

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

DISSERTATION

**HER3, CK5/6 und APOBEC3B als Biomarker in histologisch
definierten Subtypen des Ovarialkarzinoms**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Ulrike Rüder,
geb. Unger
aus Berlin

Datum der Promotion: 06.03.2020

Inhaltsverzeichnis

<u>Zusammenfassung der Publikationspromotion</u>	<u>3</u>
<u>Abstract</u>	<u>3</u>
<u>Abstrakt</u>	<u>4</u>
<u>1. Einführung</u>	<u>6</u>
<u>2. Methodik</u>	<u>9</u>
<u>2.1 Studienpopulation</u>	<u>9</u>
<u>2.2 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)</u>	<u>9</u>
<u>2.3 Immunhistochemie</u>	<u>10</u>
<u>2.4 Statistische Analysen</u>	<u>11</u>
<u>3. Ergebnisse</u>	<u>12</u>
<u>3.1 HER3</u>	<u>12</u>
<u>3.2 CK5/6</u>	<u>13</u>
<u>3.3 APOBEC3B</u>	<u>14</u>
<u>4. Diskussion</u>	<u>16</u>
<u>5. Literaturverzeichnis</u>	<u>18</u>
<u>Eidesstattliche Versicherung</u>	<u>22</u>
<u>Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen</u>	<u>23</u>
<u>Originalarbeiten als Promotionsleistung</u>	<u>25</u>
<u>(i) Prognostic impact of HER3 based on protein and mRNA expression in high-grade serous ovarian carcinoma</u>	<u>25</u>
<u>(ii) Cytokeratin 5/6 expression, prognosis and association with ER-α in high-grade serous ovarian carcinoma</u>	<u>35</u>
<u>(iii) APOBEC3B protein expression and mRNA analyses in patients with high-grade serous ovarian carcinoma</u>	<u>43</u>
<u>Lebenslauf</u>	<u>57</u>
<u>Publikationsliste</u>	<u>58</u>
<u>Danksagung</u>	<u>59</u>

Zusammenfassung der Publikationspromotion

Abstract

Introduction The diagnosis 'ovarian carcinoma' often means suffering from severe disease with relapsing progress. Biomarkers are needed to separate patients with rather poor prognosis from those with longer progression-free (PFS) or overall survival (OS). Biomarkers can help to detect patients who could benefit from new therapeutic targets. Thus, we examined HER3, CK5/6 and APOBEC3B as biomarkers in patients with ovarian carcinoma, most notably in patients with high-grade serous ovarian carcinoma (HGSC), which is the most common subtype.

Methods Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples from patients with ovarian carcinoma were used. HER3, CK5/6 and APOBEC3B were examined by immunohistochemistry. Additionally, HER3 and APOBEC3B were determined by quantitative real-time PCR. Based on a potential biologically relevant relationship, biomarker expression was combined with markers determined previously such as HER2, estrogen receptor (ER- α) and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). Expression data were correlated with clinicopathological and survival data.

Results All biomarkers were differently expressed in ovarian carcinoma. HER3-mRNA levels were significantly higher in ovarian clear cell carcinoma (CCC) compared to those in HGSC ($P < 0.0001$). Also, for APOBEC3B highest mRNA-levels were obtained for CCC. In HGSC, 60 (28.6%) tumors were nuclear positive and 45 (21.4%) tumors were cytoplasmic positive for APOBEC3B. In all other subtypes, cytoplasmic positive staining was almost as frequent as negative staining. Nuclear staining occurred more often in CCC (60.4%, $P < 0.0001$).

In HGSC, combined HER3 protein and mRNA expression, survival was the worst for patients with completely negative HER3 status for both PFS ($P = 0.004$) and OS ($P = 0.002$). CK5/6 expression was not associated with survival. However, the combination of high CK5/6 expression with ER- α negativity turned out to be a significant negative prognostic marker in OS ($P = 0.003$) and PFS ($P < 0.001$). In case of APOBEC3B, cytoplasmic and nuclear staining were evaluated separately. TILs were positively correlated with cytoplasmic APOBEC3B (CD3: $P = 0.017$; CD8: $P = 0.02$; PD-1: $P = 0.014$) and with APOBEC3B mRNA (CD3: $P < 0.0001$; CD4: $P = 0.023$; CD8: $P = 0.033$; PD-1: $P = 0.001$). High levels of APOBEC3B mRNA correlated, however, only when having used a single

cutoff point, with prolonged PFS in HGSC in univariate ($P=0.043$) and multivariate analyses (HR 0.55; 95%CI 0.35-0.88; $P=0.012$).

Conclusion Biomarker assessment shows diverse expression in histological subtypes of ovarian carcinoma with differing correlation in high-grade serous ovarian carcinoma. Interactions with other markers such as TILs or ER- α underline the potential biological role of these molecules (APOBEC3B in the immune system) or point out still not described functions in hormonal regulation of ovarian carcinoma (CK5/6 in estrogen-receptor signaling).

Abstrakt

Einleitung Die Diagnose ‚Ovarialkarzinom‘ ist oftmals mit einer schweren Erkrankung und rezidivierendem Verlauf verbunden. Biomarker sind notwendig, um Patientinnen mit schlechter Prognose von solchen mit eher langem progressionsfreien (PFS)- oder Gesamtüberleben (OS) zu unterscheiden. Biomarker können helfen Patientinnen zu identifizieren, die von neuen therapeutischen Ansätzen profitieren können. Deshalb haben wir HER3, CK5/6 und APOBEC3B als Biomarker in verschiedenen histologischen Ovarialkarzinomsubtypen, vor allem im high-grade serösen Karzinom (HGSC), dem häufigsten Subtyp, untersucht.

Methodik Mittels Immunhistochemie wurde die Expression von HER3, CK5/6 und APOBEC3B im Gewebe von Patientinnen mit Ovarialkarzinom untersucht. Der Nachweis von HER3 und APOBEC3B auf mRNA-Ebene wurde mittels quantitativer real-time PCR durchgeführt. Basierend auf einer möglichen biologischen Relevanz wurden die Biomarker mit zuvor bestimmten Markern, wie HER2, dem Östrogenrezeptor (ER- α) und den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) kombiniert. Die Daten wurden mit klinischen Parametern und dem Überleben korreliert.

Ergebnisse Die Biomarker waren im Ovarialkarzinom unterschiedlich exprimiert. Im klarzelligen Karzinom (CCC) lagen die HER3 mRNA-Level verglichen mit denen im HGSC signifikant höher ($P<0,0001$). Auch für APOBEC3B zeigten sich im CCC die höchsten mRNA-Level. Im HGSC waren 60 (28,6%) Tumoren nukleär positiv und 45 (21,4%) Tumoren cytoplasmatisch positiv für APOBEC3B. In allen anderen Subtypen waren die cytoplasmatische und nukleäre Färbung nahezu gleich verteilt. Eine Färbung der Nuclei war im CCC häufiger (60,4%, $P<0,0001$).

