpereigene Immunantwort, indem die Aktivität der den Tumor infiltrierenden T-Zellen geschwächt wird (Dong and Chen 2003; Dong et al. 2002). Beim PD-

L1/PD-1 System sind dabei vorwiegend CD8+-Zellen betroffen (Grundmann et al. 2018). Diesen Mechanismus macht man sich beim Einsatz der immunonkologisch wirksamen Checkpoint-Inhibitoren zunutze. Es handelt sich um antikörperbasierte Medikamente, die gezielt die immunsuppressive Lokalwirkung im unmittelbaren Tumor-Mikromilieu aufheben und somit die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort verstärken (Höfler et al. 2019).

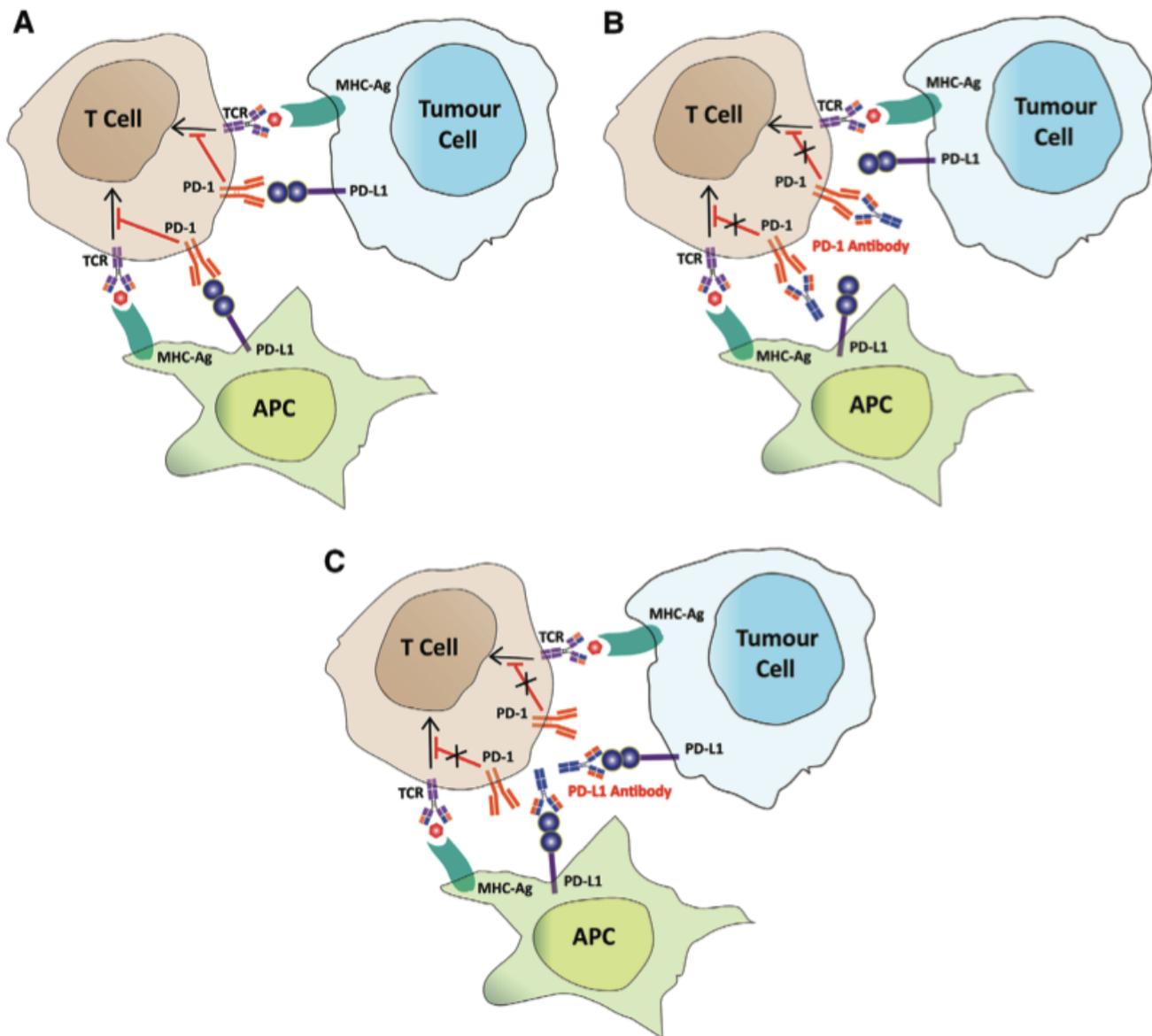


Abb.1: Die schematische Präsentation des PD-L1-Mechanismus (Dongkui Song et al, Bladder cancer, a unique model to understand cancer immunity and develop immunotherapy approaches, *J Pathol* 2019; 249: 151–165)

Prinzipiell gibt es dafür zwei verschiedene Möglichkeiten der Anwendung (Abb.1): Es können einerseits monoklonale Antikörper direkt gegen den PD-1-Rezeptor auf der Zelloberfläche der Immunzellen des Patienten eingesetzt werden. Zum anderen können die Antikörper gegen das von den Tumorzellen exprimierte PD-L1-Protein gerichtet sein, und auf diese Weise den Pathway, der zur Down-Regulation der Immunzellen führt, blockieren.

Aufgrund der jüngsten Erfolge auf diesem Gebiet ist die Immunonkologie in den letzten Jahren zu einem zunehmend relevanten Forschungsschwerpunkt geworden. Ein Durchbruch stellte die Entwicklung der Checkpointinhibitoren mit erfreulichen Ergebnissen hinsichtlich des Ansprechens und der Verträglichkeit der Behandlung dar. Im Jahr 2014 wurde das erste Medikament der Substanzklasse der PD1-Inhibitoren, zunächst für die Therapie des malignen Melanoms zugelassen (Poole 2014). Inzwischen ist diese Therapieoption für eine Reihe von Tumorerkrankungen etablierter Standard, darunter auch das Urothelkarzinom (U.S. Food and Drug Administration).

Welch hohen Stellenwert dieses Gebiet der Krebsbehandlung darstellt wird auch durch die Vergabe des Nobelpreises für Medizin im Jahre 2018 unterstrichen: Für ihre Entdeckung der Tumorthherapie durch Inhibition der negativen Immunregulation wurden James P. Allison und Tasuku Honjo ausgezeichnet (Guo 2018).

1.3 Das Urothelkarzinom und seine Sonderformen

Blasenkrebs gehört in Deutschland und weltweit zu den häufigsten malignen Erkrankungen. Bei 70% der diagnostizierten Tumoren handelt es sich dabei um nicht-muskelinvasive Formen, bei den übrigen 30% der Fälle infiltriert der Tumor die Blasenmuskulatur (Siegel, Miller, and Jemal 2019). Insgesamt wurden in Deutschland im Jahr 2016 etwa 16.470 Neuerkrankungen eines invasiven Harnblasenkarzinoms erfasst. Hauptsächlich waren davon Männer betroffen, nur bei etwa einem Viertel der Erkrankten handelte es sich um weibliche Patientinnen (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019a). Das mittlere Erkrankungsalter lag bei Männern bei 74 Jahren und bei Frauen bei 77 Jahren. Bei den männlichen Patienten war das Tumorstadium bei Diagnosestellung

günstiger (36% Stadium I im Vergleich zu 24% Stadium I bei Frauen), was sich in einem besseren relativen und absoluten Überleben im Vergleich zu weiblichen Blasenkrebs-Patienten widerspiegelt. Die absolute Überlebensrate stellt dar, welcher Anteil der Erkrankten nach einem bestimmten Zeitraum noch am Leben sind. Im Gegensatz dazu ist die relative Überlebensrate Ausdruck der krebsbedingten Sterblichkeit, sie ist der Quotient aus der absoluten Überlebensrate der Tumorpatienten und dem Überleben der Allgemeinbevölkerung in diesem Alter und dieses Geschlechts (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019b).

Die relevantesten Risikofaktoren für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms sind aktives und passives Tabakrauchen. Zudem ist die berufliche Exposition mit aromatischen Aminen als Risikofaktor bekannt. Darüber hinaus erhöhen Luftverschmutzung sowie Arsen oder Chlor im Trinkwasser die Erkrankungswahrscheinlichkeit für Blasenkrebs. Auch verschiedene Medikamente wie beispielsweise Chemotherapeutika sowie Strahlenbehandlung im Beckenbereich sind mit einem erhöhten Risiko an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken assoziiert (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019a). Außerdem steigt die Inzidenz für diese Krebserkrankung mit zunehmendem Lebensalter an. Auch die chronische Entzündung der Harnblase im Rahmen einer Infektion mit dem Erreger *Schistosoma haematobium* gilt als Risikofaktor für die Erkrankung an einem Plattenepithelkarzinom der Harnblase (Grundmann et al. 2018).

In Deutschland sowie im internationalen Vergleich mit anderen mitteleuropäischen Staaten ist die Inzidenzrate bei Männern für Blasenkrebs seit den späten neunziger Jahren stabil, während sie bei weiblichen Betroffenen ansteigt. Gleichzeitig ist die Mortalitätsrate bei beiden Geschlechtern sinkend (Antoni et al. 2017). Dieser Trend ist hauptsächlich auf den Rückgang des Tabakkonsums (Burger et al. 2013) sowie die Fortschritte in der onkologischen Behandlung invasiver Harnblasenkarzinome zurückzuführen (Antoni et al. 2017).

Das Hauptsymptom für das Vorliegen eines Blasenkarzinoms ist die schmerzlose Hämaturie, welche bei 85% der Betroffenen auffällt. Man unterscheidet zwischen makroskopischer und mikroskopischer Hämaturie, wobei vor allem die makroskopische Hämaturie als Alarmsignal gilt: bei zwischen 13 und 28% der Patienten mit Makrohämaturie liegt ein Urothelkarzinom vor (Kirkali et al. 2005). Weitere auf ein Blasenkarzinom hinweisend Symptome sind eine erhöhte Miktionsfrequenz und -drang sowie Dysurie.

Die Einteilung von Harnblasenkarzinomen erfolgt anhand der TNM-Klassifikation maligner Tumoren der Union for International Cancer Control (UICC). Dabei steht das T für die Ausbreitung des Primärtumors, welche mittels klinischer Untersuchung, bildgebenden sowie endoskopischen Verfahren und letztlich der Beurteilung von Biopsien ermittelt wird. Das N gibt Auskunft über das Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen, beim Harnblasenkarzinom sind dabei die Lymphknotenstationen des kleinen Beckens von Bedeutung (unterhalb der Abgänge der Aa. Iliacae communes). Das M in der Klassifikation steht für das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen des Tumors (Wittekind, International Union against Cancer, and Wiley-VCH 2020).

Tab. 1: TNM Klassifikation, T - Primärtumor (Wittekind, International Union against Cancer, and Wiley-VCH 2020)

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Ta	Nichtinvasives papilläres Kazinom
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert Muskulatur <ul style="list-style-type: none"> • T2a: Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte) • T2b: Tumor infiltriert tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)
T3	Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe

	<ul style="list-style-type: none"> • T3a: Mikroskopisch • T3b: Makroskopisch
T4	Tumor infiltriert Prostata, Samenblasen, Uterus, Vagina, Becken- oder Bauchwand <ul style="list-style-type: none"> • T4a: Tumor infiltriert Prostata, Samenblase, Uterus, Vagina • T4b: Tumor infiltriert Becken-/Bauchwand

Tab. 2: TNM-Klassifikation, N- regionäre Lymphknoten (Wittekind, International Union against Cancer, and Wiley-VCH 2020)

N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem Lymphknoten des kleinen Beckens
N2	Metastase(n) in multiplen Lymphknoten des kleinen Beckens
N3	Metastase(n) in Lymphknoten der Aa. Iliacae communes

Tab. 3: TNM-Klassifikation, M- Fernmetastasen (Wittekind, International Union against Cancer, and Wiley-VCH 2020)

M	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Metastasen in nicht-regionären Lymphknoten
M1b	Andere Fernmetastasen

Die standardmäßige Behandlung von Blasenkrebs erfolgt in Abhängigkeit des Tumorstadiums. In der Regel setzt sie sich zusammen aus der Entfernung des Tumors durch transurethrale Resektion bzw. Teil- oder Kompletentfernung der Harnblase (radikale Zystektomie) sowie vorausgehender (neoadjuvanter) oder anschließender (adjuvanter) lokaler oder systemischer Chemotherapie sowie Bestrahlung. Als wichtigster Bestandteil der traditionellen systemischen Chemotherapie wird den Patienten dabei das Alkylanz Cisplatin in Kombination mit anderen zytostatisch wirksamen Medikamenten verabreicht (Rübben 2014).

Dieser Therapieansatz gilt seit 30 Jahren als Goldstandard in der Therapie des Blasenkarzinoms (Bellmunt, Powles, and Vogelzang 2017), es hat sich jedoch gezeigt, dass etwa 30-50% der Patienten aufgrund von Komorbiditäten wie zum Beispiel einer eingeschränkter Nierenfunktion oder einer peripheren Neuropathie ungeeignet für eine Cisplatin-basierte Therapie sind (Galsky et al. 2011). Zudem ist diese Form der Chemotherapie mit erheblicher Toxizität und dementsprechend schweren Nebenwirkungen wie Neutropenie, Thrombozytopenie und Anämie verbunden (Necchi, Pond, et al. 2017), eine andauernde Remission der Erkrankung ist unter dieser Behandlung dagegen selten (John J. Coen 2019; De Santis et al. 2012). Als Konsequenz wurde in den letzten Jahren vermehrt nach alternativen Behandlungsmethoden gesucht, die zum einen gut verträglich und zum anderen auf ein breiteres Patientenspektrum anwendbar sind.

Histomorphologisch handelt es sich bei diagnostizierten Harnblasenkarzinomen im Großteil (94%) um Urothelkarzinome (Kraywinkel, Fiebig, and Schulz 2018), die entarteten Zellen gehen also vom spezialisierten Oberflächenepithel der Blase und der ableitenden Harnwege aus. Neben reinen Urothelkarzinomen unterscheidet man morphologisch eine Reihe von Tumoren mit abweichenden Differenzierungsmustern. So führt die WHO zahlreiche eigene Krankheitsidentitäten als Sonderformen von Blasenkrebs: das Harnblasenkarzinom mit plattenepithelialer, glandulärer, trophoblastischer, mikrozystischer, mikropapillärer, plasmazytoider, großzelliger, Lymphoepitheliom-artiger, lipid-reich, klarzelliger und sarkomatoider Differenzierung sowie die nested Variante des Urothelkarzinoms. Darüber hinaus werden nicht-urotheliale Tumoren der Blase erfasst: Neuroendokrine Tumoren, Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, Urachus-Karzinome sowie melanozytische und mesenchymale Tumoren (Weltgesundheitsorganisation Working Group on Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs et al. 2016). Dabei liegt der Anteil von Plattenepithelkarzinomen sowie von Adenokarzinomen je bei etwa 1%, wobei der Anteil dieser Sonderformen bei weiblichen Patienten erhöht ist (Kraywinkel, Fiebig, and Schulz 2018).

Insgesamt geht man heute davon aus, dass in bis zu einem Drittel der muskelinvasiven Blasenkarzinomen eine komplette oder teilweise divergente histologische Morphologie vorliegt (Linder et al. 2013). Es wurde gezeigt, dass diese Sonderformen von Blasenkrebs mit einer höheren Rate lokal fortgeschrittener Krankheitsstadien im Vergleich zum konventionellen Urothelkarzinom assoziiert sind (Linder et al. 2013), und somit möglicherweise mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Kirkali et al. 2005).

1.4 PD-L1 und Blasenkrebs

Atezolizumab	Durvalumab	Avelumab	Nivolumab	Pembrolizumab
May 2016, pre-treated AMUC (bladder cancer)	May 2017, pre-treated advanced/metastatic (bladder cancer)	Mar 2017, metastatic Merkel cell carcinoma	December 2014, advanced melanoma	September 2014, advanced melanoma
October 2016, metastatic NSCLC cancer	February 2018, unresectable Stage III NSCLC cancer	May 2017, AMUC (bladder cancer)	May 2015, lung cancer	October 2015, advanced/metastatic NSCLC cancer
April 2017, first line treatment advanced/metastatic (bladder cancer)			November 2015, metastatic renal cell carcinoma	August 2016, recurrent/metastatic head and neck squamous carcinoma
			May 2016, Hodgkin lymphoma	October 2016, first line treatment of metastatic NSCLC
			November 2016, head and neck cancer	March 2017, classical Hodgkin lymphoma
			February 2017, pre-treated AMUC (bladder cancer)	May 2017, AMUC (bladder cancer)
			August 2017, metastatic colorectal cancer with MSI or MMR deficiency	May 2017, any solid cancer with MSI or MMR deficiency
			September 2017, pre-treated hepatocellular carcinoma	September 2017, pre-treated advanced/metastatic gastric, gastroesophageal cancer
			August 2018, pre-treated SCLC	June 2018, pre-treated advanced/metastatic cervical cancer
				June 2018, pre-treated PMBCL

Information obtained through <https://www.drugs.com/history/> [Accessed 20 November 2018]. Only the first FDA approval for a non-bladder cancer was included in the table.

AMUC, advanced/metastatic urothelial carcinoma; MMR, mismatch repair; MSI, microsatellite instability; NSCLC, non-small cell lung cancer; PMBCL, primary mediastinal large B-cell lymphoma.

Abb.2: Darstellung der für das Urothelkarzinom von der FDA zugelassenen Medikamente (Dongkui Song et al, Bladder cancer, a unique model to understand cancer immunity and develop immunotherapy approaches, *J Pathol* 2019; 249: 151–165)

Derzeit sind von der Zulassungsbehörde U.S. Food and Drug Administration (FDA) für das Urothelkarzinom verschiedene immunonkologische Behandlungen mit Checkpointinhibitoren zugelassen. Als Erstlinientherapie für Patienten, die für eine Cisplatin-basierte Chemotherapie nicht in Frage

kommen, stehen die monoklonalen Antikörper Pembrolizumab und Atezolizumab zur Verfügung (Suzman et al. 2019). Diese werden den Patienten in Form von intravenösen Kurzinfusionen verabreicht. Bei Pembrolizumab handelt es sich um einen Anti-PD1-Antikörper, während Atezolizumab als Anti-PD-L1-Antikörper wirkt. Zudem können Patienten mit Urothelkarzinom in der Zweitlinientherapie mit obenstehenden Antikörpern oder alternativ mit Nivolumab (Anti-PD1-Antikörper), Durvalumab (Anti-PD-L1-Antikörper) oder Avelumab (Anti-PD-L1-Antikörper) behandelt werden.

Grundlage für die im Frühjahr des Jahres 2017 erfolgte beschleunigte Zulassung der Erstlinienmedikamente waren die Ergebnisse hinsichtlich Effizienz und Sicherheit der einarmigen Phase II Studien KEYNOTE-052 (Balar, Castellano, et al. 2017) für Pembrolizumab und IMvigor210 (Necchi, Joseph, et al. 2017) für Atezolizumab. In beiden Studien wurden Patienten ungeachtet der PD-L1-Expression des Tumors behandelt und es zeigte sich eine allgemeine Ansprechrate (engl. Objective response rate = ORR) von 28,6% (95% Konfidenzintervall: 24,1% - 33,5%) für Pembrolizumab und eine ORR von 23,5% (95% Konfidenzintervall: 16,2% - 32,2%) für Atezolizumab. Das Profil der unerwünschten Arzneimittelwirkungen der beiden getesteten Medikamente war ähnlich und immunvermittelte unerwünschte Ereignisse traten in etwa 10-20% der Fälle auf (Suzman et al. 2019).

Zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Dissertation existieren zwei den Medikamenten entsprechende fortlaufende randomisierte Phase III Studien: KEYNOTE-361 (ClinicalTrials.gov Identifikationsnummer NCT02853305) für Pembrolizumab und IMvigor130 (ClinicalTrials.gov Identifikationsnummer NCT02807636) für Atezolizumab, in denen der Nutzen der Arzneimittel weiter ermittelt werden soll. In den angeführten Studien wurden nur solche Patienten aufgenommen, bei denen das Tumorgewebe einen gewissen Grenzwert der PD-L1-Expression überschritten, da sich für Patienten mit negativem PD-L1-Status eine verminderte ORR ergeben hat (Suzman et al. 2019). Eine weitere Voraussetzung für die Anwendung dieser Arzneimittel ist neben der Kontraindikation für eine Chemotherapie mit Cisplatin demzufolge die Testung

des Tumorgewebes oder der den Tumor infiltrierenden Immunzellen auf die Expression von PD-L1.

Inzwischen kommen immunonkologische Therapien beim Blasenkarzinom sowohl im frühen Krankheitsgeschehen als auch bei fortgeschrittenen Krebsstadien zur breiten Anwendung (Song et al. 2019). Dabei konnte die Überlegenheit der PD-1-Inhibitoren gegenüber der konventionellen Cisplatin-basierten Chemotherapie hinsichtlich des Therapieansprechen und der Toxizität belegt werden (Powles et al. 2018).

1.5 PD-L1 in der histopathologischen Diagnostik

Wie oben ausgeführt beinhalten die Einschlusskriterien der Teilnahme an den laufenden Medikamentenstudien das Vorliegen der PD-L1-Expression des Tumorgewebes. Für die Anwendung der checkpointinhibitorischen Erstlinien-Arzneimittel ist eine vorausgehende immunhistochemische Testung des Tumors daher obligatorisch, die FDA spricht von einer „companion diagnostic“. Diese Testung des Tumorgewebes erfolgt immunhistochemisch unter Verwendung monoklonaler Antikörper und ist zum heutigen Stand bei verschiedenen Tumorerkrankungen fester Bestandteil der histopathologischen Routinediagnostik, so auch im Falle des Urothelkarzinoms. Hier wird inzwischen sogar empfohlen, alle vorliegenden Biopsiematerialien von Blasenkrebs standardmäßig in Form einer Reflexdiagnostik auf PD-L1 zu untersuchen. Dabei ist zu beachten, dass man bei der Durchführung dieser obligatorischen IHC-Diagnostik in Europa – anders als in den USA – nicht an der die Auswahl eines spezifischen Antikörpers gebunden ist (Schildhaus 2018).

Als Folge dessen ist die standardisierte Durchführung und Auswertung der PD-L1-Diagnostik von Urothelkarzinomen in den letzten Jahren zunehmend Bestandteil des pathologischen Diagnostik-Alltags geworden. Es existieren eine Reihe spezifischer Auswertelgorithmen, welche sich bezüglich der Tumorentität sowie des einzusetzenden Medikaments in ihrer Handhabung und Interpretation grundlegend unterscheiden. Durch die Zunahme der Zulassungen verschiedener Arzneimittel unterliegt diese Form der Diagnostik einer rasanten Dynamik und erfordert eine ständige Anpassung des diagnostischen Standards.

Der PD-L1-Status eines Tumors liefert idealerweise relevante Hinweise über die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolges mit Checkpoint-Inhibitoren. Es wurde gezeigt, dass eine hohe Zahl an PD-L1 exprimierenden Zellen in einem Tumor ein negativer prognostischer Faktor darstellt, so auch für das Urothelkarzinom (Wu et al. 2015). Auf Grundlage dieses diagnostischen Werkzeuges wird also die Behandlungsentscheidung getroffen, was letztendlich direkte Auswirkung auf den Therapieverlauf, die Lebensqualität und nicht zuletzt den weiteren Krankheitsverlauf und -ausgang für den Erkrankten hat.

Folglich ist es erforderlich, an die Qualität und Performance der bei der PD-L1-Immunhistochemie eingesetzten Antikörper höchste Anforderungen zu stellen. Dies ist umso wichtiger, da es zum heutigen Stand keine technische Alternative zur Immunhistochemie mit dem Ziel der Verifizierung des Ergebnisses gibt (Schildhaus 2018). Sowohl bei der Präanalytik im Rahmen der Gewebeauswahl und -aufarbeitung, bei der Auswahl von Antikörpern und Färbeprotokoll als auch bei der Anwendung der Auswertelgorithmen sind vorgegebene Standards einzuhalten und diese durch eine fortlaufende Qualitätskontrolle sicherzustellen.

1.6 Fragestellung

Bei den klinischen Studien zur Zulassung der heute zur Behandlung des Urothelkarzinoms verfügbaren immunonkologischen Medikamente stellt das Vorliegen einer heterologen Histomorphologie ein Exklusionskriterium dar (Balar, Castellano, et al. 2017; Necchi, Joseph, et al. 2017; Sharma et al. 2017). Es wird aufgrund dessen ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Testung bei diesen Sonderformen von Blasenkrebs nicht erforderlich ist, da die Zulassung oben genannter Medikamente diese Tumorentitäten nicht beinhaltet (Schildhaus 2018).

Die Datenlage zur Expression von PD-L1 bei Blasenkrebs mit heterologer oder ausschließlich non-urothelialer Histomorphologie war zunächst von geringem Umfang (Pichler et al. 2017; Faraj et al. 2015; Reis et al. 2019; Tretiakova et al. 2018). In den letzten Jahren erlangte diese Fragestellung zunehmende Beachtung, der Erkenntnisstand wurde jüngst in einem Review von Compérat et al. beleuchtet (Comperat et al. 2021). Der Einsatz von Checkpointinhibitoren

bei herkömmlichem Blasenkrebs ist unterdessen bereits therapeutischer Standard geworden und von gutem Ansprechen und Verträglichkeit gekennzeichnet (Powles et al. 2018). Es bleibt derzeit trotz des wachsenden Erkenntnisgewinns auf diesem Gebiet nach wie vor offen, in welchem Ausmaß auch Sonderformen des Urothelkarzinoms das PD-L1 Protein exprimieren und somit davon betroffene Patienten potentiell von einer Therapie mit Checkpointinhibitoren profitieren könnten. Dies haben wir wie im Folgenden dargestellt untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Erstellung der Studienkollektive

Retrospektiv wurden aus der Patienten-Datenbank des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) zwei getrennte Studienkohorten mit Blasenkrebs-Patienten erstellt. Für beide Kollektive wurden nur Fälle mit einem invasiven Tumorprozess (T1-T4) eingeschlossen, nicht-invasive (in-situ) Komponenten jedoch exkludiert. Die Proben wurden operativ entweder durch TURB oder Zystektomie in der urologischen Abteilung des Klinikums vor Ort gewonnen. Mit Immun- oder Radiotherapie vorbehandelte Patienten wurden in der Kollektiverstellung nicht berücksichtigt.

Für das Sonderformen-Kollektiv wurden 43 Fälle aus den Jahren 2007 bis 2019 mit teilweiser, prädominanter oder reiner Ausbildung einer vom normalen Urothelkarzinom abweichender Morphologie ausgewählt. Konkret beinhaltete die Suche Blasenkrebsfälle mit plattenepithelialer, sarkomatoider, plasmazytoider, mikropapillärer, neuroendokriner und klarzelliger Differenzierung sowie Adeno- und Urachuskarzinome und Karzinome vom lipid-rich type.

Parallel dazu wurde ein 28 Fälle umfassendes Vergleichskollektiv von Karzinomen mit herkömmlicher urothelialer Morphologie aus den Jahren 2014 bis 2018 erstellt. Es wurden lediglich Fälle eingeschlossen, die diagnostisch eine „high-grade“ (G2/G3) Differenzierung aufwiesen.

Die Patienten wurde pseudoanonymisiert und gemeinsam mit Geschlecht, Erkrankungsalter und Tumor-Staging (nach TNM) erfasst. Pro Fall wurden anhand der bereits vorliegenden HE-Schnitte ein bis zwei repräsentative Tumoreale ausgewählt. Anschließend wurde das primäre Tumormaterial dem Blockarchiv des Pathologischen Instituts des UKT entnommen.

Die Prüfung und Bewilligung der Studie erfolgte durch die Ethikkommission des UKT unter der Prüfnummer 157/2019 B02.

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Vorbereitung der Schnitte

Das Tumorgewebe lag in Form von Paraffinblöcken vor, welche im Archiv des Instituts nach der ausreichenden Fixierung in einer 4%igen Formaldehyd-Lösung sachgerecht gelagert worden waren. Von den paraffinierten Gewebeproben wurden je drei 2,5 Mikrometer dicke Schnittpräparate auf TOMO Objektträgern angefertigt für die anschließende immunhistochemische Färbung.

2.2.2 Funktionsweise der Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie basiert auf der Sichtbarmachung von zellulären Strukturen eines Gewebes auf Proteinebene. Hierfür werden spezielle monoklonale Antikörper auf das dünn geschnittene Tumormaterial aufgebracht, welche an die für sie spezifischen Antigen-Strukturen binden. In einem zweiten Schritt werden die gebundenen Antikörper mit Hilfe von Farbpartikeln auf dem Gewebeschnitt sichtbar gemacht.

2.2.3 Auswahl und Charakteristika der Antikörper

Es wurden drei verschiedene Primärantikörper von unterschiedlichen Herstellern verwendet, welche jeweils spezifisch für das PD-1 beziehungsweise PD-L1 Protein sind und zu dessen in-vitro-Darstellung auf dem Tumorgewebe routinemäßig eingesetzt werden. Dabei handelt es sich bedingt durch die Lokalisation der Zielstruktur um eine extrazelluläre, membranäre Färbung. Im Vorfeld hat eine der Qualitätskontrolle dienende Validierung aller Antikörper durch das für die Färbung zuständige Labor des Institutes für Pathologie des UKT stattgefunden. Die Charakteristika der verschiedenen Antikörper sind Tab.4 sowie den Produktinformationen im Anhang zu entnehmen.

2.2.3.1 SP142 (Roche)

Beim VENTANA SP142 (PD-L1) Assay handelt es sich um einen monoklonalen primären Anti-PD-L1-Kaninchen Antikörper. Der Assay wurde 2018 vom Hersteller entwickelt, um die Indikation zur Behandlung mit TECENTRIQ (Atezolizumab) (Nordic Immunohistochemistry Quality Control 2019) zu stellen.

Er ist für die Bestimmung der Expression von PD-L1 beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom sowie für Urothelkarzinome bestimmt. Konzeptionell ist dieser Antikörper für die Detektion und Quantifizierung der tumorassoziierten Immunzellen vorgesehen und nicht für die Anwendung an Epithelzellen konstruiert.

2.2.3.2 28-8 (abcam)

Beim monoklonalen Kaninchen-Antikörper gegen PD-L1 der Firma abcam handelt es sich um einen Antikörper des Isotyps IgG. Dieser Antikörper eignet sich zur Darstellung der PD-L1 Expression sowohl bei tumorassoziierten Immunzellen als auch bei Tumorepithelien.

2.2.3.3 22C3 (dako)

Der Antikörper 22C3 von dako ist ein monoklonaler Maus-Antikörper mit spezifischer Bindung an die extrazelluläre Domäne von PD-1 an der Zelloberfläche von normalem und neoplastischem Gewebe. Er ist für den Einsatz bei diagnostizierten Urothelkarzinomen zur Identifizierung von Patienten für die Behandlung mit KEYTRUDA (Pembrolizumab) (Nordic Immunohistochemistry Quality Control 2019) entwickelt worden. Auch bei diesem Antikörper kommt die PD-L1-Expression von Immunzellen sowie von Tumorepithelien zur Darstellung.

Tab. 4: Charakteristika der verwendeten Antikörper

<i>Klon</i>	28-8 (<i>abcam</i>)	22C3 (<i>dako</i>)	SP142 (<i>Ventana</i>)
<i>Beschreibung</i>	Kaninchen monoklonal	Maus monoklonal	Kaninchen monoklonal
<i>Bestellnummer</i>	Ab205921	M3653	741-4860
<i>Verdünnung</i>	1:100	1:50	Ready to use kit

2.2.4 Durchführung der Färbung

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Präparate zuerst mit EDTA-Puffer CC1 Standard vorbehandelt. Bei den Antikörpern 28-8 und 22C3 wurden die Antikörper manuell mit Cytomed Antibody Diluent gemäß der Empfehlung des entsprechenden Herstellers verdünnt in einem Verhältnis von 1:50 im Fall von 28-8 beziehungsweise 1:100 im Fall von 22C3 und anschließend händisch auf die vorbehandelten Schnitte aufpipettiert. Für den Antikörper SP142 wurde der vom Hersteller bereitgestellte fertige Antikörper-Kit verwendet. Die Färbung wurde vollautomatisch mit einem Benchmark XT Färbeautomaten (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) für die Antikörper 28-8 und 22C3 sowie mit einem BenchMark ULTRA Färbeautomaten (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) für den Antikörper SP142 gemäß den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. In beiden Fällen diente als Detektionssystem das OptiView DAB Detection Kit von Roche (Mannheim, Deutschland). Als Gegenfärbung wurde Hämatoxylin und Bluing verwendet. In jedem Färbedurchgang wurde als on-slide-Positivkontrolle unauffälliges Tonsillengewebe in den Färbeprozess integriert. Im Anschluss an die Färbung wurden die Schnitte zuerst mit handelsüblichem Spülmittel und Wasser gereinigt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 95%, 100% für je 1 Minute) entwässert. Zum Schluss wurden die Präparate mit Cytoseal XYL versiegelt und mit Menzel Cover Slips Deckgläsern bedeckt.

2.3 Auswertung

Die Auswertung der Fälle beider Kollektive anhand der gefärbten Schnittpräparate erfolgte lichtmikroskopisch in Anwesenheit eines erfahrenen und speziell für die PD-L1-Bewertung geschulten und mit dessen Routinediagnostik vertrauten Pathologen. Die Diagnostik erfolgte in den Vergrößerungen 1:100 und 1:200.

2.3.1 Anwendung von Scores

Um die immunhistochemischen Ergebnisse zu quantifizieren und damit vergleichbar zu machen, bediente man sich zweier für das Urothelkarzinom international etablierter Auswertungssysteme, da die Zulassungsstudien von

Pembrolizumab und Atezolizumab unterschiedliche immunhistochemische Nachweismethoden voraussetzen.

In der vorliegenden Studie wurde zum einen der Combined positivity score (CPS) als auch der Immune cell score (IC score) für jeden der Fälle in beiden Kollektiven ermittelt. Beide Scoring-Systeme haben zum Ziel, den prozentualen Anteil immunhistochemisch gefärbter Zellen in Relation zur Tumorzellpopulation darzustellen. Dabei ist die Färbeintensität nicht von Bedeutung, schwach gefärbte Zellen werden ebenso berücksichtigt wie Zellen mit einer stärkeren Färbung. Um eine repräsentative Aussage machen zu können, ist darauf zu achten, dass mindestens 50 bis 100 vitale Tumorzellen im verwendeten Gewebeabschnitt enthalten sind. Es wird stets die Gesamtheit der Zellpopulation eines Präparats in die Erhebung des Score-Werts einbezogen.

Die klinische Relevanz ergibt sich aus den für die Scores unterschiedlichen definierten Cut-off-Werten: Liegt der Wert der PD-L1 Expression über dem Cut-off, so besteht die Therapieoption mit dem zugehörigen Checkpoint-Inhibitor.

2.3.1.1 Combined positive score (CPS) - Pembrolizumab Medikation

Bei diesem Auswertesystem werden sowohl Tumorzellen als auch Immunzellen berücksichtigt und die Gesamtheit beider Zellreihen auf die Totalität der Tumorzellen bezogen. Der dimensionslose Maximalwert ist dabei auf 100 beschränkt. Es werden nur diejenigen Tumorzellen berücksichtigt, die eine lineare membranäre Färbung aufweisen, außerdem werden auch nicht-invasive Tumoranteile in die Berechnung eingeschlossen. Für die Immunzellen des Tumorgewebes und des tumorassoziierten Stromas gilt, dass eine membranäre und zytoplasmatische Färbung bei Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen berücksichtigt wird, Granulozyten und Plasmazellen jedoch von der Bewertung ausgeschlossen sind. Es werden zudem nur Immunzellen mitgerechnet, welche sich in einem Radius des 20x-Objektiv unmittelbar um die invasive Tumorkomponente befinden. Gefärbte nekrotische Zellareale oder TURB-Granulom-assoziierte Zellen sowie sonstige Stromazellen werden nicht berücksichtigt.

Der kritische Cut-off für Urothelkarzinome liegt bei einem Quotienten von ≥ 10 für den Einsatz von Pembrolizumab in der Erstlinientherapie.

Veranschaulichende Formel: $CPS = \frac{(\text{gefärbte TC} + \text{gefärbte MIC}) \times 100}{\text{Tumorzellen}}$

2.3.1.2 Immunzellscore (IC score) – Atezolizumab Medikation

Bei diesem Algorithmus werden lediglich die PD-L1 Expression der Immunzellen einbezogen, nicht jedoch die Färbung der Tumorzellen. Es wird jegliche Färbung von Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten in die Bewertung einbezogen, Plasmazellen hingegen werden nicht gewertet. Es wird das gesamte Tumorareal sowie das assoziierte Stroma betrachtet, in Blutgefäßen befindliche Immunzellen allerdings werden nicht in die Berechnung integriert. Anschließend wird der prozentuale Anteil positiver Immunzellen auf die Gesamtheit der Tumorfläche bezogen und ein Score-Wert von 0 bis 3 gemäß nachfolgender Regel vergeben:

- IC 0: $< 1\%$
- IC 1: $\geq 1\%$ und $< 5\%$
- IC 2: $\geq 5\%$ und $< 10\%$
- IC 3: $\geq 10\%$

Für Urothelkarzinome liegt der Cut-Off-Wert bei 5%, entsprechend einem $IC \geq 2$. für den Einsatz von Atezolizumab in der Erstlinientherapie.

Veranschaulichende Formel: $IC\ score = \frac{\text{gefärbte IC}}{\text{Tumorfläche}}$

2.3.2 Statistik

Alle statistischen Daten wurden mithilfe der SPSS Version 25 Software (IBM Corporation) erhoben.

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Studienkollektive

Tab. 5: Geschlechterverteilung und Alter bei Diagnosestellung

<i>Alter in Jahren</i>	Geschlecht	N	Minimum	Maximum	Durchschnitt
<i>Subtypen</i>	Männlich	31 (72%)	42	88	68,29
	Weiblich	12 (28%)	41	94	71,33
<i>Urothel-Karzinom</i>	Männlich	25 (89%)	44	90	73,16
	Weiblich	3 (11%)	69	92	80,00

Das Sonderformenkollektiv umfasste 43 Fälle (n=31 männlich; n=12 weiblich) mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 69 Jahren (Minimum 41 bis Maximum 94 Jahre; siehe Tab.5). Die Probengewinnung erfolgte bei 31 Fällen durch Zystektomie, die übrigen 12 Fälle wurden durch TURB gewonnen.

Die Vergleichskohorte bestand aus 28 Fällen (n=25 männlich; n=3 weiblich) von Patienten mit herkömmlichen Urothelkarzinomen und das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei 74 Jahren (Minimum 44 bis Maximum 92 Jahre; siehe Tab.5). In diesem Kollektiv wurde das Gewebe in 9 der Fälle mittels Zystektomie und bei 19 weiteren durch TURB gewonnen.

Das Tumor-Staging ist Tab.6 und Tab.7 zu entnehmen.