Die Kombination der HER3 Protein und mRNA Expression zeigte das schlechteste Überleben für Patientinnen mit komplett negativen HER3 Status hinsichtlich PFS ($P=0,004$) und OS ($P=0,002$). Die Expression von CK5/6 war nicht mit dem Überleben assoziiert. Jedoch zeigte die Kombination von stark positivem CK5/6 mit ER- α Negativität einen signifikant negativen prognostischen Effekt auf das OS ($P=0,003$) und PFS ($P<0,001$). APOBEC3B zeigte sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Färbung. Die TILs korrelierten positiv mit der Expression von APOBEC3B im Zytoplasma (CD3: $P=0,017$; CD8: $P=0,02$; PD-1: $P=0,014$) und mit den APOBEC3B mRNA-Levels (CD3: $P<0,0001$; CD4: $P=0,023$; CD8: $P=0,033$; PD-1: $P=0,001$). Hohe APOBEC3B mRNA-Level korrelierten zudem mit einem verlängerten PFS im HGSC in univariaten ($P=0,043$) und multivariaten Analysen (HR 0,55; 95%CI 0,35-0,88; $P=0,012$).

Zusammenfassung Es zeigt sich eine differentielle Expression der Biomarker in den histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms und eine unterschiedliche prognostische Bedeutung im high-grade serösen Karzinom. Interaktionen mit anderen Markern wie TILs oder dem Östrogenrezeptor unterstreichen die vermutete biologische Rolle der entsprechenden Moleküle (APOBEC3B im Immunsystem) oder weisen auf bisher nicht beschriebene Funktionen innerhalb der hormonellen Regulation der Ovarialkarzinome hin (CK5/6 im Östrogenrezeptor-Signalling).

1. Einführung

Unter den Krebsneuerkrankungen rangiert das Ovarialkarzinom mit 3,2% an 8. Stelle bei Frauen, die im Jahr 2014 in Deutschland an einem malignen Tumor erkrankt sind.¹ In Betrachtung der Krebssterbefälle (5431 im Jahr 2015) wird ersichtlich, dass das Ovarialkarzinom nicht zu den häufigsten, wohl aber zu den Tumoren gehört, die durch eine eher schlechte Prognose gekennzeichnet sind.¹ In Deutschland zählt das Ovarialkarzinom zu der fünftödlichsten Krebserkrankung im weiblichen Geschlecht mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 41%, wobei in den USA eine 5-Jahres-Überlebensrate von 46,7% beschrieben ist.²

Ovarialtumoren gehen entweder vom Epithelgewebe, vom Keimzellgewebe oder vom Stroma aus. Gemäß der überarbeiteten FIGO-Klassifikation von 2014 werden folgende Ovarialkarzinome unterschieden: high-grade seröse (HGSC), low-grade seröse (LGSC), endometrioid (EC), klarzellige (CCC) und muzinöse (MC) Karzinome.³ Diese Subtypen sind durch ihre jeweilige Histologie, aber auch durch eine differenzielle Expression verschiedener Biomarker⁴, sowie durch eine differenzielle Karzinogenese mit unterschiedlichen Mutationsspektren⁵ charakterisiert. Mit 68,1% am Häufigsten diagnostiziert wird das HGSC⁶, wobei dieses mit einer im Vergleich schlechten Prognose und einer, auf molekularer Ebene, Ähnlichkeit zum triple-negativen Mammakarzinom (TNBC) verbunden ist. Gemeinsam ist diesen beiden, prognostisch ungünstigen Tumoren eine Häufung von Mutationen in den Genen der Tumorsuppressoren *tp53* und *BRCA*.⁵

Die Therapie besteht für die Mehrheit der Patientinnen leitliniengerecht aus Operation mittels Längslaparotomie mit beidseitiger Adnexektomie, Hysterektomie, Omentektomie, pelviner und paraaortaler Lymphnodektomie und ggf. Entfernung weiterer, befallener Organe und adjuvanter Chemotherapie mittels 6 Zyklen Carboplatin und Paclitaxel. Bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom kann eine Therapie mittels Bevacizumab, einem monoklonalen anti-VEGF-Antikörper, der die Angiogenese inhibiert, parallel zur adjuvanten Chemotherapie und darüber hinaus als Erhaltungstherapie für 12 bis 15 Monate empfohlen werden.⁷ Es stehen zahlreiche weitere Chemotherapeutika zur Verfügung, auch als Ausdruck dafür, dass bisher immer wieder Patientinnen nur wenig, beziehungsweise nicht anhaltend von bisherigen Therapiekonzepten profitieren und Rezidive erleiden. Außerdem erweitert sich das therapeutische Spektrum zunehmend, sodass neben klassischen Chemotherapeutika weitere Substanzen, wie antihormonelle

Medikamente^{8,9}, selektive Antikörper^{10,11} oder mit dem körpereigenen Immunsystem interagierende Therapien¹² in Studien erprobt werden. Dieses vielfältige Angebot erfordert eine gründliche Selektion von Patientinnen, die von zielgerichteten Therapien profitieren können, weshalb der Entwicklung von Biomarkern eine wachsende Bedeutung in der Tumordiagnostik und Tumorbehandlung zukommt. Biomarker dienen dabei nicht nur dazu, mithilfe der Charakterisierung des individuellen Tumors, den therapeutischen Entscheidungsprozess zu unterstützen. In erster Linie ermöglicht die Expression eines Biomarkers oder die Kombination verschiedener Marker, eine eindeutige Diagnose zu stellen und eine Abgrenzung gegenüber anderen, möglicherweise in Betracht kommenden Raumforderungen vorzunehmen und damit eine adäquate Therapie einzuleiten. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Biomarker sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor 3 (**HER3**) gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGFR). HER3 liegt als membrangebundene Tyrosinkinase vor, die mit HER2, einem weiteren Mitglied der EGFR-Familie und gleichsam einer Zielstruktur in der Therapie des Mammakarzinoms, dimerisiert und somit zur Aktivierung nachfolgender zellulärer Signalwege führt.¹³ Das HER2/HER3 Heterodimer führt insbesondere zur Aktivierung des Phosphoinositid-3-kinase (PI3K)/AKT Signalwegs, der mit der Hemmung von Apoptose, der Induktion von Zellproliferation, Zellmigration und Zelladhäsion^{14,15} verbunden ist und somit zur Tumorentstehung bzw. Tumorpheriferation beiträgt. Es hat sich gezeigt, dass HER3 im Gewebe von Ovarialkarzinomen überexprimiert wird.¹⁶ Innerhalb einer ausgesuchten Gruppe von Patientinnen mit fortgeschrittenem und platin-resistentem Ovarialkarzinom ist die Expression von HER3 auf mRNA-Ebene zudem von prognostischer Relevanz.¹⁷ Es stellte sich also die Frage, wie sich die Expression von HER3 auf Protein und mRNA-Ebene im Ovarialkarzinom verhält und ob eine Korrelation mit bisherigen Prognoseparametern, mit dem Dimerisierungspartner HER2 oder auch mit dem Überleben vorhanden ist.

Zytokeratine gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente und bilden, neben anderen Strukturen, das Zytoskelett aus. Verschiedene Zytokeratine sind in verschiedenen Geweben unterschiedlich verteilt, so ist z.B. **Zytokeratin 5/6 (CK5/6)** in mehrschichtigem Epithel und in Basalepithelzellen lokalisiert.^{18,19} Schon heute wird CK5/6 in der Differenzialdiagnostik genutzt, um zum Beispiel vom Peritoneum ausgehende Mesotheliome (in der Regel positiv für CK5/6) von epithelialen Ovarialtumoren zu

unterscheiden.^{20,21,22} Obwohl high-grade seröse Ovarialkarzinome wohl zumeist ihren Ursprung im einschichtigen Tubenepithel haben²³ und somit keine Expression von CK5/6 aufweisen sollten, gibt es Studien^{24,25,26}, die zeigen konnten, dass die Expression von CK5/6 im Ovarialkarzinom in einem Bereich von 25%²⁴ bis zu 55,4%²⁶ rangiert. Im Mammakarzinom konnte zudem eine Gruppe von sogenannten *basal-like* Tumoren identifiziert werden, die Hormonrezeptor und HER2 negativ und positiv für CK5/6 sind²⁷ und sich durch eine schlechte Prognose auszeichnen.²⁸ Im Gegensatz zum Mammakarzinom, in dem die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus essentieller Bestandteil der Tumordiagnostik ist, spielt der Hormonrezeptorstatus im Ovarialkarzinom keine bedeutende Rolle. Verschiedene Gruppen haben jedoch den Östrogenrezeptor ER- α als positiven Prognosefaktor im Ovarialkarzinom identifiziert^{29,30}, sodass sich die Frage stellte, wie sich die Expression von CK5/6 in Abhängigkeit vom ER- α Status verhält. Außerdem untersuchten wir CK5/6 im HGSC hinsichtlich eines Zusammenhangs mit bisher etablierten Prognosefaktoren und dem Überleben.

APOBEC3B (apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide 3B) ist neben anderen Enzymen dieser Familie Teil des Immunsystems.³¹ In der Abwehr viraler Infektionen spielen die APOBEC-Enzyme aufgrund ihrer Eigenschaft als Deaminasen, Cytosin zu Uracil zu konvertieren³², eine wichtige Rolle. APOBEC3B selbst ist im Zellkern lokalisiert^{32,33} und für verschiedene Karzinome als Mutationsquelle beschrieben.^{34,35} In Brustkrebsgewebe ist eine Korrelation von APOBEC3B mRNA mit inaktiviertem tp53 festgestellt worden³⁴, welches ebenfalls eine häufige Mutation bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom ist.⁵ Unter den APOBEC-Enzymen ist es einzig APOBEC3B, das in Zelllinien des Ovarialkarzinoms hochreguliert ist.³⁶ Andere Studien konnten auch einen Zusammenhang zwischen Komponenten des adaptiven Immunsystems, wie intratumoralen T-Zellen (CD3+, CD4+, CD8+)^{37,38}, Rezeptoren aktivierter T-Zellen (PD-1) und deren Liganden (PD-L1)^{39,40} sowie Zytokinen (IFN- γ)⁴¹ und einem verbesserten Überleben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigen. Wir haben uns zum Ziel gesetzt, die Expression von APOBEC3B im HGSC auf Protein und mRNA-Ebene auf den Zusammenhang mit bisher etablierten Prognoseparametern, dem Überleben und den TILs zu untersuchen.

In den bereits publizierten Studien wurde die Expression von HER3⁴², CK5/6⁴³ und APOBEC3B⁴⁴ im Gewebe von Patientinnen mit Ovarialkarzinom untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen im Rahmen dieser Arbeit kurz dargestellt und abschließend diskutiert werden.

2. Methodik

2.1 Studienpopulation

Das zu untersuchende Tumormaterial lag in Form von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Proben vor. Im Zuge einer ständigen Erweiterung entstand ein Kollektiv von Ovarialkarzinomen von insgesamt 805 Fällen, hieraus haben sich die unterschiedlichen Kollektive der in dieser Arbeit vorgestellten Studien mit in Tabelle 1 zusammengefassten Eigenschaften hinsichtlich Alter zum Zeitpunkt der Diagnose, histologischer Typisierung und FIGO Gruppe rekrutiert. Die histologische Typisierung erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Pathologie der Charité. Die klinischen Daten wurden der Tumor Bank Ovarian Cancer Network (TOC: www.toc-network.de) entnommen.

	Ovarialkarzinome					
	HER3 (n=456)	%	CK5/6 (n=215)	%	APOBEC3B (n=482)	%
Alter (Jahren)						
≤60	229	50,2	108	50,2	249	51,7
>60	227	49,8	107	49,8	233	48,3
Histologischer Subtyp (Primarius/Rezidiv)						
high-grade serös	320 (319/1)	70,2	215	100	304 (303/1)	63,1
low-grade serös	55 (44/11)	12,1	-	-	61 (58/3)	12,6
endometrioid	33 (32/1)	7,2	-	-	62 (61/1)	12,9
klarzellig	48 (46/2)	10,5	-	-	55 (53/2)	11,4
FIGO Gruppe						
I	71	15,6	16	7,4	92	19,2
II	27	5,9	13	6,1	28	5,9
III	294	64,5	161	74,9	294	61,5
IV	64	14	25	11,6	64	13,4
fehlende Daten	-	-	-	-	4	-

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Parameter

2.2 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde mithilfe eines Kits (VERSANT kPCR Molecular System: Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) und dazugehöriger Reagenzien robotergesteuert RNA aus vorliegenden FFPE-Proben extrahiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA Proben bei -80°C gelagert.

Zu Beginn wurde der Arbeitsplatz mit RNase freier DNase desinfiziert. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurden TaqMan-Sonden verwendet, die einem Mastermix (SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX, Invitrogen, Forest City, CA, USA) hinzugefügt wurden. Ein weiterer Mix aus Primer- und SONDENSEQUENZEN des Referenzgens (RPL37A: Eurogentec, Seraing, Belgien und

Microsynth, Balgach, Schweiz) und der untersuchten Zielgene (HER3: TIB Molbiol, Berlin, Deutschland; APOBEC3B: TIB Molbiol, Berlin, Deutschland) wurde hergestellt. Sowohl der Mastermix als auch der Primer-/Sondenmix wurden in 384-Well-Platten pipettiert. Jede Probe wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt inklusive einer Negativ- und einer Positivkontrolle (Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) pro Platte. Nach Zentrifugation der Platten und reverser Transkription von mRNA zu cDNA wurde die qRT-PCR mithilfe der ViiATM 7 real-time PCR device (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in der zugehörigen ViiATM 7 Software (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) exportiert. Es wurden ausschließlich die Proben der Platten ausgewertet, die in der Negativkontrolle keine Replikation zeigten. Ein Mittelwert aus den dreifach bestimmten Proben wurde berechnet, wobei die Standardabweichung hierbei nicht größer als 1 sein durfte. Ab einem bestimmten Schwellenwert, dem C_T -Wert, zeigt sich eine exponentielle Zunahme der replizierten DNA. Ein geringer C_T -Wert entspricht somit einer schnellen Replikation aufgrund einer größeren Menge an mRNA in der untersuchten Probe. Die relative Genexpression berechnet sich mithilfe folgender Formel: $20^{- (C_T [\text{Zielgen}] - C_T [\text{Referenzgen}])}$. So erhält man ein proportionales Verhältnis von C_T -Werten und mRNA-Menge.