Tab. 6: Tumorstaging der Patientenkohorte - Sonderformen

Sonderformen		N	%
<i>männlich</i>	TURB	9	29,0
	pT2	2	6,5
	pT3	9	29,0
	pT4	11	35,5
	total	31	100,0
<i>Weiblich</i>	TURB	3	25,0
	pT3	5	41,7
	pT4	4	33,3
	total	12	100,0

Tab. 7: Tumorstaging der Patientenkohorte - Urothel-Karzinom

Urothel-Karzinom		N	%
<i>männlich</i>	TURB	17	68,0
	pT1	3	12,0
	pT2	2	8,0
	pT3	2	8,0
	pT4	1	4,0
	total	25	100,0
<i>weiblich</i>	TURB	2	66,7
	pT4	1	33,3
	total	3	100,0

Die Fälle des Sonderformenkollektivs wurden nach den verschiedenen Tumorentitäten sortiert. Es waren insgesamt 6 sarkomatoide, 10 mikropapilläre, 5 neuroendokrine, 14 plattenepithelale und 4 plasmazytoide Karzinome enthalten, sowie je ein Fall eines klarzelliges Karzinoms, eines Urachus-Karzinoms, eines muzinösen Adenokarzinoms und eines Karzinoms vom lipid rich type (siehe Tab.8).

Tab. 8: Anteil der im Kollektiv enthaltenen Sonderform-Typen

Sonderform	N (total 43)
Sarkomatoid	6 (14%)
Mikropapillär	10 (23%)
Neuroendokrin	5 (12%)
Plattenepithelial	14 (33%)
Plasmozytoid	4 (9%)
Klarzellig	1
Urachus-Karzinom	1
Muzinöses Adenokarzinom	1
Lipid rich type	1

3.2 Ergebnisse der Auswertung der Immunhistochemie

Ein Fall wurde dann als positiv gewertet, wenn er bei mindestens einem der drei Antikörper bei mindestens einem der beiden Auswertesysteme über dem festgelegten Cut-off-Wert ($CPS \geq 10$ beziehungsweise $IC \text{ score} \geq 5\%$) lag.

Beim Sonderformenkollektiv wurden 19 (44%) der Fälle PD-L1 positiv befundet, beim Vergleichskollektiv der Urothelkarzinome waren 10 Fälle (36%) mit einem positiven Reaktionsprodukt.

Tab. 9: Absoluter und prozentualer Wert der PD-L1 positiven Fälle beider Gesamt-Kollektive

	Sonderformen	Urothel-Karzinom
Positiv	19 (44%)	10 (36%)
Negativ	24 (56%)	18 (64%)

Anschließend wurde das Kollektiv der Sonderformen auf die Positivitätsrate der unterschiedlichen Subtypen untersucht. Es reagierten 3 der insgesamt 6 sarkomatoiden Tumoren positiv (50%), 2 der 10 mikropapillären (20%), 2 der 5 neuroendokrinen (40%) und 9 der 14 plattenepithelalen Karzinome (64%). Ferner zeigten 2 der 4 plasmazytoiden Tumoren ein positives Reaktionsprodukt (50%), je ein Fall eines klarzelligen Karzinoms, eines Urachuskarzinoms und eines Adenokarzinoms fielen negativ aus. Der Fall des lipid rich Karzinoms wurde positiv befundet (100%).

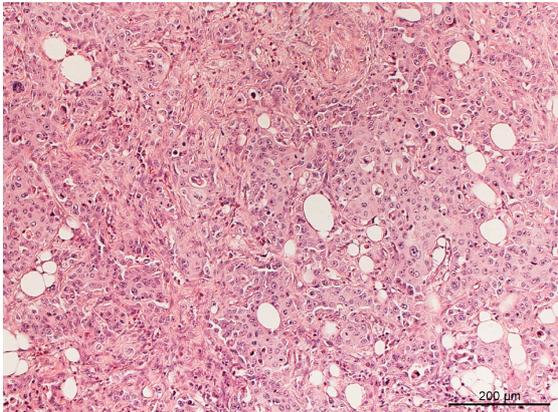
Tab. 10: Einzelergebnisse des Sonderformkollektivs bezogen auf die Subtypen

	<i>negativ</i>	<i>Positiv (score range)</i>	<i>% (+)</i>
<i>Sarkomatoid (6)</i>	3	3 (CPS 10-60; IC 8%-20%)	50
<i>Mikropapillär (10)</i>	8	2 (CPS 10-30; IC 5%-15%)	20
<i>Neuroendokrin (5)</i>	3	2 (CPS 10-20; IC 5%-20%)	40
<i>Plattenepithelial (14)</i>	5	9 (CPS 10-100; IC 5%-30%)	64
<i>Plasmazytoid (4)</i>	2	2 (CPS 10-12; IC 5%-7%)	50
<i>Klarzellig</i>	1	0	0
<i>Urachus-Karzinom</i>	1	0	0
<i>Adeno-Karzinom</i>	1	0	0
<i>Lipid rich</i>	0	1	100

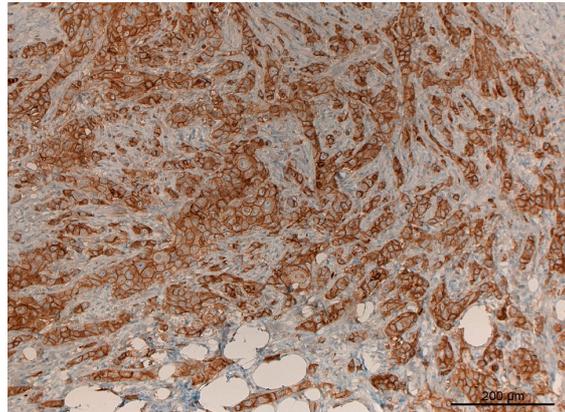
3.2.1 Beispiele positiver Sonderformen

PD-L1 positive Reaktionsprodukte werden auf den folgenden Seiten beispielhaft an Bildern eines Plattenepithelkarzinoms und eines sarkomatoiden Karzinoms dargestellt.

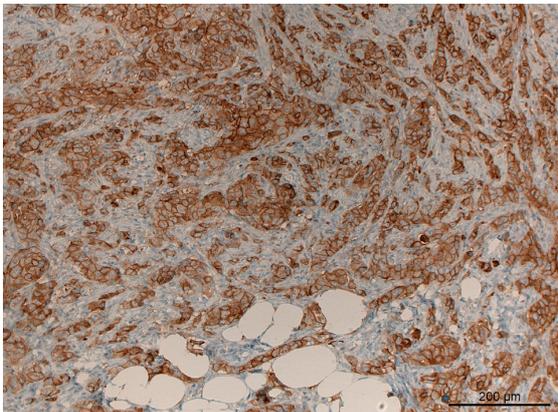
Beispiel eines positiven Plattenepithel-Karzinoms, männlich, 73 Jahre



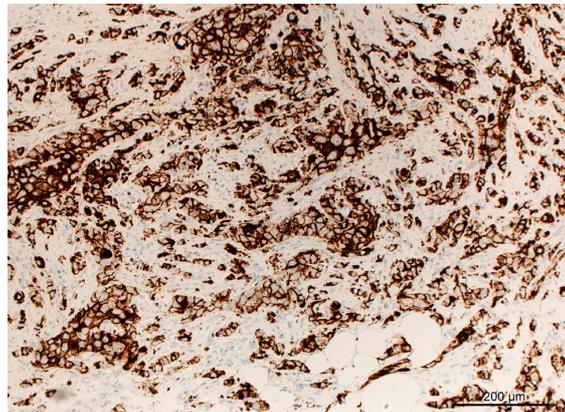
HE, 100x



28-8 abcam, 100x (CPS 100; IC 0%)

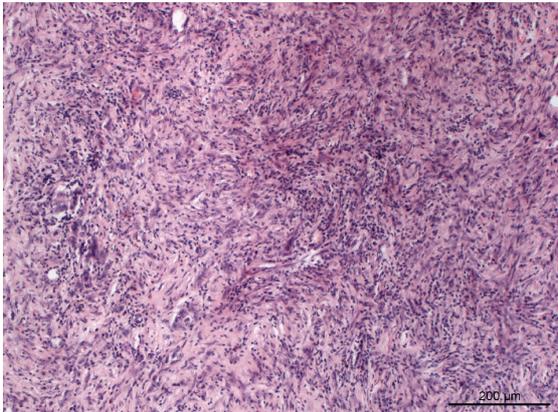


22C3 dako, 100x (CPS 100; IC 0%)

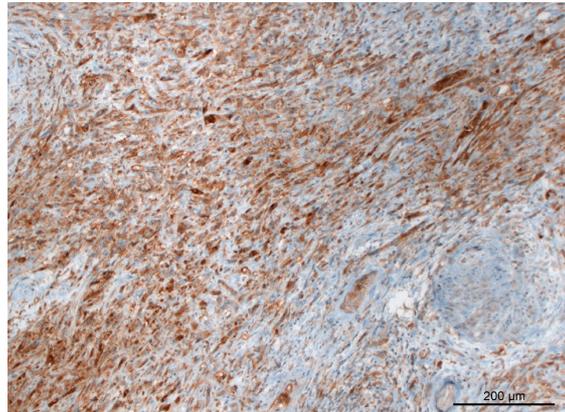


SP142 Ventana, 100x (CPS 100; IC 0%)

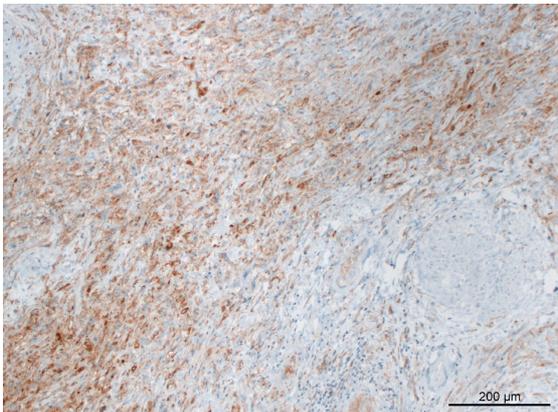
Beispiel eines positiven sarkomatoiden Karzinoms, männlich, 71 Jahre



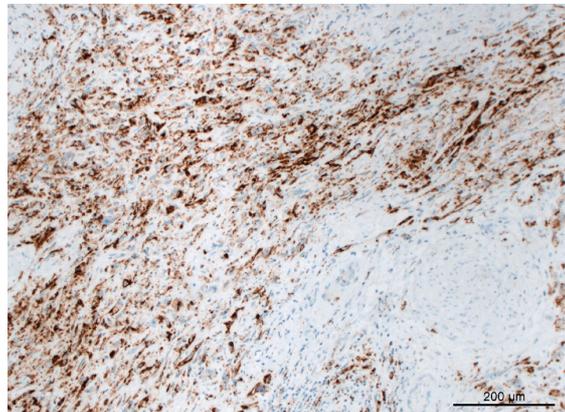
HE, 100x



28-8 abcam, 100x (CPS 60; IC 1%)



22C3 dako, 100x (CPS 60; IC 1%)



SP142 Ventana, 100x (CPS 50; IC 20%)

3.2.2 Performance der Antikörper, diskordante Fälle

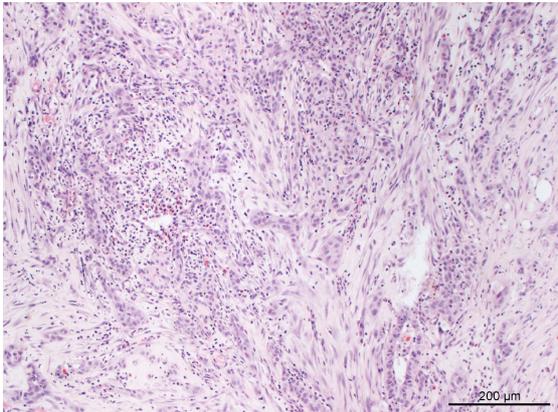
Innerhalb des Sonderformenkollektivs ergaben bei einzelnen Fällen die Scoring-Ergebnisse je nach eingesetztem Antikörper unterschiedliche Ergebnisse. Bei einem Fall eines Plattenepithel-Karzinoms wurde die Färbung mit dem Klon 28-8 (IC 10%) sowie dem Klon 22C3 (IC 5%) positiv bewertet, während bei der Auswertung der Färbung mit SP142 die erzielten Score-Werte unter dem Cut-off blieben. Auch bei einem Tumor mit sarkomatoider Differenzierung erreichten die Färbungen mit 28-8 (CPS 12, IC 10%) und 22C3 (CPS 10, IC 8%) positive Werte, nicht jedoch die Färbung mit dem Klon SP142. Im Falle eines mikropapillären Karzinoms überschritt lediglich die Bewertung des Schnittes, der mit 28-8 gefärbt worden war den Cut-off-Wert (CPS10).

Tab. 11: Score-Werte der drei diskordanten Fälle je Antikörper; rot markiert sind die Score-Werte über dem Cut-off

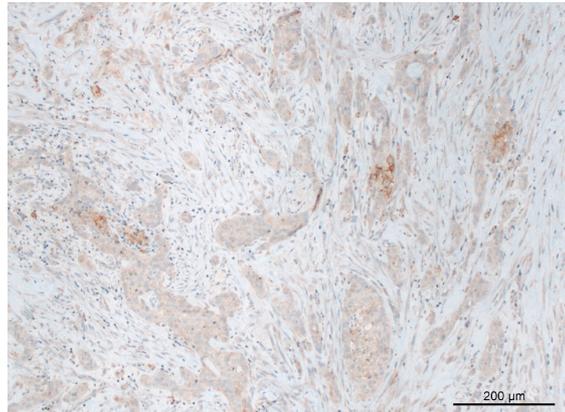
Diskordante Fälle	Plattenepithel	Sarkomatoid	Mikropapillär
28-8 (abcam)	CPS 8	CPS 12	CPS 10
	IC 10%	IC 10%	IC 0%
22C3 (dako)	CPS 5	CPS 10	CPS 5
	IC 5%	IC 8%	IC 0%
SP142 (Roche)	CPS 1	CPS 4	CPS 1
	IC 3%	IC 4%	IC 4%

Im Folgenden sind diese drei Fälle des Sonderformenkollektivs bildhaft dargestellt. Es sei darauf hingewiesen, dass es sich bei den gewählten Bildern um repräsentative Gewebsabschnitte handelt und diese nicht die Gesamtheit des Tumorgewebes, welches für das Scoring herangezogen wurde, darstellt.

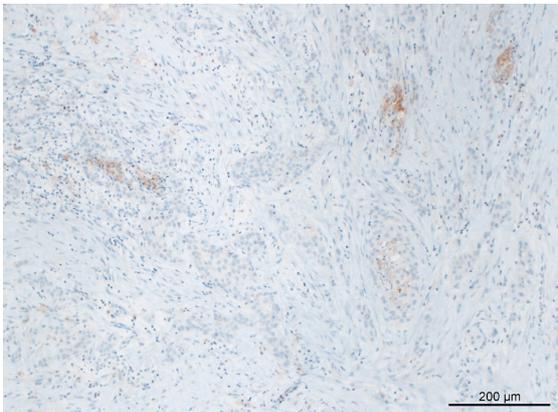
Diskordanter Fall - Plattenepithelial, männlich, 79 Jahre



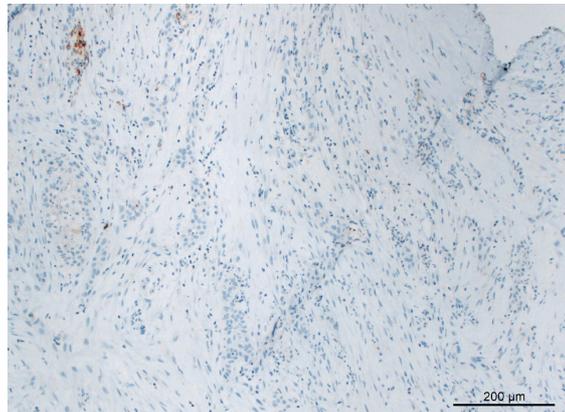
HE, 100x



28-8 abcam, 100x (CPS 8; IC 10%)

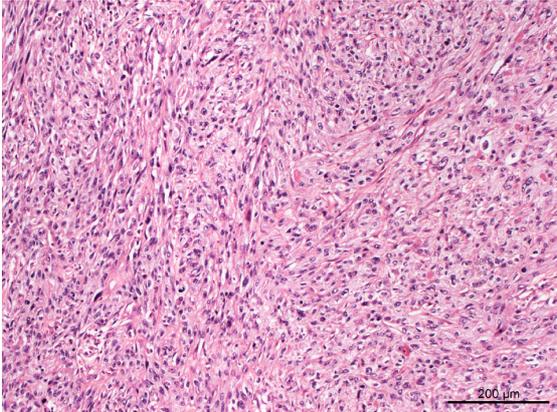


22C3 dako, 100x (CPS 5; IC 5%)

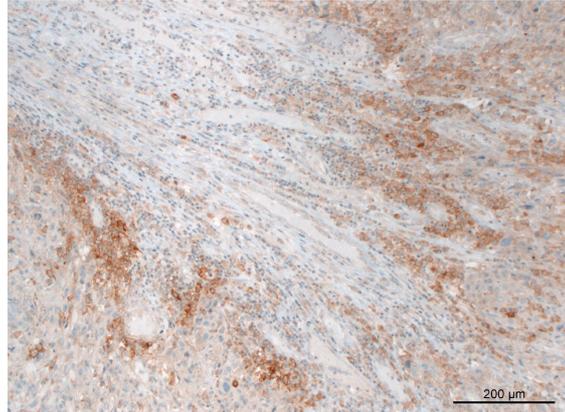


SP142 Ventana, 100x (CPS 1; IC 3%)

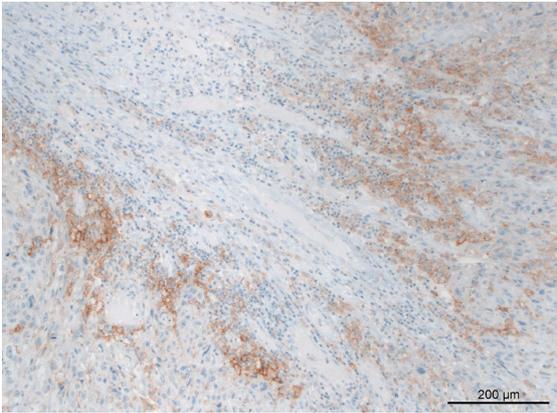
Diskordanter Fall - Sarkomatoid, männlich, 77 Jahre



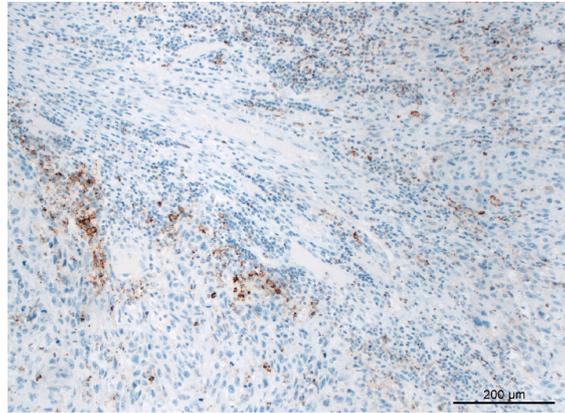
HE, 100x



28-8 abcam, 100x (CPS 12; IC 10%)

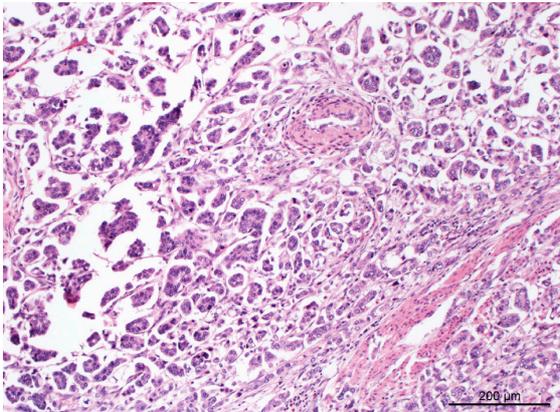


22C3 dako, 100x (CPS 10; IC 8%)