2.3 Immunhistochemie

Aus den FFPE-Proben der Tumoren wurden Gewebezylinder gestanzt und zu Tissue Microarrays (TMA) zusammengestellt, welche im Folgenden immunhistochemisch untersucht wurden. Alle TMA Schnitte wurden zunächst mittels Xylol entparaffiniert und zur Rehydrierung einer absteigenden Alkoholreihe und destilliertem Wasser unterzogen. Im Falle von **HER3** wurden die TMA's in einem mit Tris/EDTA-Puffer (pH = 9) gefüllten Druckkochtopf gekocht und anschließend mit einer Peroxidase-blockierenden Lösung (Dako, Glostrup, Dänemark) für 15 Minuten inkubiert. Nach dem Auftragen des primären Antikörpers (HER3/ErbB3, D22C5, monoklonaler Kaninchen-Antikörper, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) in einer Verdünnung von 1:250 verblieben die TMA's eine Stunde in einer Feuchtkammer. Zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde nach der Streptavidin/Biotin-Methode verfahren. Die Reaktion von sekundärem Antikörper und 3,3'-Diaminobenzidin Peroxid Substrat (DAB⁺) als Chromogen wurde nach drei Minuten gestoppt. Die **CK5/6** Färbung erfolgte halbautomatisch mithilfe der BenchMark XT (Ventana Medical Systems, Inc., Tuscon, AZ,

USA) und dazugehöriger Reagenzien. Nach automatisch durchgeführten Waschschritten wurde der CK5/6 Antikörper (EP24/EP67, polyklonaler Kaninchen-Antikörper, Epitomics, Inc., Burlingame, CA, USA) manuell in einer Verdünnung von 1:100 auf die TMA's pipettiert. Anschließend erfolgte das Auftragen sekundärer Antikörper und die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion durch DAB⁺ Chromogen automatisch. Die Detektion von **APOBEC3B** erfolgte ebenfalls mithilfe der oben genannten BenchMark XT. Der verwendete primäre APOBEC3B-Antikörper (ab191695, polyklonaler Kaninchen-Antikörper, Abcam, Cambridge, UK) wurde in einer Verdünnung von 1:200 manuell pipettiert, während alle anderen Schritte automatisch erfolgten. Alle TMA's wurden zum Schluss mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden eingescannt und mit der VM Slide Explorer 2.2 Software (VMscope GmbH, Berlin, Germany) hinsichtlich Intensität (0 = negativ, 1 = schwach, 2 = moderat, 3 = stark) und prozentualer Anzahl der gefärbten Tumorzellen (0 = 0%, 1 ≤ 10%, 2 = 11-50%, 3 = 51-80%, 4 = 81-100%) ausgewertet. Ein Immunoreaktivitätsscore (IRS) wurde mittels folgender Formel berechnet: $IRS = \text{Intensität der Färbung} \times \text{prozentualer Anteil der gefärbten Tumorzellen}$ und zeigte dementsprechend Werte zwischen 0 und 12.

2.4 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit IBM SPSS Statistics (23. Version, IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Für die Korrelation kontinuierlicher Daten wurde der Spearman's-Test verwendet. Für die Korrelation kategorialer mit kontinuierlichen Variablen wurden je nach Indikation der Chi²-Test oder der Fisher's Exact-Test genutzt. Klinische Parameter wurden mit den Protein- und mRNA-Daten mithilfe nicht parametrischer Tests, dem Mann-Whitney-U-Test und dem Kruskal-Wallis-Test, korreliert. Die Kaplan-Meier Methode wurde angewendet, um den Einfluss der evaluierten Biomarker auf das Überleben der Patientinnen zu untersuchen. Für die Überlebensanalysen wurden ausschließlich Daten des HGSC-Kollektivs aufgrund der belastbaren Fallzahl und der vorhandenen Überlebensdaten herangezogen. Mit Hilfe des Cutoff Finders (<http://molpath.charite.de/cutoff/>)⁴⁵ wurde der optimale Cut-Off für ermittelte mRNA-Daten bestimmt. Außerdem wurde mithilfe des Cox-Regressions-Modells überprüft, inwieweit der prognostische Wert der Biomarker unabhängig von bisher etablierten Prognosefaktoren einzuschätzen ist. Die Ergebnisse wurden gemäß des Log-rank Tests bei einem *P*-Wert < 0,05 als signifikant eingeschätzt.

3. Ergebnisse

3.1 HER3

Die Werte der HER3 mRNA-Expression reichten im untersuchten Kollektiv der Ovarialkarzinome von 6,67 bis 16,61. Es zeigte sich keine Korrelation der HER3 mRNA-Daten mit sowohl klinisch-pathologisch etablierten Prognoseparametern, wie dem Alter zum Zeitpunkt der Diagnose, dem FIGO Stadium oder dem Resttumor nach Operation ($P > 0,05$) als auch nicht mit der HER2 Proteinexpression (Spearman's-Test, $r = 0,089$, $P = 0,459$). Im CCC waren die HER3 mRNA-Level signifikant höher, als im HGSC und EC (Kruskal-Wallis-Test, $P < 0,0001$).

Zur Durchführung der Überlebensanalysen wurden die HER3 mRNA-Daten mithilfe des Cutoff Finders gruppiert: in HER3 negative Tumoren bei einem Wert von kleiner gleich 11,47 und in HER3 positive Tumoren mit Werten größer als 11,47.

HER3 wies im Ovarialkarzinom eine vorwiegend zytoplasmatische Färbung auf. Eine in einigen Fällen beobachtete Anreicherung von HER3 an der Zellmembran zeigte sich nicht ausreichend genug ausgeprägt, sodass auf eine getrennte Evaluation hinsichtlich der Kompartimente Zellplasma und Zellmembran verzichtet wurde. Um Tumoren mit niedriger, biologisch vermutlich nicht signifikanter HER3 Expression von solchen mit hoher HER3 Expression zu unterscheiden, wurden Tumoren mit IRS Werten von 0-2 ($n = 181$, 52,9%) als negativ definiert und solche mit IRS Werten von 3-12 ($n = 161$, 47,1%) als positiv. Im HGSC waren die Karzinomzellen mehrheitlich HER3 negativ. Im HGSC zeigte sich keine Korrelation der HER3 Proteinexpression mit den HER3 mRNA-Daten. Es zeigte sich zudem keine Korrelation der HER3 Proteinexpression mit zuvor genannten klinisch-pathologisch etablierten Prognoseparametern ($P > 0,05$) als auch nicht mit der HER2 Proteinexpression (Spearman's-Test, $r = 0,066$, $P = 0,581$).

Eine positive Expression von HER3 konnte in einer Minderheit in allen Subtypen des Ovarialkarzinoms beobachtet werden. Einzig im CCC zeigte sich die Mehrheit der Tumoren positiv für HER3, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war ($P = 0,547$).

Überlebensanalysen nach der Kaplan-Meier Methode wurden mit den Daten jeweils für die mRNA- und Proteinexpression getrennt und in deren Kombination miteinander durchgeführt. Bezüglich des PFS zeigte sich ein signifikant verzögerter Progress der Erkrankung bei Patientinnen mit positivem HER3 mRNA-Status ($P < 0,008$). Während Patientinnen mit positivem HER3 mRNA-Status nach 46,72 Monaten ein Rezidiv erlitten, war das bei Patientinnen mit negativem HER3 mRNA Status bereits nach 26,91 Monaten der

Fall. Bezüglich des Gesamtüberlebens ließ sich dieser Unterschied einer prognostisch relevanten positiven HER3 mRNA-Expression nur noch als Trend, jedoch ohne Signifikanz abbilden ($P=0,052$). Gleiche Überlebensanalysen wurden mit den Daten zur HER3 Proteinexpression durchgeführt; mit vergleichbarer Tendenz einer günstigen Prognose bei positiver HER3 Proteinexpression. Weder im PFS ($P=0,099$) noch im OS ($P=0,064$) zeigte sich dabei aber ein signifikanter Unterschied.

Zuletzt wurden die Ergebnisse der HER3 mRNA- und Proteinexpression kombiniert. Für Patientinnen mit komplett negativem HER3 Status definiert durch die negative Expression von HER3 in sowohl der Immunhistochemie als auch der qRT-PCR, konnten signifikant schlechtere Überlebensdaten hinsichtlich PFS ($P=0,004$) und OS ($P=0,002$) ermittelt werden. Das mittlere Gesamtüberleben der Patientinnen mit negativem HER3 Status war mit 42,75 Monaten nur in etwa halb so lang wie das Überleben der Patientinnen mit wenigstens einer positiven HER3 Expression in der IHC oder qRT-PCR. In einer durchgeführten multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich der kombinierte negative HER3 Status als unabhängiger prognostischer Biomarker für das Gesamtüberleben (HR 0,35; 95%CI 0,19-0,64; $P=0,001$).

3.2 CK5/6

CK5/6 wurde ausschließlich im HGSC-Kollektiv untersucht, es zeigte sich immunhistochemisch eine ausschließlich zytoplasmatische Färbung mit unterschiedlichem Verteilungsmuster innerhalb des Zellplasmas. Sichtbar wurden eine punktuell verstreute Färbung, eine gleichmäßig diffuse Färbung und in einigen Fällen eine streng im Grenzbereich von Tumor zum umliegenden Stroma lokalisierte Färbung. Die mit 66,1% meisten Tumoren ($n=142$) zeigten IRS Werte von 1 bis 9 und damit eine Färbung von schwacher bis mittlerer Intensität in einer variierenden Anzahl von Tumorzellen. 31,2% der Tumoren ($n=67$) waren mit einem IRS von 0 negativ für CK5/6, wohingegen eine geringe Anzahl von 2,8% der Tumoren ($n=6$) mit einem IRS von 12 stark positiv für CK5/6 war.

Die CK5/6 Proteinexpression korrelierte in durchgeführten Tests nicht mit dem Alter zum Zeitpunkt der Diagnose, dem Tumorstatus (pT), dem Nodalstatus (pN), dem FIGO-Stadium, dem Residualtumor nach Operation oder der durchgeführten Chemotherapie ($P>0,05$). Eine Assoziation bestand zwischen der Expression von CK5/6 und dem Östrogenrezeptor ER- α ($P=0,087$).

Weder bei fortlaufenden IRS-Werten noch bei definierten Cut-off Werten für den IRS zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Überleben (OS: $P=0,571$ und PFS: $P=0,366$). Auffällig bei Betrachtung der Kaplan-Meier-Kurven war jedoch die ausgeprägte Assoziation einer stark positiven CK5/6 Expression mit IRS-Werten von 12 und schlechten Überlebensraten.

In der Gruppe der Tumoren mit stark positiver CK5/6 Proteinexpression waren vier Tumoren ER- α positiv während zwei Tumoren ER- α negativ waren. ER- α Positivität war in insgesamt zwei Drittel der Fälle gegeben und dadurch definiert, dass sich mindestens 10% der Tumorzellen anfärben ließen. Schließlich wurden vier Gruppen für die Überlebensanalysen gebildet: ER- α positiv + CK5/6 positiv; ER- α negativ + CK5/6 positiv; ER- α positiv + CK5/6 negativ und ER- α negativ + CK5/6 negativ. Es zeigte sich ein signifikant schlechteres OS ($P=0,003$) und PFS ($P<0,001$) für die Patientinnen, deren Tumoren negativ für ER- α und stark positiv für CK5/6 waren. Es ist hervorzuheben, dass dieser Effekt bei alleinigem ER- α Status für das Gesamtüberleben ($P=0,047$) nicht so ausgeprägt beziehungsweise für das progressionsfreie Überleben ($P=0,147$) nicht signifikant war.

3.3 APOBEC3B

Die mRNA-Daten zeigten über alle histologischen Subtypen Werte von 3,670 bis 15,069 und einen signifikanten Unterschied in ihrer Verteilung (Kruskal-Wallis-Test, $P<0,0001$) mit der niedrigsten Expression im EC (Median 6,97) und der höchsten Expression im CCC (Median 9,44). Eine Korrelation zwischen den mRNA-Levels und bisher etablierten Prognosefaktoren konnte nicht festgestellt werden. Für die Überlebensanalysen wurde mithilfe des Cutoff Finders ein Cut-off von 10,12 bestimmt. Basierend auf diesem Cut-off waren 82,1% ($n=224$) der Tumoren im Kollektiv der HGSC negativ für APOBEC3B.

Sowohl im Zellkern als auch im Zellplasma zeigte sich die Expression von APOBEC3B, wobei die Färbung beider Kompartimente miteinander korrelierte (Spearman's-Test, $r=0,264$, $P<0,0001$). APOBEC3B positive Tumoren, definiert bei einem IRS von größer als 4, traten im HGSC in 28,6% der Fälle ($n=60$) für das nukleäre Kompartiment auf und in 21,4% der Fälle ($n=45$) für das Zellplasma. Die nukleäre und zytoplasmatische Expression von APOBEC3B auf Proteinebene war in den histologisch definierten Subtypen signifikant unterschiedlich verteilt (Chi²-Test, $P<0,0001$). Im HGSC war die Mehrheit der Tumoren nukleär und zytoplasmatisch negativ für APOBEC3B. Für die zytoplasmatische Färbung zeigte sich im LGSC, EC und CCC eine annähernde

Gleichverteilung hinsichtlich der APOBEC3B-Proteinexpression. Die Mehrheit im LGSC und CCC zeigte eine positive Kernfärbung.