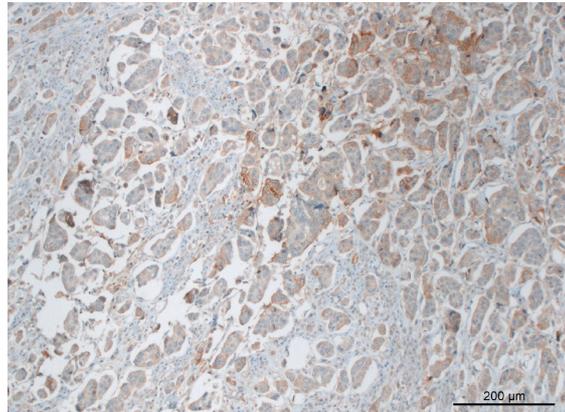


SP142 Ventana, 100x (CPS 1; IC 4%)

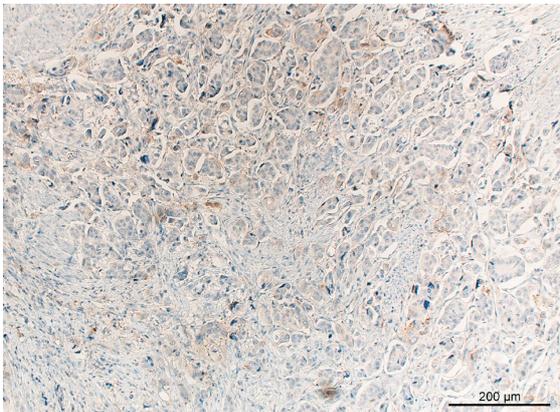
Diskordanter Fall - Mikropapillär, männlich, 56 Jahre



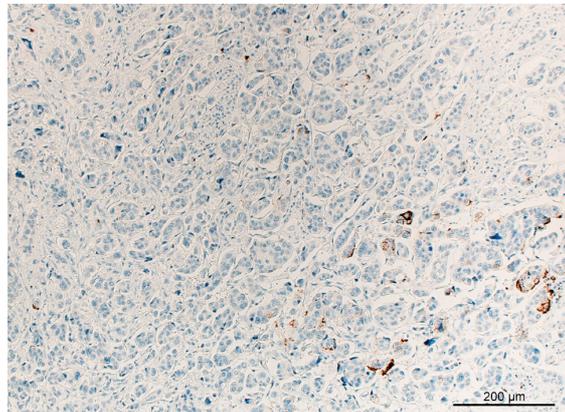
HE, 100x



28-8 abcam, 100x (CPS 10; IC 0%)



22C3 dako, 100x (CPS 5; IC 0%)

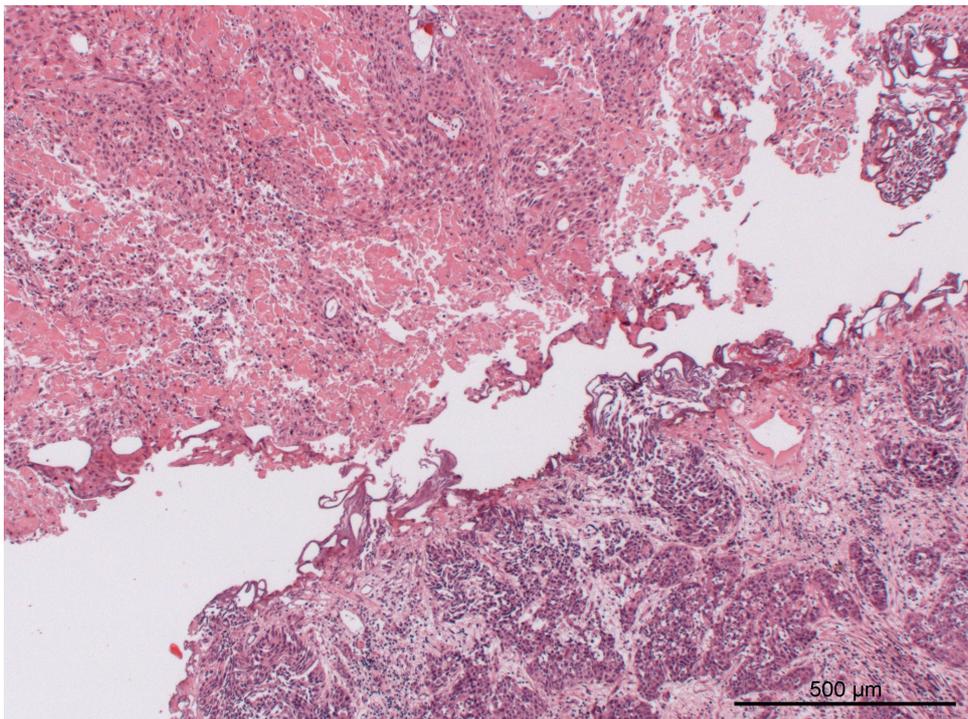


SP142 Ventana, 100x (CPS 1; IC 4%)

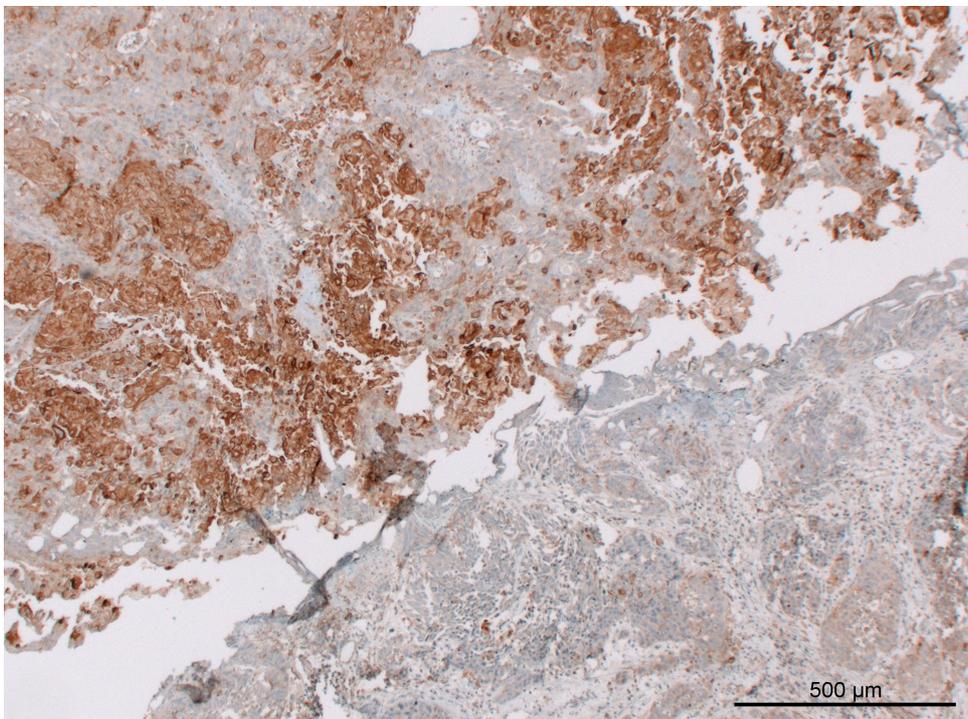
3.2.3 Sonderfall: Plattenepithelkarzinom mit Urothelkarzinom-Anteil

Bei einem der Fälle der Plattenepithelkarzinome aus dem Sonderformenkollektiv bestand parallel zu der plattenepithelalen Komponente ein Areal mit urothelialer Tumordifferenzierung. Dabei erreichte der plattenepitheliale Anteil in allen drei Antikörpern positive Score-Werte (CPS 60, IC 30 bei abcam; CPS 20, IC 10 bei dako; CPS 15, IC 20 bei Roche), während die urotheliale Tumorkomponente als negativ bewertet wurde. Auf den folgenden Seiten sollen Bilder der HE-Färbung und der verschiedenen Antikörperfärbungen, auf denen jeweils beide Tumorkomponenten abgebildet sind, dies veranschaulichen.

Sonderfall: Plattenepithel-Ca mit urothelialelem Anteil, männlich, 75 Jahre

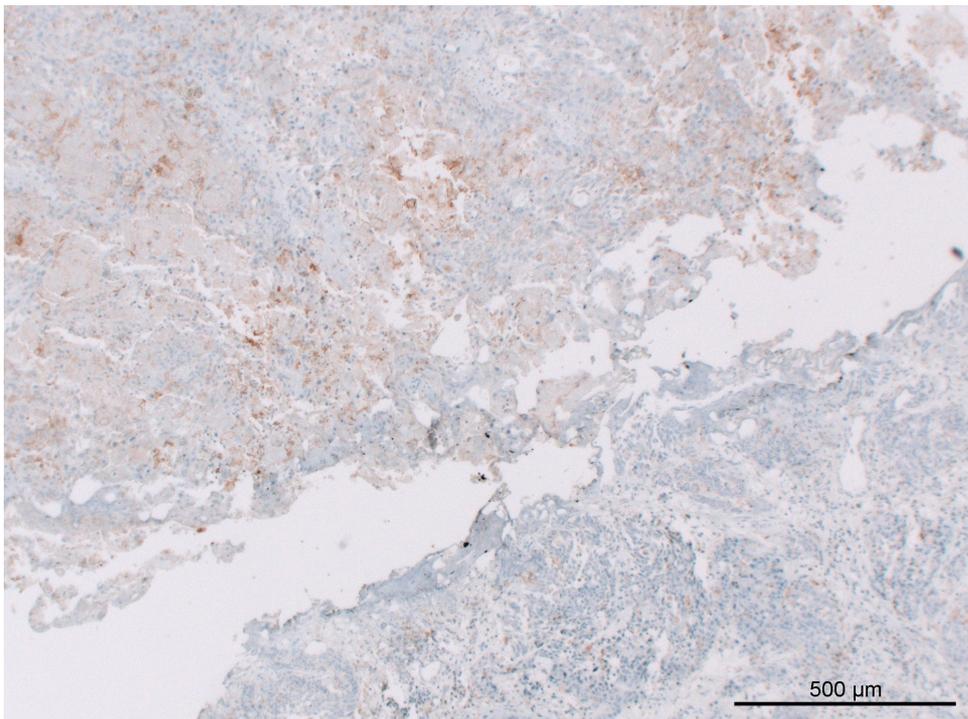


HE, 50x

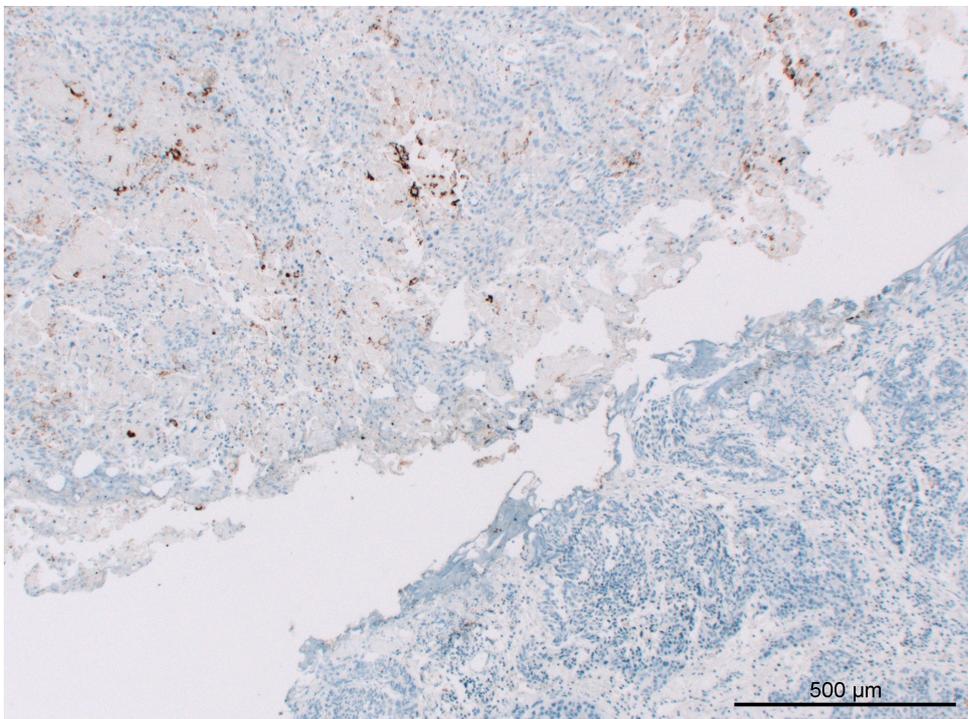


28-8 abcam, 50x (CPS 60; IC 30%)

Sonderfall: Plattenepithel-Ca mit urothelialeem Anteil, männlich, 75 Jahre



22C3 dako, 50x (CPS 20; IC 10%)

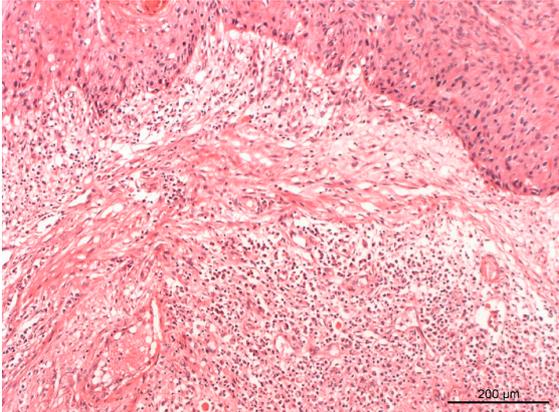


SP142 Ventana, 50x (CPS 15; IC 20%)

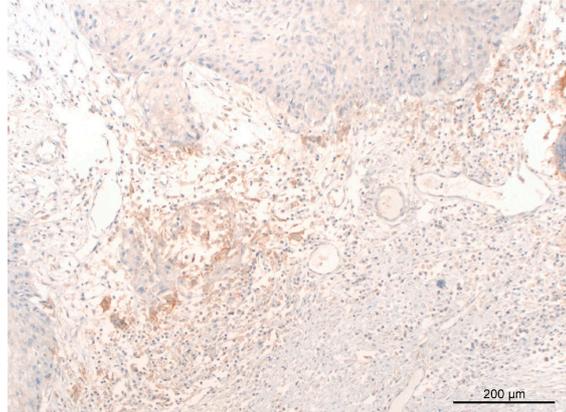
3.2.4 Beispielfälle mit nicht-reaktiven Immuninfiltraten

In einigen Fällen des Sonderformen-Kollektivs war HE-morphologisch ein dichtes gemischtzelliges Immuninfiltrat auffallend. Wider Erwarten zeigten diese Immunzellen aber in den immunhistochemischen Färbungen keine Positivität für PD-L1 (einheitlich negatives Ergebnis zwischen den Antikörpern). Die Diskrepanz dieser Beobachtungen soll im Folgenden demonstriert werden. Dazu werden drei Fälle als Beispiel bildhaft dargestellt: ein plattenepithelial differenziertes Urachus-Karzinom sowie zwei Karzinome mit plasmazytoider Differenzierung. Es sei auch hier darauf hingewiesen, dass die Bildausschnitte der Veranschaulichung dienen und repräsentativ für die Gesamtheit des Tumors zu verstehen sind.

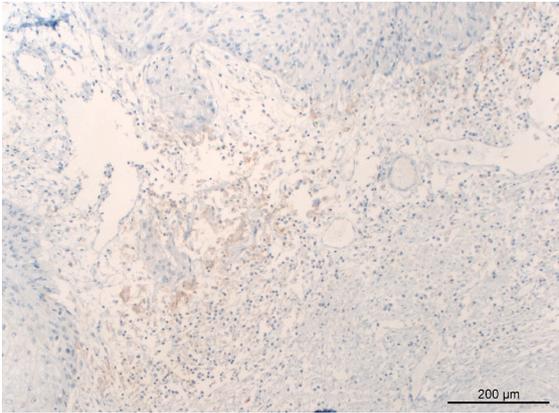
Plattenepithelial differenziertes Urachus-Karzinom, männlich, 61 Jahre



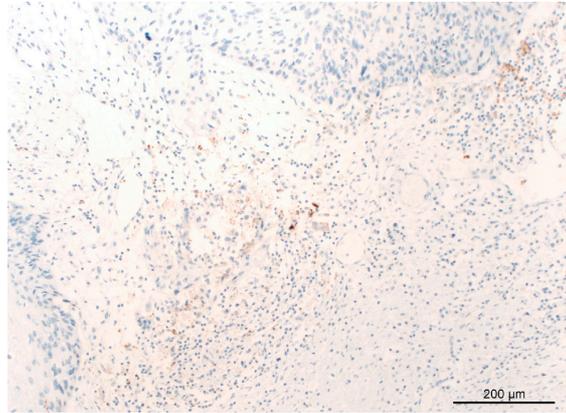
HE, 100x



28-8 abcam, 100x (CPS 2; IC 2%)

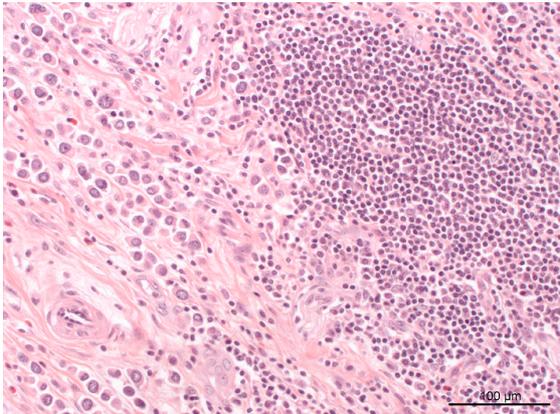


22C3 dako, 100 (CPS 1; IC 1%)

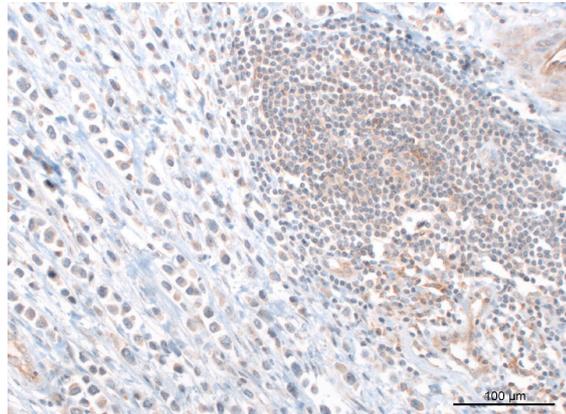


SP142 Ventana, 100 (CPS 1; IC 1%)

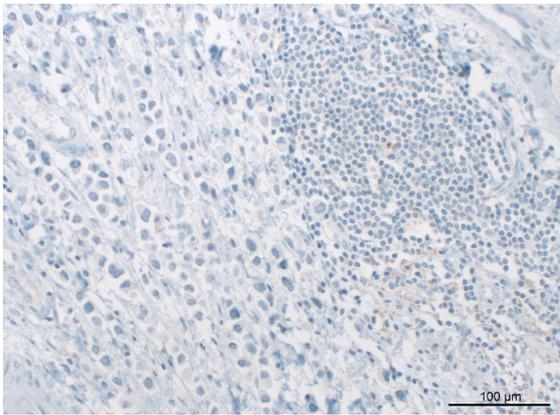
Plasmozytoides Karzinom (1), männlich, 64 Jahre



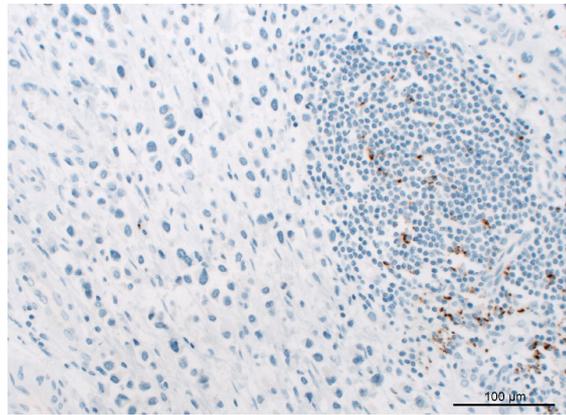
HE, 200x



28-8 abcam, 200x (CPS 9; IC 4%)

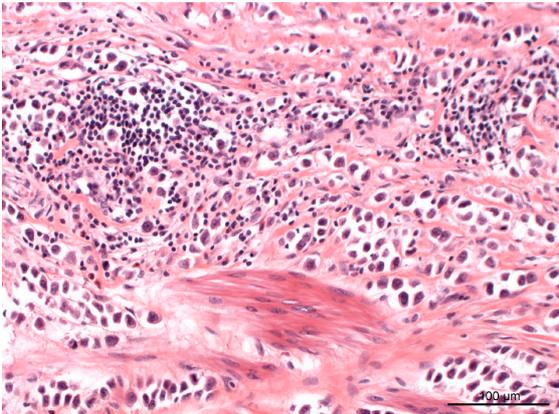


22C3 dako, 200x (CPS 3; IC 3%)

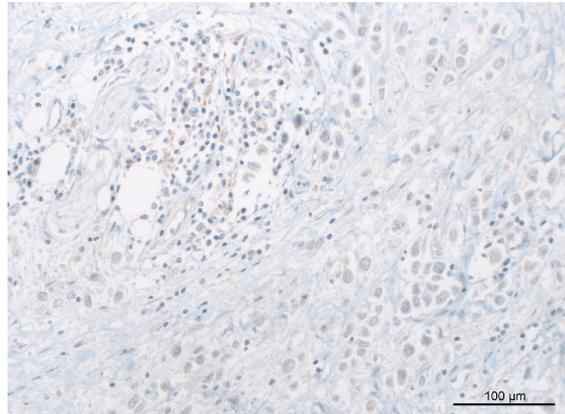


SP142 Ventana, 200x (CPS 0; IC 2%)

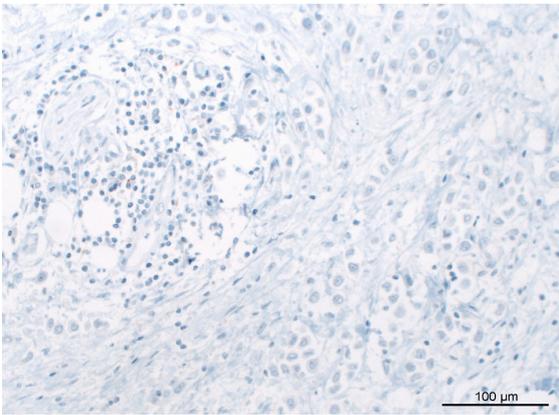
Plasmozytoides Karzinom (2), männlich, 56 Jahre



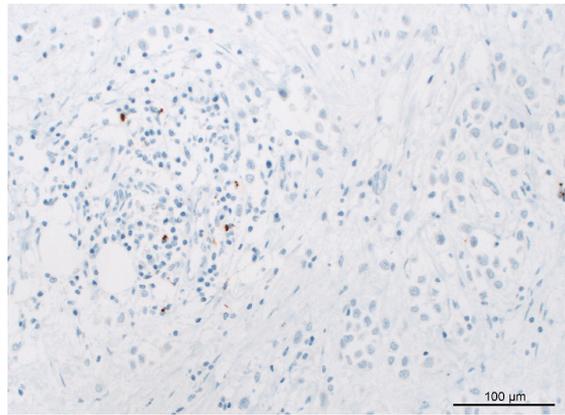
HE, 200x



28-8 abcam, 200x (CPS 0; IC 0%)



22C3 dako, 200x (CPS 0; IC 0%)



SP142 Ventana, 200x (CPS 0; IC 2%)

4 Diskussion

4.1 Studienziel: PD-L1-Expression in Sonderformen von Blasenkrebs im Vergleich mit herkömmlichen Urothelkarzinomen

Die hier vorgelegte Studie hatte zum Ziel, die PD-L1-Expression sowohl in einem Kollektiv von verschiedenen Sonderformen von Blasenkarzinomen sowie in einem Vergleichskollektiv mit herkömmlichen Urothelkarzinomen zu ermitteln. Dafür wurde das Tumormaterial unter Verwendung dreier verschiedener PD-(L)1-spezifischer Antikörper (28-8, 22C3, SP142) immunhistochemisch gefärbt und anschließend hinsichtlich zweier verschiedener Auswertelgorithmen (Combined positivity score und Immunecell score) ausgewertet. Ein Fall wurde dann als positiv gewertet, wenn er in mindestens einem Antikörper und mindestens einem Scoringssystem den Cut-off-Wert überschritten hatte.

4.2 Performance der eingesetzten Antikörper

Für die PD-L1-Immunhistochemie ist eine Reihe monoklonaler Antikörper verfügbar. Wie in der Einleitung ausgeführt ist die Auswahl des Primärantikörpers von außerordentlicher Wichtigkeit, um ein klinisch valides Färberesultat mit hoher Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Aufgrund der Tatsache, dass die Scoring-Werte auf der Grundlage erhoben werden, welcher relative Anteil der Tumor- beziehungsweise Immunzellen gefärbt wurde, ist vor allem die Sensitivität mit der diese Zellen vom Antikörper angefärbt werden von besonderer Relevanz (Schildhaus 2018).

Innerhalb des Sonderformenkollektivs konnten wir abgesehen von drei Fällen (7%) keine diskordanten Ergebnisse zwischen den drei unterschiedlichen verwendeten Antikörpern feststellen. Bei den drei Fällen, bei denen die Antikörper sich in ihrem Auswertungsergebnis unterschieden, wurden Score-Werte erreicht, die den klinischen Cut-Off von $CPS \geq 10$ und $IC \geq 5\%$ nur grenzwertig über- bzw. unterschritten. Dies lässt generell auf einen undeutlichen Nachweis einer PD-L1-Expression in diesen Fällen schließen und weniger auf einen tatsächlichen Unterschied der Performance der Antikörper, zumal in der Literatur auch von einem Diskordanzen in bis zu 12% der Fälle berichtet wird (Hodgson, Slodkowska, et al. 2018).

In den Studien, die zur Zulassung der Checkpointinhibitoren für das Urothelkarzinom durch die FDA führten, wurden eine Vielzahl verschiedener Antikörper mit unterschiedlichen Auswertesystemen verwendet (Rosenberg et al. 2016; Sharma et al. 2017; Balar, Castellano, et al. 2017; Balar, Galsky, et al. 2017; Bellmunt et al. 2017; Massard et al. 2016; Apolo et al. 2017). An dieser Stelle sei erneut betont, dass der Einsatz eines bestimmten Medikaments jedoch nicht an die Durchführung der immunhistochemischen PD-L1-Diagnostik mit einem entsprechenden Antikörper gebunden ist (Schildhaus 2018). Vor dem Hintergrund dieser Wahlfreiheit haben wir uns in unserer Studie für drei Antikörper entschieden, welche bereits in der histopathologischen Routine etabliert und daher von großer praktischer Relevanz sind.

Dass zwischen einigen der verfügbaren PD-L1-Antikörpern eine grundsätzliche Vergleichbarkeit besteht, wurde in mehreren Studien bereits dargestellt (Scheel et al. 2018; Scheel et al. 2016). Zudem ginge aus Ergebnissen von Ringversuchsorganisationen hervor, dass auch bei den neueren Antikörpern von vergleichbarer Leistung ausgegangen werden könne (Schildhaus 2018). In unserer Studie zeigte sich eine starke Ähnlichkeit der Ergebnisse im Vergleich der Antikörper, wie es bereits für das Urothelkarzinom (Tretiakova et al. 2018; Hodgson, Slodkowska, et al. 2018) als auch für andere Krankheitsentitäten wie das Lungenkarzinom (Hirsch et al. 2017) oder das maligne Melanom (Sunshine et al. 2017) beschrieben ist.

Die verwendeten Antikörper unterscheiden sich grundlegend in ihrem Design. Der Antikörper SP142 (Ventana), mit dem die Zulassungsstudie für Atezolizumab durchgeführt wurde, wurde in ebendieser Studie unter Zuhilfenahme des IC-Scorings ausgewertet. Der Antikörper sei für das Anfärben des Immuninfiltrats besser geeignet (Schildhaus 2018), in einem Assay von Vennapusa et al. konnten eine verlässliche Färbung von Tumor- als auch Immunzellen für den SP142 Antikörper verzeichnet werden (Vennapusa et al. 2019). Es stellt sich jedoch die Frage nach der Aussagekraft des von uns angewendeten CPS-Scores bei dem Antikörper SP142. In unseren Kollektiven zeigten sich bis auf wenige Ausnahmen hinsichtlich des CPS-Scores vergleichbare Ergebnisse unter allen drei Antikörpern (28-8, 22C3 und SP142).

Andere Autoren beschrieben das Färbeverhalten von SP142 in der Vergangenheit als weniger vergleichbar, unter Verwendung dieses Klon wurde eine niedrigere Anzahl positiver Tumorzellen gefärbt (Tretiakova et al. 2018; Hirsch et al. 2017). Reis et al. sprachen von einer „grobgranulär klumpigen“ Färbung, eine Erfahrung, die wir nach der Auswertung aller Schnitte teilen. Es sei darauf hingewiesen, dass vornehmlich die grenzwertigen diskordanten Befunde im SP142-Antikörper negativ ausfielen.

Schildhaus et al. führen besonders eine zu schwache membranständige Färbung als problematisch an, da dies zu falsch-negativen Ergebnissen führen könne. Auf der anderen Seite wurde vor allem beim Klon 28-8 (abcam) eine verstärkte Hintergrundfärbung bemerkbar, die die Auswertung und das Scoring dieser Schnitte erschwerte. Ganz im Gegensatz zum oben beschriebenen Klon SP142 zeigten sich bei den grenzwertig positiven Fällen vor allem im Klon 28-8 positive Ergebnisse.

Bei verschiedenen Tumorarten wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und dem malignen Melanom wurde gezeigt, dass die PD-L1-Färbung einer Heterogenität innerhalb des Tumorgewebes unterliegt (Madore et al. 2015; Casadevall et al. 2017; Ilie et al. 2016). Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob es einen diagnostisch relevanten Unterschied in der PD-L1-Expression abhängig vom verwendeten Ausgangsgewebe gibt (Biopsie oder komplette chirurgische Resektion des Primärtumors/Metastasen).

Vor diesem Hintergrund wurde beim Erstellen des Kollektivs bereits darauf geachtet, bevorzugt Zystektomiepräparate der Blasenkrebssonderformen auszuwählen. Ferner bezieht sich das erzielte Score-Ergebnis stets auf die Gesamtheit des gefärbten Tumorgewebes und stellt daher einen repräsentativen Wert des Anteils der tatsächlich PD-L1-reagiblen Tumor- und Immunzellen dar. In einer der klinischen Studien zur intratumoralen Heterogenität der PD-L1-Färbung beim NSCLC wurde außerdem gezeigt, dass nur in der Minderheit der Fälle (10%) dieser Unterschied in der PD-L1-Expression tatsächlich in einem klinisch bedeutsamen Maß auftritt (Munari et al. 2018). Es ist also davon auszugehen, dass in unseren Kollektiven die

intratumorale Heterogenität der PD-L1-Färbung kein Störfaktor hinsichtlich des erzielten Score-Werts darstellt.

In Zusammenschau der diskutierten Faktoren kann in unserer Studie eine zufriedenstellende Performance der eingesetzten monoklonalen Antikörper angenommen werden. Die geringfügigen Unterschiede, die verzeichnet werden konnten, sind vorwiegend auf die Konzeption der Antikörper sowie deren charakteristischen Färbeeigenschaften zurückzuführen.

4.3 Immunhistochemische Expression von PD-L1 bei Sonderformen von Blasenkrebs im Vergleich zu herkömmlichen Urothelkarzinomen

In unserer Studie zeigte sich eine insgesamt höhere Positivitätsrate in der Kohorte der Blasenkrebs-Sonderformen als im Vergleichskollektiv mit herkömmlichen Urothelkarzinomen (44,2% versus 35,7%). Besonders hervorzuheben ist dabei die hohe Zahl positiv gewerteter Plattenepithelkarzinome: neun von vierzehn Fällen waren positiv, das entspricht einem Anteil von 64% der Fälle. Außerdem fielen je drei der sechs Fälle (50%) der plasmazytoid und sarkomatoid differenzierten Karzinome positiv aus.

In einer Studie von Reis et al. zum Thema der PD-L1-Expression bei Sonderformen des Blasenkrebses wurden ähnliche Ergebnisse publiziert. Die Autoren verglichen ebenso drei verschiedene Antikörper, es handelte sich dabei um die Klone 22C3, SP263 und SP142. Obwohl zum Teil andere Antikörper verwendet wurden und das Scoring-System von dem unseren abwich, wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt: Bei einer Gesamtpositivrate von 37-54% je nach Antikörper wurde vor allem für das Plattenepithelkarzinom die höchste Anzahl positiver Fälle verzeichnet (Reis et al. 2019). Der hohe Anteil PD-L1-reagibler Plattenepithelkarzinome in unserem Kollektiv ist auch vereinbar mit den Ergebnissen einer weiteren Studie von Owyong et al. Insgesamt wurde von den Autoren eine Kohorte von 151 Patienten mit rein plattenepithelial differenzierten Harnblasenkarzinomen auf die Expression von PD-L1 untersucht, von denen 66,9% positiv ausfielen (Owyong et al. 2019).

Die Ergebnisse, die im Vergleichskollektiv erzielt wurden, sind vereinbar mit der existierenden Literatur: In einer Studie von 2018 wurden 197 Urothelkarzinome

mit verschiedenen Antikörpern auf die PD-L1-Expression getestet, 14% davon waren positiv und 12% uneinheitlich je nach verwendetem Antikörper (Hodgson, Slodkowska, et al. 2018). In diversen anderen Studien lag der Anteil der PD-L1-positiven klassischen Urothelkarzinome zwischen 4-30% (Faraj et al. 2015; Pichler et al. 2017; Tretiakova et al. 2018; Wankowicz et al. 2017; Inman et al. 2007; Erlmeier et al. 2016; Bellmunt et al. 2015; Mukherji et al. 2016; Mullane et al. 2016; Baras et al. 2016) Es ist also zu erwarten, dass – wie in unserer Studie – in etwa einem Drittel der Fälle der immunhistochemische Nachweis einer PD-L1 Expression in klinisch relevantem Ausmaß bei herkömmlichen Urothelkarzinomen gelingt.

Die beiden Patientenkollektive der hier vorgelegten Studie unterscheiden sich bezüglich mehrerer Gesichtspunkte. Bei der Sonderformenkohorte war der Anteil weiblicher Patientinnen höher, außerdem waren in diesem Kollektiv mehr Fälle mit fortgeschrittenem Tumorstadium (T3/T4) enthalten. Darüber hinaus besteht das Sonderformenkollektiv vorwiegend aus Zystektomie-Präparaten, während beim Vergleichskollektiv der Anteil durch TURB gewonnenen Materials überwiegt. Eine Erklärung dieses Sachverhalts liegt darin, dass für fortgeschrittene Tumorstadien (>pT2) die radikale Zystektomie als Standardtherapie gilt (S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom 2016), weniger fortgeschrittene Tumorerkrankungen können hingegen oft durch die minder invasive TURB operativ behandelt werden. Da das verwendete Ausgangsmaterial keinen Störfaktor für eine fälschlicherweise höhere PD-L1-Expressions-Rate darstellt (Bellmunt, Powles, and Vogelzang 2017) sind die Patientenkollektive dahingehend als vergleichbar zu betrachten.

4.4 Interpretation der Ergebnisse in Bezugnahme auf bisherigen klinischen Einsatz von Checkpointinhibitoren

Für Patienten, die an Blasenkrebs mit einer histomorphologischen Sonderform erkrankt sind, besteht die Therapieoption mit Checkpointinhibitoren bislang nicht. Wie bereits einleitend ausgeführt ist die gute Wirksamkeit und Verträglichkeit dieser Medikamente für das herkömmliche Urothelkarzinom jedoch bereits gut erforscht.

In dem Kollektiv an Sonderformen, welches wir auf die Expression von PD-L1 getestet haben, zeigte sich eine höhere Positivitätsrate als im Vergleichskollektiv an herkömmlichen Urothelkarzinomen. Reis et al. berichten von vergleichbaren Ergebnissen. Da die Ansprechwahrscheinlichkeit der Therapie mit Immuncheckpointinhibitoren mit der Expression von PD-L1 des Tumorgewebes assoziiert ist (Powles et al. 2014), weist die erhöhte Expression dieses Proteins bei Fällen von Blasenkrebs-Sonderformen darauf hin, dass davon betroffene Patienten von diesen Medikamenten profitieren könnten.

In der 2018 veröffentlichten klinischen Studie PURE-01 (Necchi et al. 2018) wurde Patienten mit muskelinvasivem Blasenkrebs Pembrolizumab als neoadjuvante Therapie vor Zystektomie verabreicht. Es wurde dabei unter anderem der PD-L1-Status unter Verwendung des CPS erhoben. In einem Update der Studienergebnisse berichteten die Autoren, dass in 34 (30%) der Fälle eine histomorphologische Variante vorlag, welche bei 19 (17%) Patienten prädominant war. Die häufigste Sonderform war ebenso wie in der hier vorgelegten Studie mit 19 Fällen das Plattenepithelkarzinom, 7 davon mit prädominanter plattenepithelialer Differenzierung. Innerhalb der heterogenen Gruppe der Sonderformen lag der Anteil der Fälle, die den primären Endpunkt ($pT0/pT\leq 1$) erreichten, niedriger als bei Betrachtung des Gesamtkollektivs mit vorwiegend herkömmlichen Urothelkarzinomen (16%/42% versus 42%/54%). Auffallend war jedoch, dass 86% der plattenepithelial differenzierten Karzinome eine $pT\leq 1$ Response erreichten und bei dieser histomorphologischen Variante vergleichsweise erhöhte CPS-Werte verzeichnet wurden (Necchi et al. 2020). Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studie wird deutlich, dass in der klinischen Anwendung des Checkpointinhibitors Pembrolizumab bei Sonderformen von Blasenkrebs ein signifikanter Rückgang der Krankheit zu verzeichnen war, insbesondere die erfolgreichen Ergebnisse beim Plattenepithel-Karzinom der Blase waren herausragend. Es ist folglich davon auszugehen, dass auch die Patienten mit Tumoren mit plattenepithelialer Differenzierung in unserem Kollektiv von dieser Therapie profitieren würden, zumal in dieser Kohorte eine PD-L1-Expression mit $CPS\geq 10$ vermehrt ermittelt wurde. Die Autoren Necchi et al. sprechen sich für die Erweiterung der

Inklusionskriterien für neoadjuvante Immuntherapie bei zukünftigen Studien zum muskelinvasiven Blasenkrebs aus.

Bei den übrigen in dieser klinischen Studie von Necchi et al. enthaltenen Tumoren mit divergenter Differenzierung zeigte sich keine PD-L1-Sensibilität, mit Ausnahme des lymphoepithelioma-like Karzinoms. 67% der LEL-Karzinome erreichten einen pT0-Status, auch hier konnte ein erhöhter CPS verzeichnet werden (Necchi et al. 2020). Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung ist in unserem Kollektiv kein LEL-Karzinom enthalten. In unserer Sonderformenkohorte waren dahingegen mit je 50% der sarkomatoiden und plasmazytoiden Karzinome immunhistochemisch für PD-L1 reagibel.

In diesem Zusammenhang sei auch auf zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Dissertationsschrift laufende klinische Studien zur Anwendung von Kombinationstherapien bei Blasenkrebs mit Sonderform bei fortgeschrittenem Krankheitsstadium verwiesen: Die Kombination von Durvalumab und Tremelimumab (NCT03430895), von Duvalumab und Cabozantinib (ARCADIA, NCT03824691) und von Nivolumab mit Ipilimumab und Cabozantinib (ALLIANCE A031702 ICONIC, NCT03866382). Dies verdeutlicht einerseits die Dringlichkeit, mit der nach Behandlungsoptionen für diese Krebsart gesucht wird, andererseits welcher Dynamik dieses Forschungsgebiet unterliegt. Daraus ist abzuleiten, welche Relevanz die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie auch auf der Ebene der klinischen Anwendung haben.