Für die nukleäre Färbung zeigte sich keine Korrelation von APOBEC3B mit bisher etablierten Prognosefaktoren, wohingegen die zytoplasmatische Färbung mit dem Alter zum Zeitpunkt der Diagnose korrelierte (Mann-Whitney-U-Test, $P=0,001$).

In durchgeführten Überlebensanalysen zeigte sich, dass Patientinnen mit negativer APOBEC3B mRNA-Expression signifikant eher ein Rezidiv erlitten ($P=0,043$), wohingegen sich dieser Unterschied nicht mehr im Gesamtüberleben zeigte ($P=0,494$).

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse waren die APOBEC3B mRNA-Levels im HGSC ein unabhängiger Prognosefaktor für ein verlängertes PFS (HR 0,55; 95% CI 0,35-0,88; $P=0,012$). Bezüglich der Ergebnisse der IHC wurden Überlebensanalysen getrennt für die nukleäre und zytoplasmatische Färbung durchgeführt. Es zeigte sich lediglich für die zytoplasmatische Expression von APOBEC3B eine Tendenz als positiver Prognosefaktor für das PFS ($P=0,154$) und OS ($P=0,206$), nicht jedoch für die nukleäre Expression. Bei Kombination der Daten zeigte sich ein signifikant schlechteres Überleben für Patientinnen mit negativem APOBEC3B mRNA-Status und negativer Expression von APOBEC3B (zytoplasmatisch und nukleär) mit einem Rezidiv binnen 32,10 Monaten im Vergleich zu 52,56 Monaten bei Patientinnen mit positivem APOBEC3B Status ($P=0,039$).

Zwischen der zytoplasmatischen Expression von APOBEC3B und der Expression der TILs zeigte sich im Kollektiv der HGSC eine Korrelation unter Verwendung sowohl kontinuierlicher Daten für CD3 ($r=0,167$, $P=0,017$), CD8 ($r=0,176$, $P=0,020$) und PD-1 ($r=0,172$, $P=0,014$) als auch kategorisierter Daten für CD3 ($P=0,004$), CD8 ($P=0,010$), PD-1 ($P=0,007$) und PD-L1 ($P=0,003$). Bezüglich der nukleären Expression von APOBEC3B ließ sich keine Korrelation mit den TILs herstellen. Die APOBEC3B mRNA-Level korrelierten wiederum mit den folgenden TILs: CD3 ($r=0,280$, $P<0,0001$), CD4 ($r=0,186$, $P=0,023$), CD8 ($r=0,172$, $P=0,033$) und PD-1 ($r=0,244$, $P=0,001$). Im Falle einer positiven Expression von APOBEC3B auf mRNA-Ebene zeigten sich ebenso die TILs (CD3: $P<0,0001$, CD4: $P=0,046$, CD8: $P=0,035$ und PD-1: $P=0,014$) positiv exprimiert. Der APOBEC3B mRNA-Status zeigte sich in einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse mit den Variablen APOBEC3B mRNA, Alter (kontinuierlich), FIGO-Gruppe (I-II versus III-IV), Residualtumor (keiner versus vorhanden) und TILs (CD3, CD4, CD8, PD-1) als unabhängiger Prognosefaktor (HR 0,45; 95%CI 0,20-0,97; $P=0,042$) neben der FIGO-Gruppe und der CD4-Expression.

4. Diskussion

Die in den vorgestellten Studien untersuchten Biomarker haben zum Teil für sich genommen, zum Teil auch in Kombination mit anderen Markern, eine prognostische Relevanz bei Patientinnen mit high-grade serösem Ovarialkarzinom.

Im HGSC zeigte sich HER3 als positiver Prognosefaktor. Patientinnen mit positivem HER3 mRNA-Status lebten nahezu doppelt so lange ohne Tumorprogress verglichen mit Patientinnen mit negativem HER3 mRNA-Status. HER3 wurde bereits in anderen Studien im Ovarialkarzinom untersucht, mit zum Teil divergierenden Ergebnissen.^{46–48} Gemeinsam ist diesen Studien die fehlende differenzierte Betrachtung von HER3 in den histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms. Da diese aber molekular und klinisch unterschiedliche Erkrankungen⁴ mit einer diversen Expression von Biomarkern sind⁴⁹, kann die fehlende Differenzierung nach histologischen Subtypen die Diskrepanz der Ergebnisse erklären.

Sowohl die triple-negativen, für Progesteron-, Östrogen- und HER2-Rezeptoren negativen Mammakarzinome als auch high-grade seröse Ovarialkarzinome zeichnen sich durch ein ähnliches Mutationsspektrum mit Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *tp53* und *BRCA1/2*, einer hohen Anzahl an Kopienzahlvariationen (copy-number alterations) und Aberrationen im AKT3 und c-myc Weg aus.⁵ Als *basal-like* Karzinom werden dabei die Mammakarzinome bezeichnet, die zusätzlich CK5/6 exprimieren.

In der von uns durchgeführten Studie erwies sich die Kombination von CK5/6 und ER- α im HGSC als negativer Prognosefaktor mit Signifikanz im Gesamt- und progressionsfreiem Überleben. Eine kleine Gruppe von Patientinnen mit einer deutlich positiven Expression von CK5/6 und einer negativen ER- α Expression zeichnete sich durch das signifikant kürzeste Überleben aus. Corr et al.²⁵ gelangten in ihrer Studie zu gleichen Ergebnissen und vermuteten eine Analogie zur Situation im Mammakarzinom, in dem das *basal-like* Karzinom mit Positivität für CK5/6 und Negativität für ER- α eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aufweist. Es wird deshalb vermutet, dass CK5-positive Zellen im Ovarialkarzinom eine Art Krebsstammzellen mit langsamer Proliferation und deshalb Resistenz gegenüber Chemotherapeutika darstellen. Dies ist insofern interessant, da an einem Ovarialkarzinom erkrankte Patientinnen zumeist nicht am Primarius selbst, sondern am Rezidiv sterben- eben, weil bisherige Chemotherapeutika nicht dauerhaft wirksam greifen.

Deshalb sollte die Untersuchung nicht nur des primären Tumors, sondern ebenso des Rezidiv-Gewebes zunehmend Bestandteil kommender Forschung sein, um die im Verlauf der Tumorprogression auftretenden molekulargenetischen Veränderungen zu untersuchen und mögliche therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren. Genau dieser Ansatz wird unter anderem durch unsere Arbeitsgruppe im Rahmen des OCTIPS-Projekts (<http://www.octips.eu/>) verfolgt.