Neben der einleitend beschriebenen morphologischen Gliederung lassen sich Blasenkarzinome auch molekular einteilen. Bei dieser molekularen Einteilung unterscheidet man den luminalen vom basalen Typ. Die Unterscheidung erfolgt immunhistochemisch: Während der luminalen Typ typischerweise Cytokeratin 20 und Gata 3 exprimiert, ist der basale Typ negativ für Gata 3, hingegen positiv für Cytokeratin 5/6 oder Cytokeratin 5/14, also für Basalzellkeratine.

In einer Publikation wurde ermittelt, dass der basale Subtyp etwa 15% der Blasentumoren ausmacht und im Vergleich zum luminalen Typ deutlich mehr PD-L1-positive Zellen aufweist (Hodgson, Liu, et al. 2018). In ihrer Studie

konnten Hodgson et al einen Trend für das Auftreten von divergenten Differenzierungen unter den Tumoren mit basaler Subtypisierung feststellen, welcher jedoch nicht das Signifikanzlevel erreichte. Unter den erfassten Tumoren mit varianter Histomorphologie befanden sich plattenepitheliale, glanduläre, trophoblastische, klarzellige, sarkomatoide, plasmazytoide, rhabdoide, mikropapilläre und myxoide Karzinome sowie Karzinome vom nested Typ. Die erhöhte Expression von PD-L1 unter den Tumoren vom basalen Subtyp und die Tendenz eines erhöhten Anteils von Blasenkarzinomen mit spezieller histomorphologischer Differenzierung in dieser Studie deckt sich mit den von uns sowie von Reis et al erzielten Ergebnissen der höheren Positivitätsrate im Subtypenkollektiv. Zusätzlich ergab eine Studie von Robertson et al. für den basalen molekularen Subtyp eine erhöhte Positivität für plattenepitheliale Differenzierungsmarker (Robertson et al. 2017). Es legt die Überlegung nahe, das Subtypenkollektiv analog zur Studie von Hodgson et al molekular in den luminalen und basalen Subtyp zu gliedern und mit der PD-L1-Expression sowie der morphologischen Diagnose abzugleichen. Offen bleibt jedoch, inwiefern die bessere Reagibilität für PD-L1 des basalen molekularen Subtyps hinsichtlich des Therapieerfolgs mit Checkpointinhibitoren klinisch relevant ist.

Bei anderen Lokalisationen von Plattenepithelkarzinomen werden Checkpointinhibitoren bereits eingesetzt oder die Anwendung ist Gegenstand der aktuellen Forschung. So besteht die Möglichkeit der Behandlung von plattenepithelialen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich mit Checkpointinhibitoren, was in einem verbesserten Überleben dieser Patienten resultiert (Przybylski et al. 2018; Kao and Lou 2019). Im Falle des plattenepithelialen Zervix-Karzinoms (Minion and Tewari 2018) sowie beim kutanen Plattenepithel-Karzinom (Migden et al. 2018) wird deren Ansprechen auf PD-L1-Blocker untersucht. Auch im Falle des PLECA im Ösophagus gibt es vielversprechende Resultate klinischer Studien (Jiao et al. 2019) und Immuncheckpointinhibitoren werden als Schlüsselement der zukünftigen Therapie bei dieser Krankheitsentität diskutiert (Mimura et al. 2018). Diese Erkenntnisse erhärten die Annahme, dass

auch die Anwendung von Checkpointinhibitoren bei plattenepithelial differenzierten Blasen Tumoren erfolgreich sein könnte.

4.5 Alternativen zur Immunhistochemie

Generell ist in Anbetracht des biologischen Wirkmechanismus der PD-L1-spezifischen Checkpointinhibitoren verschiedene Marker zur Voraussage eines Therapieerfolgs möglich. Im Moment ist die – wie in unserer Studie durchgeführte – immunhistochemische Bestimmung des Vorliegen und des Ausmaßes der PD-L1-Expression des Tumorgewebes die am weitesten verbreitete Methode (Schildhaus 2018). Es konnte für das Urothelkarzinom unabhängig von der therapeutischen Relevanz und Konsequenz gezeigt werden, dass die PD-L1-Expression ein prognostischer Parameter für das krankheitsfreie und das Gesamtüberleben darstellt und in einem schlechteren klinischen Outcome der Patienten resultiert (Faraj et al. 2015; Wahlin et al. 2019; Wang et al. 2019).

Nur bei etwa 20-25% der behandelten Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Blasenkrebs ist ein Ansprechen auf die ICB-Therapie zu erwarten (Gopalakrishnan et al. 2018). Es ist also bedeutsam, Biomarker zu etablieren, die mit möglichst hoher Präzision voraussagen, welche Patienten am ehesten von den immunonkologischen Medikamenten profitieren (Aggen and Drake 2017).

4.5.1 Tumor mutational burden als molekulares Gegenstück zur IHC

Als besonders vielversprechend im Hinblick auf die Etablierung als PD-L1-Biomarker wird die tumorale Mutationslast (TMB = tumor mutational burden) diskutiert. Das Prinzip der Bestimmung der TMB ist es, die Gesamtzahl der somatischen und kodierenden Mutationen, die im untersuchten Tumorgenom vorliegen, zu ermitteln (Chalmers et al. 2017). Dies ist insbesondere bezüglich der Immuntherapie relevant, da man davon ausgeht, dass Tumoren mit einer höheren Mutationslast eher Neoantigene exprimieren, die anschließend vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt werden können (Gubin et al. 2015). Tumoren, die durch den Einfluss chemischer Noxen entstanden sind,

weisen generell eine besonders hohe Mutationslast auf (Alexandrov et al. 2013), dies trifft auch im Fall des Urothelkarzinoms zu.

Dieser Grundlage entsprechend konnte in einigen der bereits angeführten Studien eine erhöhte TMB mit der Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens auf die Anti-PD-L1-Immuntherapie korreliert werden (Rosenberg et al. 2016; Bellmunt et al. 2017; Necchi et al. 2018). Interessanterweise wurde in einer der klinischen Studien im Rahmen der Zulassung zu Atezolizumab eine signifikante Assoziation der Ansprechrate und des Gesamtüberlebens mit der TMB gezeigt (Balar, Galsky, et al. 2017). In Beziehung zu der von uns durchgeführten Studie zu Blasenkrebs-Sonderformen ist außerdem von Relevanz, dass in der klinischen Studie von Necchi et al. zu neoadjuvant eingesetztem Pembrolizumab sich auch für die Sonderformen dieser Umstand bestätigte: Neben dem CPS konnte eine erhöhte TMB als signifikante Variable in Assoziation mit dem Therapieansprechen festgestellt werden (Necchi et al. 2020). Zudem konnte für die speziellen Blasenkrebsformen des plasmazytoiden (Al-Ahmadie et al. 2016) und des kleinzelligen Karzinoms (Chang et al. 2018) deren erhöhte TMB im Vergleich zum konventionellen Urothelkarzinom gezeigt werden. Für unsere Studie bedeutet das, dass auch in dem hier vorgestellten Sonderformenkollektiv gemäß den genannten Studien zu speziellen Typen von Blasenkrebs mit einer erhöhten TMB gerechnet werden kann, was für die Patienten in einem besseren Ansprechen auf die Immuntherapie resultiert.

4.5.2 Tumor-infiltrierende Lymphozyten/Microenvironment

Nicht nur die Interaktion zwischen Tumorzellen und zytotoxischen T-Zellen wird durch das PD-L1-System reguliert, sondern auch die den Tumor infiltrierenden Immunzellen untereinander kommunizieren mittels dieses Signalwegs (Schildhaus 2018). Es ist also eine naheliegende Konsequenz, dass die PD-L1-Expression auf TIC (tumor infiltrating immune cells = Tumordinfiltrierende Immunzellen) mit der Therapie-Effizienz assoziiert werden konnte (Powles et al. 2014).

Darüber hinaus sind für die PD-L1-Interpretation intratumorale Lymphozyten insofern von erheblicher Relevanz, da beide von uns verwendeten Scores (CPS

und IC) die Immunzellen mit einbeziehen und daher das Auswertergebnis auch von deren Reagibilität abhängt. Im Falle des herkömmlichen Urothelkarzinoms haben mehrere Publikationen das Verhältnis von Lymphozytendichte (LD) und PD-L1-Expression und deren Effekt auf den klinischen Verlauf zum Gegenstand (Faraj et al. 2015; Wahlin et al. 2019; Wang et al. 2019), während die Datenlage zu Sonderformen von Blasenkrebs und Immunphänotypen zum jetzigen Zeitpunkt noch dünn ist (Hodgson, Liu, et al. 2018; Li et al. 2020; Guo et al. 2019). Insbesondere die prognostische Rolle von CD103 als spezifischer Marker intraepithelialer Lymphozyten wurde für diverse Tumorarten untersucht (Bosmuller et al. 2016), so zeigt auch beim Urothelkarzinom die Infiltration von CD103-positiven Lymphozyten eine günstige Prognose an (Wang et al. 2015). Im Rahmen der Auswertung der Fälle unserer Kollektivs konnten interessante Beobachtungen zum Auftreten und Färbeverhalten der intratumoralen Immunzellen gemacht werden. Während in einigen der Tumoren in der HE-Färbung an der Invasionsfront eine erhebliche Lymphozytendichte beobachtet werden konnte, zeigte sich diese bei der späteren PD-L1-Färbung wider Erwarten negativ. Einige Beispielfotos solcher Fälle finden sich im Ergebnisteil dieser Dissertation. Dies wirft die Frage auf, ob ein erweitertes Markerprofil zusätzlich zu PD-L1 für die Darstellung der Interaktion zwischen Tumorzellen und Immunzellen im unmittelbaren Tumorgebiet geeigneter ist.

Das individuelle Therapieansprechen hängt demnach von komplexen Immunaktivitäts-Faktoren ab und ist derzeit noch Gegenstand der Forschung. In diesem Zusammenhang wurden jüngst die Verwendung von Immunogrammen zur Ermittlung des Outcomes der PD-L1-Therapie untersucht (van Dijk et al. 2019; Karasaki et al. 2017). Bei dieser Erhebung des Immunstatus werden sowohl die numerischen Verhältnisse als auch der Aktivierungszustand der im Blut befindlichen Immunzellen abgebildet (IMD Institut für Medizinische Diagnostik 2020). Trotz der vielversprechenden Daten bedarf die klinische Durchführbarkeit dieser Methode jedoch noch weiterer Testungen (Song et al. 2019).

4.5.3 Morphologischer Phänotyp

Für das Urothelkarzinom konnte in einem im Jahr 2020 veröffentlichten Fallbericht bei einem Fall eines metastasierten Blasentumors ein komplettes Ansprechen auf die Anti-PD-L1-Therapie mit Atezolizumab erreicht werden (Yang et al. 2020). Noch interessanter sind diese Ergebnisse aufgrund der vorliegenden histomorphologischen Klassifizierung des Tumors als klassisches Urothel-Karzinom mit plattenepithelialer (15%) und plasmazytoider (5%) Teildifferenzierung. Während die PD-L1-Expression im Primärtumor als niedrig-positiv beschrieben wurde, verzeichnete die Autoren vor allem bei der plattenepithelialen Tumorkomponente erhöhte Positivität für PD-L1. Auch die Werte für TIL waren in diesem Teil des Tumors vergleichsweise angehoben. Dieser im Bericht beschriebene Fall ähnelt stark dem in unserem Kollektiv enthaltenen und im Ergebnisteil bildlich dargestellten Sonderfall von synchroner urothelialer und plattenepithelialer Mischdifferenzierung (siehe S. 36-37), auch hier wurde für die squamöse Komponente eine erhöhte PD-L1-Expression ermittelt. Es scheint eine von der Histomorphologie abhängige Heterogenität des Tumor-Mikroenvironments vorzuliegen (Yang et al. 2020). Daher ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei dieser Tumorart der plattenepithelialen Blasenkarzinome um einen ‚hot immuno-phenotype‘ vermutlich verbunden mit gutem Ansprechen auf die PD-L1-Therapeutika handelt.

4.6 Limitationen der Studie

Das Sonderformenkollektiv umfasste nur eine geringe Fallzahl von 43 sehr heterogenen Fällen. Dies ist einerseits der Seltenheit der Erkrankung geschuldet, andererseits auf die Qualitätsstandards zurückzuführen, welche wir bei der Auswahl des Tumormaterials gestellt haben. Es wurde hierbei auf das Vorhandensein von ausreichend intaktem Tumorgewebe mit wenig Nekrose oder Hitzeläsionen geachtet, um ein möglichst störfreies und repräsentatives Ergebnis zu erzielen.

Bei der vorgelegten Studie handelt es sich um eine Querschnittsstudie, es wurde also eine einmalige Messung der PD-L1-Expression bei jedem Fall der

beiden definierten Kollektive vorgenommen. Man weiß heute aber, dass die Variabilität dieser Expression im zeitlichen Verlauf und unter bestimmten Therapien der Tumorerkrankung zunimmt (Zhang et al. 2008; Deng et al. 2014; Munari et al. 2018). So zeigte sich zum Beispiel eine Zunahme der PD-L1-Expression im Anschluss an eine Immuntherapie mittels BCG-Instillation der Blase, was zudem mit einem schlechteren Outcome der Patienten assoziiert ist (Inman et al. 2007; Hashizume et al. 2018). Bei den Ergebnissen, über die wir berichten, handelt es sich also um eine punktuelle Information innerhalb eines weit komplexeren und mitunter langwierigen Krankheitsgeschehens. Vor diesem Hintergrund haben wir uns dafür entschieden, bereits mit Immun- oder Radiotherapie vorbehandelte Patienten nicht in unsere Studienkollektive zu integrieren.

Aufgrund des retrospektiven Studiensettings wurde in Paraffin eingebettetes archiviertes Tumorgewebe verschiedenen Probenalters verwendet. Damit assoziierte potentielle Fehlerquellen im Rahmen der Epitopdemaskierung für die Immunhistochemie werden durch sachgemäße Entparaffinierung minimiert. In klinischen Therapiestudien zum nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom konnte entsprechend gezeigt werden, dass Archivgewebe grundsätzlich für die immunhistochemische PD-L1-Diagnostik zur Therapieindikation geeignet ist (Borghaei et al. 2015; Garon et al. 2015).

Bei der Färbung selbst wurden die Schnitte für einen der Antikörper (SP142) auf einem anderen Gerät gefärbt als die der anderen beiden Antikörper. Da jedoch konsequent On-slide-Positivkontrollen mit Tonsillargewebe bei jedem Färbedurchlauf eingebracht wurden, kann von einem vergleichbaren Färbeergebnis der Antikörper untereinander ausgegangen werden. Die gewählte Methode der Immunhistochemie stellt in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper ein kostengünstiges, breit und zeitnah verfügbares und etabliertes diagnostisches Tool für den Nachweis einer PD-L1-Expression dar, was Voraussetzung für einen breiten Einsatz in der companion diagnostic ist.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorgelegten Studie zeigte sich für das Kollektiv an Blasenkrebs-Sonderformen eine vergleichsweise höhere Positivität der PD-L1-Expression als im Vergleichskollektiv mit klassischen Urothelkarzinomen. Die drei verschiedenen eingesetzten monoklonalen Antikörper färbten die Tumorgewebsschnitte mit hoher Konkordanz untereinander, nur kleine Unterschiede der Performance konnten erfasst werden. Die höchste Positivitätsrate wurde in der Kohorte der plattenepithelial differenzierten Karzinome verzeichnet. Aufgrund des retrospektiven Studiensettings und daher des Verzichts auf Einbeziehung klinisch-pathologischer Parameter sowie der limitierten Fallzahl ist die Aussagekraft der vorgestellten Studie geringfügig eingeschränkt.

In Übereinstimmung mit den zitierten Autoren sprechen wir uns in Anbetracht dieser Ergebnisse dafür aus, die Inklusionskriterien zu klinischen Studien zu Anti-PD-L1-Therapie für Sonderformen des Blasenkarzinoms auszuweiten (Reis et al. 2019; Necchi et al. 2020). Dies erscheint uns besonders für den histomorphologischen Typ des plattenepithelialen Karzinoms sowie den molekular als basal definierten Typ als sinnvolle Erwägung. Erste Ergebnisse einer klinischen Studie, in der Blasenkarzinome mit abweichender Histologie enthalten und von gutem Ansprechen auf die Therapie gekennzeichnet waren, unterstreichen diese Annahme (Necchi et al. 2020). Die weiterführenden Ergebnisse der erwähnten laufenden klinischen Studien auf diesem Gebiet gilt es noch abzuwarten. Für die von dieser seltenen und zugleich aggressiven Tumorerkrankung betroffenen Patienten, für welche es zum aktuellen Zeitpunkt wenig Behandlungsoptionen gibt, stellt die Aussicht auf eine mögliche Therapie mit den vergleichsweise gut verträglichen und nebenwirkungsarmen Immuncheckpoints einen enormen Hoffnungsträger dar.

Parallel dazu wird die Suche nach geeigneten Biomarkern zur Definition von passenden Patientenpopulationen für die Checkpointinhibitor-Therapie fortgesetzt, denn es wurden auch Fälle als PD-L1-sensitiv erfasst, welche immunhistochemisch negativ sind (Carbognin et al. 2015). Es wird die Meinung

vertreten, dass die Bestimmung der TMB den immunhistochemischen PD-L1-Nachweis langfristig ablösen wird (Schildhaus 2018). In Zukunft könnte diese Bestimmung also möglicherweise in die Diagnostik mit einbezogen werden (Necchi et al. 2020). Ähnlich verhält es sich mit den Erkenntnissen auf der immunologischen Ebene der Tumorerkrankung: Die Etablierung neuer Methoden wie beispielsweise Immunogrammen als zusätzliche prädiktive Biomarker für die Immuncheckpoint-Behandlung wäre auf diesem Gebiet ebenso denkbar.

Beim Urothelkarzinom und dessen Sonderformen handelt es sich auf Basis der genetischen und molekularen Entstehungsgrundlage um eine immunologisch beeinflusste Tumorerkrankung. Die anatomische Zugänglichkeit erlaubt zudem eine erleichterte Applikation sowie Monitoring bei der Implementierung neuer immunonkologischer Medikamente. Abgeleitet von Fortschritten auf der Ebene von Immuntherapien bleibt die klinische Vergleichbarkeit des Urothelkarzinomes mit anderen Tumorentitäten abzuwarten (Song et al. 2019).

Generell handelt es sich bei der Entwicklung von Immuncheckpoints um ein Forschungsgebiet mit erheblicher Dynamik welche zweifellos auch in der Zukunft kontinuierlich Neuerungen unterliegen wird.

6 Literaturverzeichnis

Bücher

- Grundmann, Ekkehard, Thomas Kirchner, Hans Konrad Müller-Hermelink, and Albert Roessner. 2018. *Kurzlehrbuch Pathologie* (Elsevier: München).
- Höfler, Gerald, Hans H. Kreipe, Holger Moch, and Abbas Agaimy. 2019. *Pathologie das Lehrbuch; mit 1.300 meist farbigen Abbildungen und 150 Tabellen* (Elsevier: München).
- Rübben, Herbert. 2014. "Uroonkologie." In *SpringerLink Bücher*, Online-Ressource (XXII, 883 S. 196 Abb., 28 Abb. in Farbe, online resource). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Weltgesundheitsorganisation Working Group on Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, Holger Moch, Peter A. Humphrey, Thomas M. Ulbright, Victor E. Reuter, and International Agency for Research on Cancer. 2016. *WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs* (International Agency for Research on Cancer: Lyon).
- Wittekind, Christian, International Union against Cancer, and Wiley-VCH. 2020. "TNM - Klassifikation maligner Tumoren herausgegeben von Christian Wittekind ; UICC Global Cancer Control." In, 1 Online-Ressource (XXI, 313 Seiten). Weinheim: Wiley-VCH.

Artikel

- Aggen, D. H., and C. G. Drake. 2017. 'Biomarkers for immunotherapy in bladder cancer: a moving target', *J Immunother Cancer*, 5: 94.
- Al-Ahmadie, H. A., G. Iyer, B. H. Lee, S. N. Scott, R. Mehra, A. Bagrodia, E. J. Jordan, S. P. Gao, R. Ramirez, E. K. Cha, N. B. Desai, E. C. Zabor, I. Ostrovnaya, A. Gopalan, Y. B. Chen, S. W. Fine, S. K. Tickoo, A. Gandhi, J. Hreiki, A. Viale, M. E. Arcila, G. Dalbagni, J. E. Rosenberg, B. H. Bochner, D. F. Bajorin, M. F. Berger, V. E. Reuter, B. S. Taylor, and D. B. Solit. 2016. 'Frequent somatic CDH1 loss-of-function mutations in plasmacytoid variant bladder cancer', *Nat Genet*, 48: 356-8.
- Alexandrov, L. B., S. Nik-Zainal, D. C. Wedge, S. A. Aparicio, S. Behjati, A. V. Biankin, G. R. Bignell, N. Bolli, A. Borg, A. L. Borresen-Dale, S. Boyault, B. Burkhardt, A. P. Butler, C. Caldas, H. R. Davies, C. Desmedt, R. Eils, J. E. Eyfjord, J. A. Foekens, M. Greaves, F. Hosoda, B. Hutter, T. Ilcic, S. Imbeaud, M. Imielinski, N. Jager, D. T. Jones, D. Jones, S. Knappskog, M. Kool, S. R. Lakhani, C. Lopez-Otin, S. Martin, N. C. Munshi, H. Nakamura, P. A. Northcott, M. Pajic, E. Papaemmanuil, A. Paradiso, J. V. Pearson, X. S. Puente, K. Raine, M. Ramakrishna, A. L. Richardson, J. Richter, P. Rosenstiel, M. Schlesner, T. N. Schumacher, P. N. Span, J. W. Teague, Y. Totoki, A. N. Tutt, R. Valdes-Mas, M. M. van Buuren, L. van 't Veer, A. Vincent-Salomon, N. Waddell, L. R. Yates, Initiative Australian Pancreatic Cancer Genome, IcgC Breast Cancer Consortium, IcgC Mmml- Seq Consortium, IcgC PedBrain, J. Zucman-Rossi, P. A. Futreal, U. McDermott, P. Lichter, M. Meyerson, S. M. Grimmond, R. Siebert, E. Campo, T. Shibata, S. M. Pfister, P. J.

- Campbell, and M. R. Stratton. 2013. 'Signatures of mutational processes in human cancer', *Nature*, 500: 415-21.
- Antoni, S., J. Ferlay, I. Soerjomataram, A. Znaor, A. Jemal, and F. Bray. 2017. 'Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends', *Eur Urol*, 71: 96-108.
- Apolo, A. B., J. R. Infante, A. Balmanoukian, M. R. Patel, D. Wang, K. Kelly, A. E. Mega, C. D. Britten, A. Ravaud, A. C. Mita, H. Safran, T. E. Stinchcombe, M. Srdanov, A. B. Gelb, M. Schlichting, K. Chin, and J. L. Gulley. 2017. 'Avelumab, an Anti-Programmed Death-Ligand 1 Antibody, In Patients With Refractory Metastatic Urothelial Carcinoma: Results From a Multicenter, Phase Ib Study', *J Clin Oncol*, 35: 2117-24.
- Balar, Arjun V., Daniel Castellano, Peter H. O'Donnell, Petros Grivas, Jacqueline Vuky, Thomas Powles, Elizabeth R. Plimack, Noah M. Hahn, Ronald de Wit, Lei Pang, Mary J. Savage, Rodolfo F. Perini, Stephen M. Keefe, Dean Bajorin, and Joaquim Bellmunt. 2017. 'First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study', *The Lancet Oncology*, 18: 1483-92.
- Balar, Arjun V., Matthew D. Galsky, Jonathan E. Rosenberg, Thomas Powles, Daniel P. Petrylak, Joaquim Bellmunt, Yohann Loriot, Andrea Necchi, Jean Hoffman-Censits, Jose Luis Perez-Gracia, Nancy A. Dawson, Michiel S. van der Heijden, Robert Dreicer, Sandy Srinivas, Margitta M. Retz, Richard W. Joseph, Alexandra Drakaki, Ulka N. Vaishampayan, Srikala S. Sridhar, David I. Quinn, Ignacio Durán, David R. Shaffer, Bernhard J. Eigel, Petros D. Grivas, Evan Y. Yu, Shi Li, Edward E. Kadel, Zachary Boyd, Richard Bourgon, Priti S. Hegde, Sanjeev Mariathasan, AnnChristine Thåström, Oyewale O. Abidoye, Gregg D. Fine, and Dean F. Bajorin. 2017. 'Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial', *The Lancet*, 389: 67-76.
- Baras, A. S., C. Drake, J. J. Liu, N. Gandhi, M. Kates, M. O. Hoque, A. Meeker, N. Hahn, J. M. Taube, M. P. Schoenberg, G. Netto, and T. J. Bivalacqua. 2016. 'The ratio of CD8 to Treg tumor-infiltrating lymphocytes is associated with response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in patients with muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder', *Oncoimmunology*, 5: e1134412.
- Bellmunt, J., R. de Wit, D. J. Vaughn, Y. Fradet, J. L. Lee, L. Fong, N. J. Vogelzang, M. A. Climent, D. P. Petrylak, T. K. Choueiri, A. Necchi, W. Gerritsen, H. Gurney, D. I. Quinn, S. Culine, C. N. Sternberg, Y. Mai, C. H. Poehlein, R. F. Perini, D. F. Bajorin, and Keynote- Investigators. 2017. 'Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma', *N Engl J Med*, 376: 1015-26.
- Bellmunt, J., S. A. Mullane, L. Werner, A. P. Fay, M. Callea, J. J. Leow, M. E. Taplin, T. K. Choueiri, F. S. Hodi, G. J. Freeman, and S. Signoretti. 2015. 'Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells

- and overall survival in patients with urothelial carcinoma', *Ann Oncol*, 26: 812-17.
- Bellmunt, J., T. Powles, and N. J. Vogelzang. 2017. 'A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now', *Cancer Treat Rev*, 54: 58-67.
- Borghaei, H., L. Paz-Ares, L. Horn, D. R. Spigel, M. Steins, N. E. Ready, L. Q. Chow, E. E. Vokes, E. Felip, E. Holgado, F. Barlesi, M. Kohlhaufl, O. Arrieta, M. A. Burgio, J. Fayette, H. Lena, E. Poddubskaya, D. E. Gerber, S. N. Gettinger, C. M. Rudin, N. Rizvi, L. Crino, G. R. Blumenschein, Jr., S. J. Antonia, C. Dorange, C. T. Harbison, F. Graf Finckenstein, and J. R. Brahmer. 2015. 'Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer', *N Engl J Med*, 373: 1627-39.
- Bosmuller, H. C., P. Wagner, J. K. Peper, H. Schuster, D. L. Pham, K. Greif, C. Beschorner, H. G. Rammensee, S. Stevanovic, F. Fend, and A. Staebler. 2016. 'Combined Immunoscore of CD103 and CD3 Identifies Long-Term Survivors in High-Grade Serous Ovarian Cancer', *Int J Gynecol Cancer*, 26: 671-9.
- Burger, M., J. W. Catto, G. Dalbagni, H. B. Grossman, H. Herr, P. Karakiewicz, W. Kassouf, L. A. Kiemeny, C. La Vecchia, S. Shariat, and Y. Lotan. 2013. 'Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer', *Eur Urol*, 63: 234-41.
- Carbognin, L., S. Pilotto, M. Milella, V. Vaccaro, M. Brunelli, A. Calio, F. Cuppone, I. Sperduti, D. Giannarelli, M. Chilosi, V. Bronte, A. Scarpa, E. Bria, and G. Tortora. 2015. 'Differential Activity of Nivolumab, Pembrolizumab and MPDL3280A according to the Tumor Expression of Programmed Death-Ligand-1 (PD-L1): Sensitivity Analysis of Trials in Melanoma, Lung and Genitourinary Cancers', *PLoS One*, 10: e0130142.
- Casadevall, D., S. Clave, A. Taus, M. Hardy-Werbin, P. Rocha, M. Lorenzo, S. Menendez, M. Salido, J. Albanell, L. Pijuan, and E. Arriola. 2017. 'Heterogeneity of Tumor and Immune Cell PD-L1 Expression and Lymphocyte Counts in Surgical NSCLC Samples', *Clin Lung Cancer*, 18: 682-91 e5.
- Chalmers, Z. R., C. F. Connelly, D. Fabrizio, L. Gay, S. M. Ali, R. Ennis, A. Schrock, B. Campbell, A. Shlien, J. Chmielecki, F. Huang, Y. He, J. Sun, U. Tabori, M. Kennedy, D. S. Lieber, S. Roels, J. White, G. A. Otto, J. S. Ross, L. Garraway, V. A. Miller, P. J. Stephens, and G. M. Frampton. 2017. 'Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden', *Genome Med*, 9: 34.
- Chang, M. T., A. Penson, N. B. Desai, N. D. Socci, R. Shen, V. E. Seshan, R. Kundra, A. Abeshouse, A. Viale, E. K. Cha, X. Hao, V. E. Reuter, C. M. Rudin, B. H. Bochner, J. E. Rosenberg, D. F. Bajorin, N. Schultz, M. F. Berger, G. Iyer, D. B. Solit, H. A. Al-Ahmadie, and B. S. Taylor. 2018. 'Small-Cell Carcinomas of the Bladder and Lung Are Characterized by a Convergent but Distinct Pathogenesis', *Clin Cancer Res*, 24: 1965-73.
- Comperat, E., M. B. Amin, J. I. Epstein, D. E. Hansel, G. Paner, H. Al-Ahmadie, L. True, D. Bayder, T. Bivalacqua, F. Brimo, L. Cheng, J. Cheville, G. Dalbagni, S. Falzarano, J. Gordetsky, C. Guo, S. Gupta, O. Hes, G. Iyer,

- S. Kaushal, L. Kunju, C. Magi-Galluzzi, A. Matoso, J. McKenney, G. J. Netto, A. O. Osunkoya, C. C. Pan, K. Pivovarcikova, M. R. Raspollini, H. Reis, J. Rosenberg, M. Roupret, R. B. Shah, S. F. Shariat, K. Trpkov, V. Weyerer, M. Zhou, and V. Reuter. 2021. 'The Genitourinary Pathology Society Update on Classification of Variant Histologies, T1 Substaging, Molecular Taxonomy, and Immunotherapy and PD-L1 Testing Implications of Urothelial Cancers', *Adv Anat Pathol*, 28: 196-208.
- De Santis, M., J. Bellmunt, G. Mead, J. M. Kerst, M. Leahy, P. Maroto, T. Gil, S. Marreud, G. Daugaard, I. Skoneczna, S. Collette, J. Lorent, R. de Wit, and R. Sylvester. 2012. 'Randomized phase II/III trial assessing gemcitabine/carboplatin and methotrexate/carboplatin/vinblastine in patients with advanced urothelial cancer who are unfit for cisplatin-based chemotherapy: EORTC study 30986', *J Clin Oncol*, 30: 191-9.
- Deng, L., H. Liang, B. Burnette, M. Beckett, T. Darga, R. R. Weichselbaum, and Y. X. Fu. 2014. 'Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice', *J Clin Invest*, 124: 687-95.
- Dong, H., and L. Chen. 2003. 'B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity', *J Mol Med (Berl)*, 81: 281-7.
- Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis, and L. Chen. 2002. 'Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion', *Nat Med*, 8: 793-800.
- Erlmeier, F., A. K. Seitz, G. Hatzichristodoulou, L. Stecher, M. Retz, J. E. Gschwend, W. Weichert, H. R. Kubler, and T. Horn. 2016. 'The Role of PD-L1 Expression and Intratumoral Lymphocytes in Response to Perioperative Chemotherapy for Urothelial Carcinoma', *Bladder Cancer*, 2: 425-32.
- Faraj, S. F., E. Munari, G. Guner, J. Taube, R. Anders, J. Hicks, A. Meeker, M. Schoenberg, T. Bivalacqua, C. Drake, and G. J. Netto. 2015. 'Assessment of tumoral PD-L1 expression and intratumoral CD8+ T cells in urothelial carcinoma', *Urology*, 85: 703 e1-6.
- Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo. 2000. 'Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation', *J Exp Med*, 192: 1027-34.
- Galsky, M. D., N. M. Hahn, J. Rosenberg, G. Sonpavde, T. Hutson, W. K. Oh, R. Dreicer, N. Vogelzang, C. N. Sternberg, D. F. Bajorin, and J. Bellmunt. 2011. 'Treatment of patients with metastatic urothelial cancer "unfit" for Cisplatin-based chemotherapy', *J Clin Oncol*, 29: 2432-8.
- Garon, E. B., N. A. Rizvi, R. Hui, N. Leighl, A. S. Balmanoukian, J. P. Eder, A. Patnaik, C. Aggarwal, M. Gubens, L. Horn, E. Carcereny, M. J. Ahn, E. Felip, J. S. Lee, M. D. Hellmann, O. Hamid, J. W. Goldman, J. C. Soria, M. Dolled-Filhart, R. Z. Rutledge, J. Zhang, J. K. Luceford, R. Rangwala, G. M. Lubiniecki, C. Roach, K. Emancipator, L. Gandhi, and Keynote- Investigators. 2015. 'Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer', *N Engl J Med*, 372: 2018-28.

- Gopalakrishnan, D., V. S. Koshkin, M. C. Ornstein, A. Papatsoris, and P. Grivas. 2018. 'Immune checkpoint inhibitors in urothelial cancer: recent updates and future outlook', *Ther Clin Risk Manag*, 14: 1019-40.
- Gordon, S. R., R. L. Maute, B. W. Dulken, G. Hutter, B. M. George, M. N. McCracken, R. Gupta, J. M. Tsai, R. Sinha, D. Corey, A. M. Ring, A. J. Connolly, and I. L. Weissman. 2017. 'PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity', *Nature*, 545: 495-99.
- Gubin, M. M., M. N. Artyomov, E. R. Mardis, and R. D. Schreiber. 2015. 'Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy', *J Clin Invest*, 125: 3413-21.
- Guo, C. C., T. Majewski, L. Zhang, H. Yao, J. Bondaruk, Y. Wang, S. Zhang, Z. Wang, J. G. Lee, S. Lee, D. Cogdell, M. Zhang, P. Wei, H. B. Grossman, A. Kamat, J. J. Duplisea, J. E. Ferguson, 3rd, H. Huang, V. Dadhanian, J. Gao, C. Dinney, J. N. Weinstein, K. Baggerly, D. McConkey, and B. Czerniak. 2019. 'Dysregulation of EMT Drives the Progression to Clinically Aggressive Sarcomatoid Bladder Cancer', *Cell Rep*, 27: 1781-93 e4.
- Guo, Z. S. 2018. 'The 2018 Nobel Prize in medicine goes to cancer immunotherapy (editorial for BMC cancer)', *BMC Cancer*, 18: 1086.
- Hashizume, A., S. Umemoto, T. Yokose, Y. Nakamura, M. Yoshihara, K. Shoji, S. Wada, Y. Miyagi, T. Kishida, and T. Sasada. 2018. 'Enhanced expression of PD-L1 in non-muscle-invasive bladder cancer after treatment with Bacillus Calmette-Guerin', *Oncotarget*, 9: 34066-78.
- Hirsch, F. R., A. McElhinny, D. Stanforth, J. Ranger-Moore, M. Jansson, K. Kulangara, W. Richardson, P. Towne, D. Hanks, B. Vennapusa, A. Mistry, R. Kalamegham, S. Averbuch, J. Novotny, E. Rubin, K. Emancipator, I. McCaffery, J. A. Williams, J. Walker, J. Longshore, M. S. Tsao, and K. M. Kerr. 2017. 'PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project', *J Thorac Oncol*, 12: 208-22.
- Hodgson, A., S. K. Liu, D. Vesprini, B. Xu, and M. R. Downes. 2018. 'Basal-subtype bladder tumours show a 'hot' immunophenotype', *Histopathology*, 73: 748-57.
- Hodgson, A., E. Slodkowska, A. Jungbluth, S. K. Liu, D. Vesprini, D. Enepekides, K. Higgins, N. Katabi, B. Xu, and M. R. Downes. 2018. 'PD-L1 Immunohistochemistry Assay Concordance in Urothelial Carcinoma of the Bladder and Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma', *Am J Surg Pathol*, 42: 1059-66.
- Ilie, M., E. Long-Mira, C. Bence, C. Butori, S. Lassalle, L. Bouhlel, L. Fazzalari, K. Zahaf, S. Lalvee, K. Washetine, J. Mouroux, N. Venissac, M. Poudenx, J. Otto, J. C. Sabourin, C. H. Marquette, V. Hofman, and P. Hofman. 2016. 'Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies', *Ann Oncol*, 27: 147-53.
- Inman, B. A., T. J. Sebo, X. Frigola, H. Dong, E. J. Bergstralh, I. Frank, Y. Fradet, L. Lacombe, and E. D. Kwon. 2007. 'PD-L1 (B7-H1) expression

- by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression', *Cancer*, 109: 1499-505.
- Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo. 1992. 'Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death', *EMBO J*, 11: 3887-95.
- Jiao, R., H. Luo, W. Xu, and H. Ge. 2019. 'Immune checkpoint inhibitors in esophageal squamous cell carcinoma: progress and opportunities', *Oncotargets Ther*, 12: 6023-32.
- John J. Coen, MD1; Peixin Zhang, PhD2; Philip J. Saylor, MD3; Cheryl T. Lee, MD4; Chin-Lee Wu, MD, PhD3; William Parker, MSc5; Timothy Lautenschlaeger, MD6; Anthony L. Zietman, MD3; Jason A. Efstathiou, MD, DPhil3; Ashesh B. Jani, MD7; Omer Kucuk, MD7; Luis Souhami, MD5; Joseph P. Rodgers, MS2; Howard M. Sandler, MD7; and William U. Shipley, MD3. 2019. 'Bladder Preservation With Twice-a-Day Radiation Plus Fluorouracil/Cisplatin or Once Daily Radiation Plus Gemcitabine for Muscle-Invasive Bladder Cancer: NRG/RTOG 0712—A Randomized Phase II Trial', *Journal of Clinical Oncology*, 37: 44–51.
- Kao, H. F., and P. J. Lou. 2019. 'Immune checkpoint inhibitors for head and neck squamous cell carcinoma: Current landscape and future directions', *Head Neck*, 41 Suppl 1: 4-18.
- Karasaki, T., K. Nagayama, H. Kuwano, J. I. Nitadori, M. Sato, M. Anraku, A. Hosoi, H. Matsushita, Y. Morishita, K. Kashiwabara, M. Takazawa, O. Ohara, K. Kakimi, and J. Nakajima. 2017. 'An Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle: Towards Personalized Immunotherapy of Lung Cancer', *J Thorac Oncol*, 12: 791-803.
- Kirkali, Z., T. Chan, M. Manoharan, F. Algaba, C. Busch, L. Cheng, L. Kiemeny, M. Kriegmair, R. Montironi, W. M. Murphy, I. A. Sesterhenn, M. Tachibana, and J. Weider. 2005. 'Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis', *Urology*, 66: 4-34.
- Kraywinkel, Klaus, Julia Fiebig, and Gerald Bastian Schulz. 2018. 'Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms in Deutschland', *Der Onkologe*, 24: 6-13.
- Li, H., Q. Zhang, L. Shuman, M. Kaag, J. D. Raman, S. Merrill, D. J. DeGraff, J. I. Warrick, and G. Chen. 2020. 'Evaluation of PD-L1 and other immune markers in bladder urothelial carcinoma stratified by histologic variants and molecular subtypes', *Sci Rep*, 10: 1439.
- Linder, B. J., S. A. Boorjian, J. C. Cheville, W. R. Sukov, P. Thapa, R. F. Tarrell, and I. Frank. 2013. 'The impact of histological reclassification during pathology re-review--evidence of a Will Rogers effect in bladder cancer?', *J Urol*, 190: 1692-6.
- Madore, J., R. E. Vilain, A. M. Menzies, H. Kakavand, J. S. Wilmott, J. Hyman, J. H. Yearley, R. F. Kefford, J. F. Thompson, G. V. Long, P. Hersey, and R. A. Scolyer. 2015. 'PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials', *Pigment Cell Melanoma Res*, 28: 245-53.
- Massard, C., M. S. Gordon, S. Sharma, S. Rafii, Z. A. Wainberg, J. Luke, T. J. Curiel, G. Colon-Otero, O. Hamid, R. E. Sanborn, P. H. O'Donnell, A. Drakaki, W. Tan, J. F. Kurland, M. C. Rebelatto, X. Jin, J. A. Blake-

- Haskins, A. Gupta, and N. H. Segal. 2016. 'Safety and Efficacy of Durvalumab (MEDI4736), an Anti-Programmed Cell Death Ligand-1 Immune Checkpoint Inhibitor, in Patients With Advanced Urothelial Bladder Cancer', *J Clin Oncol*, 34: 3119-25.
- Migden, M. R., D. Rischin, C. D. Schmults, A. Guminski, A. Hauschild, K. D. Lewis, C. H. Chung, L. Hernandez-Aya, A. M. Lim, A. L. S. Chang, G. Rabinowits, A. A. Thai, L. A. Dunn, B. G. M. Hughes, N. I. Khushalani, B. Modi, D. Schadendorf, B. Gao, F. Seebach, S. Li, J. Li, M. Mathias, J. Booth, K. Mohan, E. Stankevich, H. M. Babiker, I. Brana, M. Gil-Martin, J. Homsí, M. L. Johnson, V. Moreno, J. Niu, T. K. Owonikoko, K. P. Papadopoulos, G. D. Yancopoulos, I. Lowy, and M. G. Fury. 2018. 'PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma', *N Engl J Med*, 379: 341-51.
- Mimura, K., L. Yamada, D. Ujiie, S. Hayase, T. Tada, H. Hanayama, A. K. Thar Min, M. Shibata, T. Momma, Z. Saze, S. Ohki, and K. Kono. 2018. 'Immunotherapy for esophageal squamous cell carcinoma: a review', *Fukushima J Med Sci*, 64: 46-53.
- Minion, L. E., and K. S. Tewari. 2018. 'Cervical cancer - State of the science: From angiogenesis blockade to checkpoint inhibition', *Gynecol Oncol*, 148: 609-21.
- Mukherji, D., M. N. Jabbour, M. Saroufim, S. Temraz, R. Nasr, M. Charafeddine, R. Assi, A. Shamseddine, and A. N. Tawil. 2016. 'Programmed Death-Ligand 1 Expression in Muscle-Invasive Bladder Cancer Cystectomy Specimens and Lymph Node Metastasis: A Reliable Treatment Selection Biomarker?', *Clin Genitourin Cancer*, 14: 183-7.
- Mullane, S. A., L. Werner, J. Rosenberg, S. Signoretti, M. Callea, T. K. Choueiri, G. J. Freeman, and J. Bellmunt. 2016. 'Correlation of Apobec Mrna Expression with overall Survival and pd-l1 Expression in Urothelial Carcinoma', *Sci Rep*, 6: 27702.
- Munari, E., G. Zamboni, G. Lunardi, M. Marconi, M. Sommaggio, M. Brunelli, G. Martignoni, G. J. Netto, M. O. Hoque, F. Moretta, M. C. Mingari, M. C. Pegoraro, F. R. Mariotti, P. Vacca, L. Moretta, and G. Bogina. 2018. 'PD-L1 expression comparison between primary and relapsed non-small cell lung carcinoma using whole sections and clone SP263', *Oncotarget*, 9: 30465-71.
- Necchi, A., A. Anichini, D. Raggi, A. Briganti, S. Massa, R. Luciano, M. Colecchia, P. Giannatempo, R. Mortarini, M. Bianchi, E. Fare, F. Monopoli, R. Colombo, A. Gallina, A. Salonia, A. Messina, S. M. Ali, R. Madison, J. S. Ross, J. H. Chung, R. Salvioni, L. Mariani, and F. Montorsi. 2018. 'Pembrolizumab as Neoadjuvant Therapy Before Radical Cystectomy in Patients With Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma (PURE-01): An Open-Label, Single-Arm, Phase II Study', *J Clin Oncol*, 36: 3353-60.
- Necchi, A., R. W. Joseph, Y. Loriot, J. Hoffman-Censits, J. L. Perez-Gracia, D. P. Petrylak, C. L. Derleth, D. Tayama, Q. Zhu, B. Ding, C. Kaiser, and J. E. Rosenberg. 2017. 'Atezolizumab in platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: post-progression outcomes from the phase II IMvigor210 study', *Ann Oncol*, 28: 3044-50.

- Necchi, A., G. R. Pond, D. Raggi, P. Giannatempo, N. J. Vogelzang, P. Grivas, M. D. Galsky, J. Bellmunt, and G. Sonpavde. 2017. 'Efficacy and Safety of Gemcitabine Plus Either Taxane or Carboplatin in the First-Line Setting of Metastatic Urothelial Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Clin Genitourin Cancer*, 15: 23-30 e2.
- Necchi, A., D. Raggi, A. Gallina, R. Madison, M. Colecchia, R. Luciano, R. Montironi, P. Giannatempo, E. Fare, F. Pederzoli, M. Bandini, M. Bianchi, R. Colombo, G. Gandaglia, N. Fossati, L. Marandino, U. Capitanio, F. Deho, S. M. Ali, J. H. Chung, J. S. Ross, A. Salonia, A. Briganti, and F. Montorsi. 2020. 'Updated Results of PURE-01 with Preliminary Activity of Neoadjuvant Pembrolizumab in Patients with Muscle-invasive Bladder Carcinoma with Variant Histologies', *Eur Urol*, 77: 439-46.
- Owyong, M., Y. Lotan, P. Kapur, V. Panwar, T. McKenzie, T. K. Lee, X. Zi, J. W. Martin, A. Mosbah, H. Abol-Enein, M. Ghoneim, and R. F. Youssef. 2019. 'Expression and prognostic utility of PD-L1 in patients with squamous cell carcinoma of the bladder', *Urol Oncol*, 37: 478-84.
- Pichler, R., I. Heidegger, J. Fritz, M. Danzl, S. Sprung, B. Zelger, A. Brunner, and A. Pircher. 2017. 'PD-L1 expression in bladder cancer and metastasis and its influence on oncologic outcome after cystectomy', *Oncotarget*, 8: 66849-64.
- Poole, R. M. 2014. 'Pembrolizumab: first global approval', *Drugs*, 74: 1973-81.
- Powles, T., J. P. Eder, G. D. Fine, F. S. Braiteh, Y. Loriot, C. Cruz, J. Bellmunt, H. A. Burris, D. P. Petrylak, S. L. Teng, X. Shen, Z. Boyd, P. S. Hegde, D. S. Chen, and N. J. Vogelzang. 2014. 'MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer', *Nature*, 515: 558-62.
- Powles, Thomas, Ignacio Durán, Michiel S. van der Heijden, Yohann Loriot, Nicholas J. Vogelzang, Ugo De Giorgi, Stéphane Oudard, Margitta M. Retz, Daniel Castellano, Aristotelis Bamias, Aude Fléchon, Gwenaëlle Gravis, Syed Hussain, Toshimi Takano, Ning Leng, Edward E. Kadel, Romain Banchereau, Priti S. Hegde, Sanjeev Mariathasan, Na Cui, Xiaodong Shen, Christina L. Derleth, Marjorie C. Green, and Alain Ravaud. 2018. 'Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial', *The Lancet*, 391: 748-57.
- Przybylski, K., E. Majchrzak, L. Weselik, and W. Golusinski. 2018. 'Immunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Immune checkpoint blockade', *Otolaryngol Pol*, 72: 10-16.
- Reis, H., R. Serrette, J. Posada, V. Lu, Y. B. Chen, A. Gopalan, S. W. Fine, S. K. Tickoo, S. J. Sirintrapun, G. Iyer, S. A. Funt, M. Y. Teo, J. E. Rosenberg, D. F. Bajorin, G. Dalbagni, B. H. Bochner, D. B. Solit, V. E. Reuter, and H. A. Al-Ahmadie. 2019. 'PD-L1 Expression in Urothelial Carcinoma With Predominant or Pure Variant Histology: Concordance Among 3 Commonly Used and Commercially Available Antibodies', *Am J Surg Pathol*, 43: 920-27.
- Robertson, A. G., J. Kim, H. Al-Ahmadie, J. Bellmunt, G. Guo, A. D. Cherniack, T. Hinoue, P. W. Laird, K. A. Hoadley, R. Akbani, M. A. A. Castro, E. A.

- Gibb, R. S. Kanchi, D. A. Gordenin, S. A. Shukla, F. Sanchez-Vega, D. E. Hansel, B. A. Czerniak, V. E. Reuter, X. Su, B. de Sa Carvalho, V. S. Chagas, K. L. Mungall, S. Sadeghi, C. S. Pedamallu, Y. Lu, L. J. Klimczak, J. Zhang, C. Choo, A. I. Ojesina, S. Bullman, K. M. Leraas, T. M. Lichtenberg, C. J. Wu, N. Schultz, G. Getz, M. Meyerson, G. B. Mills, D. J. McConkey, Tcga Research Network, J. N. Weinstein, D. J. Kwiatkowski, and S. P. Lerner. 2017. 'Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer', *Cell*, 171: 540-56 e25.
- Rosenberg, Jonathan E., Jean Hoffman-Censits, Tom Powles, Michiel S. van der Heijden, Arjun V. Balar, Andrea Necchi, Nancy Dawson, Peter H. O'Donnell, Ani Balmanoukian, Yohann Loriot, Sandy Srinivas, Margitta M. Retz, Petros Grivas, Richard W. Joseph, Matthew D. Galsky, Mark T. Fleming, Daniel P. Petrylak, Jose Luis Perez-Gracia, Howard A. Burris, Daniel Castellano, Christina Canil, Joaquim Bellmunt, Dean Bajorin, Dorothee Nickles, Richard Bourgon, Garrett M. Frampton, Na Cui, Sanjeev Mariathasan, Oyewale Abidoye, Gregg D. Fine, and Robert Dreicer. 2016. 'Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial', *The Lancet*, 387: 1909-20.
- Scheel, A. H., G. Baenfer, G. Baretton, M. Dietel, R. Diezko, T. Henkel, L. C. Heukamp, B. Jasani, K. Johrens, T. Kirchner, F. Lasitschka, I. Petersen, S. Reu, H. U. Schildhaus, P. Schirmacher, K. Schwamborn, U. Sommer, O. Stoss, M. Tiemann, A. Warth, W. Weichert, J. Wolf, R. Buttner, and J. Ruschoff. 2018. 'Interlaboratory concordance of PD-L1 immunohistochemistry for non-small-cell lung cancer', *Histopathology*, 72: 449-59.
- Scheel, A. H., M. Dietel, L. C. Heukamp, K. Johrens, T. Kirchner, S. Reu, J. Ruschoff, H. U. Schildhaus, P. Schirmacher, M. Tiemann, A. Warth, W. Weichert, R. N. Fischer, J. Wolf, and R. Buettner. 2016. 'Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas', *Mod Pathol*, 29: 1165-72.
- Schildhaus, H. U. 2018. 'Der prädiktive Wert der PD-L1-Diagnostik', *Pathologe*, 39: 498-519.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, and M. J. Smyth. 2011. 'Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion', *Science*, 331: 1565-70.
- Sharma, Padmanee, Margitta Retz, Arlene Siefker-Radtke, Ari Baron, Andrea Necchi, Jens Bedke, Elizabeth R. Plimack, Daniel Vaena, Marc-Oliver Grimm, Sergio Bracarda, José Ángel Arranz, Sumanta Pal, Chikara Ohyama, Abdel Saci, Xiaotao Qu, Alexandre Lambert, Suba Krishnan, Alex Azrilevich, and Matthew D. Galsky. 2017. 'Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial', *The Lancet Oncology*, 18: 312-22.
- Shinohara, T., M. Taniwaki, Y. Ishida, M. Kawaichi, and T. Honjo. 1994. 'Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1)', *Genomics*, 23: 704-6.

- Siegel, R. L., K. D. Miller, and A. Jemal. 2019. 'Cancer statistics, 2019', *CA Cancer J Clin*, 69: 7-34.
- Song, D., T. Powles, L. Shi, L. Zhang, M. A. Ingersoll, and Y. J. Lu. 2019. 'Bladder cancer, a unique model to understand cancer immunity and develop immunotherapy approaches', *J Pathol*, 249: 151-65.
- Sunshine, J. C., P. L. Nguyen, G. J. Kaunitz, T. R. Cottrell, S. Berry, J. Esandrio, H. Xu, A. Ogurtsova, K. B. Bleich, T. C. Cornish, E. J. Lipson, R. A. Anders, and J. M. Taube. 2017. 'PD-L1 Expression in Melanoma: A Quantitative Immunohistochemical Antibody Comparison', *Clin Cancer Res*, 23: 4938-44.
- Suzman, D. L., S. Agrawal, Y. M. Ning, V. E. Maher, L. L. Fernandes, S. Karuri, S. Tang, R. Sridhara, J. Schroeder, K. B. Goldberg, A. Ibrahim, A. E. McKee, R. Pazdur, and J. A. Beaver. 2019. 'FDA Approval Summary: Atezolizumab or Pembrolizumab for the Treatment of Patients with Advanced Urothelial Carcinoma Ineligible for Cisplatin-Containing Chemotherapy', *Oncologist*, 24: 563-69.
- Tretiakova, M., R. Fulton, M. Kocherginsky, T. Long, C. Ussakli, T. Antic, and A. Gown. 2018. 'Concordance study of PD-L1 expression in primary and metastatic bladder carcinomas: comparison of four commonly used antibodies and RNA expression', *Mod Pathol*, 31: 623-32.
- van Dijk, N., S. A. Funt, C. U. Blank, T. Powles, J. E. Rosenberg, and M. S. van der Heijden. 2019. 'The Cancer Immunogram as a Framework for Personalized Immunotherapy in Urothelial Cancer', *Eur Urol*, 75: 435-44.
- Vennapusa, B., B. Baker, M. Kowanzetz, J. Boone, I. Menzl, J. M. Bruey, G. Fine, S. Mariathasan, I. McCaffery, S. Mocci, S. Rost, D. Smith, E. Dennis, S. Y. Tang, B. Damadzadeh, E. Walker, P. S. Hegde, J. A. Williams, H. Koeppen, and Z. Boyd. 2019. 'Development of a PD-L1 Complementary Diagnostic Immunohistochemistry Assay (SP142) for Atezolizumab', *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 27: 92-100.
- Wahlin, S., B. Nodin, K. Leandersson, K. Boman, and K. Jirstrom. 2019. 'Clinical impact of T cells, B cells and the PD-1/PD-L1 pathway in muscle invasive bladder cancer: a comparative study of transurethral resection and cystectomy specimens', *Oncoimmunology*, 8: e1644108.
- Wang, B., W. Pan, M. Yang, W. Yang, W. He, X. Chen, J. Bi, N. Jiang, J. Huang, and T. Lin. 2019. 'Programmed death ligand-1 is associated with tumor infiltrating lymphocytes and poorer survival in urothelial cell carcinoma of the bladder', *Cancer Sci*, 110: 489-98.
- Wang, B., S. Wu, H. Zeng, Z. Liu, W. Dong, W. He, X. Chen, X. Dong, L. Zheng, T. Lin, and J. Huang. 2015. 'CD103+ Tumor Infiltrating Lymphocytes Predict a Favorable Prognosis in Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder', *J Urol*, 194: 556-62.
- Wankowicz, S. A. M., L. Werner, A. Orsola, J. Novak, M. Bowden, T. K. Choueiri, I. de Torres, J. Morote, G. J. Freeman, S. Signoretti, and J. Bellmunt. 2017. 'Differential Expression of PD-L1 in High Grade T1 vs Muscle Invasive Bladder Carcinoma and its Prognostic Implications', *J Urol*, 198: 817-23.
- Wu, P., D. Wu, L. Li, Y. Chai, and J. Huang. 2015. 'PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis', *PLoS One*, 10: e0131403.

- Yang, Y., R. K. Jain, S. T. Glenn, B. Xu, P. K. Singh, L. Wei, Q. Hu, M. Long, N. Hutson, J. Wang, S. Battaglia, and S. George. 2020. 'Complete response to anti-PD-L1 antibody in a metastatic bladder cancer associated with novel MSH4 mutation and microsatellite instability', *J Immunother Cancer*, 8.
- Zhang, P., D. M. Su, M. Liang, and J. Fu. 2008. 'Chemopreventive agents induce programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1-mediated T cell apoptosis', *Mol Immunol*, 45: 1470-6.

Internetquellen

- IMD Institut für Medizinische Diagnostik, Berlin-Potsdam GbR. 2020. 'Der zelluläre Immunstatus Inhalt, Indikationen und Interpretation', Accessed 08.11.2020. <https://www.imd-berlin.de/fachinformationen/diagnostikinformationen/der-zellulaere-immunstatus-indikationen-und-interpretation.html>.
- Nordic Immunohistochemistry Quality Control, NordiQC. 2019. 'Assessment Run C5 2019 PD-L1 (Uro)', Accessed 26.08.2021. www.nordiqc.org/downloads/assessments/121_106.pdf.
- S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom, Leitlinienprogramm Onkologie November 2016. 2016. 'S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms'. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Blasenkarzinom/LL_Harnblasenkarzinom_Langversion_1.1.pdf.
- U.S. Food and Drug Administration. Accessed 20.10.2020. <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/>.
- Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut. 2019a. 'Harnblasenkrebs', Accessed 13.05.2020. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Blasenkrebs/harnblasenkrebs_node.html.
- . 2019b. 'Überlebensraten', Accessed 18.08.2021. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Methoden/Ueberlebensraten/ueberlebensraten_node.html.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von PD Dr. med. Hans Bösmüller durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Professor Dr. Falko Fend, ärztlicher Direktor des Instituts für Pathologie am UKT, und PD Dr. Hans Bösmüller, Oberarzt des Instituts für Pathologie am UKT. Die Kollektiverstellung erfolgte eigenständig durch mich. Die Sichtung und letztendliche Auswahl der Fälle für die Immunfärbung erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Hans Bösmüller.

Teile der Versuche im Rahmen der Immunhistochemie wurden nach Einarbeitung durch Karen Greif, medizinisch-technische Assistentin im Institut für Pathologie, von mir in Zusammenarbeit und mit Unterstützung der oben genannten sowie mit Christine Beschorner, medizinisch-technische Assistentin im Institut für Pathologie, durchgeführt. Nachfolgende Färbungen wurden von mir veranlasst und von Karen Greif durchgeführt. Die Auswertung der Schnitte erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Hans Bösmüller. Alle Fotos wurden nach Einarbeitung durch PD Dr. Hans Bösmüller von mir erstellt und von Max Langer bearbeitet und formatiert.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig mit Beratung durch PD Dr. Hans Bösmüller verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8 Danksagung

Ich danke PD Dr. Hans Bösmüller für die Betreuung und Unterstützung während des gesamten Projekts. Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Falko Fend sowie allen beteiligten Mitarbeitenden des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen für die freundliche Zusammenarbeit.

Max Langer und Manuel Müller möchte ich für die Hilfe bei der technischen Umsetzung danken.