Aufgrund der zu Beginn unspezifischen Symptomatik der Patientinnen und der daraus resultierenden Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Tumorstadium kommt der Entwicklung von Biomarkern im Ovarialkarzinom eine besondere Bedeutung zu. Vor allem etabliert in der Diagnostik ist bisher CA-125, wobei dieser Marker vor allem der Verlaufsbeobachtung dient⁵⁰, da CA-125 auch bei anderen benignen⁵¹ und malignen⁵² Erkrankungen erhöht sein kann. Außerdem in der Diagnostik genutzt wird der *BRCA*-Status, als Hinweis für eine mögliche genetische Prädisposition der Patientin.⁵³

Dabei spielt nicht nur der Tumor selbst und die genetische Suszeptibilität der Patientin eine Rolle, sondern auch die Interaktion des Tumors mit dem umliegenden Gewebe und dem Immunsystem. So konnten zahlreiche Studien zeigen, dass bestimmte T-Zell-Populationen mit einem verbesserten Überleben im Ovarialkarzinom assoziiert sind.^{37–41} Die APOBEC-Enzyme sind Teil des Immunsystems und speziell APOBEC3B ist in mehreren Tumortypen als Mutationsquelle beschrieben.³⁵ In der von uns durchgeführten Studie konnten APOBEC3B mRNA-Level allein, als auch in Kombination mit der APOBEC3B-Proteinexpression als positiver Prognosefaktor vor allem für das progressionsfreie Überleben identifiziert werden. Zudem zeigte sich eine signifikante Korrelation von APOBEC3B mit den TILs, was zu der Vermutung führt, dass ein aktiviertes Immunsystem das Überleben bei Patientinnen mit HGSC positiv beeinflusst. In einer ebenfalls veröffentlichten Studie von Leonard et al.⁵⁴ konnte neben der Korrelation von APOBEC3B mit den TILs eine stärkere Korrelation von APOBEC3G mit den TILs und ein größerer Einfluss von APOBEC3G auf das Überleben gezeigt werden. Welches APOBEC-Enzym im HSGC prognostisch wertvoll ist und inwieweit dies überhaupt einen Stellenwert im Ovarialkarzinom hat, bleibt abzuwarten. Denn von einem robusten Prognosefaktor ist bei nur einem signifikanten Cut-off-Wert und aktuell divergierenden Studienergebnissen zu APOBEC3B nicht auszugehen.⁵⁵

5. Literaturverzeichnis

1. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, Waldeyer-Sauerland M. Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2017.
2. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/, based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017. (Accessed January 26, 2018 at https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/browse_csr.php?sectionSEL=21&pageSEL=sect_21_table.08.html)
3. Prat J. Staging Classification for Cancer of the Ovary, Fallopian Tube, and Peritoneum. *Int J Gynecol and Obst* 2014;124:1–5.
4. Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, Leung S, Bowen NJ, Ionescu DN, Rajput A, Prentice LM, Miller D, Santos J, Swenerton K, Gilks CB, Huntsman D. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: Implications for biomarker studies. *PLoS Med* 2008;12:1749–1760.
5. Heim D, Budczies J, Stenzinger A, Treue D, Hufnagl P, Denkert C, Dietel M, Klauschen F. Cancer beyond organ and tissue specificity: Next-generation-sequencing gene mutation data reveal complex genetic similarities across major cancers. *Int J Cancer* 2014;135:2362–2369.
6. Köbel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, Seidman JD, Gilks CB. Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2010;29:203–211.
7. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 2.0 2016, AWMF-Registernummer: 032/035OL. (Accessed January 29, 2018 at <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Ovarialkarzinom.61.0.html>)
8. Wagner U, du Bois A, Pfisterer J, Huober J, Loibl S, Lück H, Sehouli J, Groop M, Stähle A, Schmalfeldt B, Meier W, Jackisch C. Gefitinib in combination with tamoxifen in patients with ovarian cancer refractory or resistant to platinum-taxane based therapy-A phase II trial of the AGO Ovarian Cancer Study Group (AGO-OVAR 2.6). *Gynecol Oncol* 2007;105:132-137.
9. Smyth JF, Gourley C, Walker G, MacKean MJ, Stevenson A, Williams ARW, Al Nafussi A, Rye T, Rye R, Stewart M, McCurdy J, Mano M, Reed N, McMahon T, Vasey P, Gabra H, Langdon SP. Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: The use of letrozole in estrogen receptor-positive patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:3617–3622.
10. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, Reuss A, Poveda A, Kristensen G, Sorio R, Vergote I, Witteveen P, Bamias A, Pereira D, Wimberger P, Oaknin A, Mirza MR, Follana P, Bollag D, Ray-Coquard I. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2014;32:1302–1308.
11. Secord AA, Blessing JA, Armstrong DK, William H, Miner Z, Barnes MN, Lewandowski G, Mannel, RS. Phase II Trial of Cetuximab and Carboplatin in Relapsed Platinum- Sensitive Ovarian Cancer and Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 2008;108:493–499.
12. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, White DE, Wunderlich JR, Canevari S, Rogers-freezer L, Chen CC, Yang JC, Rosenberg SA, Hwu P. Cancer Therapy: Clinical A Phase I Study on Adoptive Immunotherapy Using Gene-Modified T Cells for Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:6106–6116.
13. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, Fendly BM, Cerione RA, Vandlen RL, Carraway KL. Coexpression of erbB2 and erbB3 Proteins reconstitutes a High Affinity Receptor for Heregulin. *J Biol Chem* 1994;269:14661–14665.

14. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000;19:3159–3167.
15. Liang J, Slingerland JM. Multiple Roles of the PI3K/PKB (Akt) Pathway in Cell Cycle Progression. *Cell Cycle* 2003;2:336-342.
16. Steffensen KD, Waldstrøm M, Andersen RF, Olsen DA, Jeppesen U, Knudsen, HJ, Brandslund I, Jakobsen A. Protein levels and gene expressions of the epidermal growth factor receptors, HER1, HER2, HER3 and HER4 in benign and malignant ovarian tumors. *Int J Oncol* 2008;33:195–204.
17. Makhija S, Amler, LC, Glenn D, Ueland FR, Gold MA, Dizon DS, Paton V, Lin CY, Januario T, Ng K, Strauss A, Kelsey S, Sliwkowski, MX, Matulonis U. Clinical Activity of Gemcitabine Plus Pertuzumab in Platinum-Resistant Ovarian Cancer, Fallopian Tube Cancer, or Primary Peritoneal Cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:1215–1223.
18. Cooper D, Schermer A, Sun TT. Classification of Human Epithelia and Their Neoplasms using Monoclonal Antibodies to Keratins: Strategies, Applications and Limitations. *Lab Investig* 1985;52:243–253.
19. Miettinen M. Keratin immunohistochemistry: update of applications and pitfalls. *Pathol Annual* 1993; 28: 113–143.
20. Attanoos RL, Webb R, Dojcinov SD, Gibbs AR. Value of mesothelial and epithelial antibodies in distinguishing diffuse peritoneal mesothelioma in females from serous papillary carcinoma of the ovary and peritoneum. *Histopathology* 2002;40:237–244.
21. Ordóñez NG. Value of Immunohistochemistry in Distinguishing Peritoneal Mesothelioma from Serous Carcinoma of the Ovary and Peritoneum: a review and update. *Adv Anat Pathol* 2006;13:16–25.
22. Comin CE, Saieva C, Messerini L. h-Caldesmon, Calretinin, Estrogen Receptor, and Ber-EP4: A Useful Combination of Immunohistochemical Markers for Differentiating Epithelioid Peritoneal Mesothelioma from Serous Papillary Carcinoma of the Ovary. *Am J Surg Pathology* 2007;31:1139–1148.
23. Kurmann RJ, Shih IM. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer- a Proposed Unifying Theory. *Am J Surg Pathol* 2010;34:433–443.
24. Chu PG, Weiss LM. Expression of Cytokeratin 5/6 in Epithelial Neoplasms: An Immunohistochemical Study of 509 Cases. *Mod Pathol* 2002;15:6–10.
25. Corr BR, Finlay-Schultz J, Rosen RB, Qamar L, Post MD, Behbakht K, Spillman MA, Sartorius CA. Cytokeratin 5-positive Cells Represent a Therapy Resistant subpopulation in Epithelial Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2015;25:1565–1573.
26. Nofech-Mozes S, Khalifa MA, Ismiil N, Saad RS, Hanna WM, Covens A, Ghorab Z. Immunophenotyping of serous carcinoma of the female genital tract. *Mod Pathol* 2008;21:1147–1155.
27. Perou CM, Sùrlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge I, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lùnning PE, Brown PO, Botstein D, Grant S. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747–752.
28. Leidy J, Khan A, Kandil D. Basal-Like Breast Cancer Update on Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:37–43.
29. Darb-Esfahani S, Wirtz RM, Sinn BV, Budczies J, Noske A, Weichert W, Faggad A, Scharff S, Sehoul J, Oskay-Özcelik G, Zamagni C, De Iaco P, Martoni A, Dietel M, Denkert C. Estrogen receptor 1 mRNA is a prognostic factor in ovarian carcinoma: Determination by kinetic PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Endocr Relat Cancer* 2009;16:1229–1239.
30. Aust S, Bachmayr-Heyda A, Pateisky P, Tong D, Darb-Esfahani S, Denkert C, Chekerov R, Sehoul J, Mahner S, van Gorp T, Vergote I, Speiser P, Horvat R, Zeillinger R, Pils D. Role of TRAP1 and estrogen receptor alpha in patients with ovarian cancer -A study of the OVCAD consortium. *Mol Cancer* 2012;11:69.
31. Moris A, Murray S, Cardinaud S. AID and APOBECs span the gap between innate and adaptive immunity. *Front Microbiol.* 2014;5:534.

32. Vieira VC, Soares MA. The role of cytidine deaminases on innate immune responses against human viral infections. *Biomed Res Int* 2013;2013:683095.
33. Lackey L, Demorest ZL, Land AM, Hultquist JF, Brown WL, Harris RS. APOBEC3B and AID have similar nuclear import mechanisms. *J Mol Biol* 2012;419:301–314.
34. Burns MB, Lackey L, Carpenter MA, Rathore A, Land AM, Leonard B, Refsland EW, Kotandeniya D, Tretyakova N, Nikas JB, Yee D, Temiz NA, Donohue DE, McDougale RM, Brown WL, Law E, Harris RS. APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature* 2013;494:366–370.
35. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SaJR, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Børresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjörd JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Illicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jäger N, Jones DTW, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, López-Otín C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt ANJ, Valdés-Mas R, van Buuren MM, van 't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR, Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond SM, Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ, Stratton MR. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500:415–421.
36. Leonard B, Hart SN, Burns MB, Carpenter MA, Temiz NA, Rathore A, Vogel RI, Nikas JB, Law EK, Brown WL, Li Y, Zhang Y, Maurer MJ, Oberg AL, Cunningham JM, Shridhar V, Bell DA, April C, Bentley D, Bibikova M, Cheetham RK, Fan JB, Grocock R, Humphray S, Kingsbury Z, Peden J, Chien J, Swisher EM, Hartmann LC, Kalli KR, Goode EL, Sicotte H, Kaufmann SH, Harris RS. APOBEC3B upregulation and genomic mutation patterns in serous ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2013;73:7222–7231.
37. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2003;348:203–213.
38. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *PNAS* 2005;102:18538–18543.
39. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, Higuchi T, Yagi H, Takakura K, Minato N, Honjo T, Fujii S. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *PNAS* 2007;104:3360–3365.
40. Darb-Esfahani S, Kunze CA, Kulbe H, Sehouli J, Wienert S, Lindner J, Budczies J, Bockmayr M, Dietel M, Denkert C, Braicu I, Jöhrens K. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget* 2015;7:1486–1499.
41. Marth C, Fiegl H, Zeimet AG, Müller-Holzner E, Deibl M, Doppler W, Daxenbichler G. Interferon- γ expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1598–1605.
42. Unger U, Denkert C, Braicu I, Sehouli J, Dietel M, Loibl S, Darb-Esfahani S. Prognostic impact of HER3 based on protein and mRNA expression in high-grade serous ovarian carcinoma. *Virchows Arch* 2017;470:143–151.
43. Taube ET, Denkert C, Sehouli J, Unger U, Kunze CA, Budczies J, Dietel M, Braicu E, Darb-Esfahani S. Cytokeratin 5/6 expression, prognosis and association with ER- α in high-grade serous ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2017;67:30–36.
44. Rüder U, Denkert C, Kunze CA, Jank P, Lindner J, Jöhrens K, Kulbe H, Sehouli J, Dietel M, Braicu E, Darb-Esfahani S. APOBEC3B protein expression and mRNA analyses in patients with high-grade serous ovarian carcinoma. *Histol Histopathol* 2019;34:405–417.

45. Budczies J, Klauschen F, Von Sinn B, Gyórfy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Denkert C. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS one* 2012;7:e51862.
46. Lee CH, Huntsman DG, Cheang MCU, Parker RL, Brown L, Hoskins P, Miller D, Gilks CB. Assessment of Her-1, Her-2, And Her-3 expression and Her-2 amplification in advanced stage ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2005;24:147–152.
47. Davies S, Holmes A, Lomo L, Steinkamp M, Kang H, Muller CY, Wilson BS. High incidence of ErbB3, ErbB4 and MET expression in ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* 2014;33:402–410.
48. Tanner B, Hasenclever D, Stern K, Schormann W, Bezler M, Hermes M, Brulport M, Bauer A, Schiffer IB, Gebhard S, Schmidt M, Steiner E, Sehouli J, Edelmann J, Lauter J, Lessig R, Krishnamurthi K, Ullrich A, Hengstler JG. ErbB-3 Predicts Survival in Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:4317–4323.
49. Köbel M, Kalloger SE, Carrick J, Huntsman D, Asad H, Oliva E, Ewanowich CA, Soslow RA, Gilks CB. A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. *The American journal of surgical pathology* 2009;33:14–21.
50. Rustin GJS, Nelstrop AE, Tuxen MK, Lambert HE. Defining progression of ovarian carcinoma during follow-up according to CA 125 : A North Thames Ovary Group study. *Ann Oncol* 1996;7:361–364.
51. Buamah, P. Benign conditions associated with raised serum CA-125 concentration. *J Surg Oncol* 2000;75:264–265.
52. Miralles C, Orea M, España P, Provencio M, Sánchez A, Cantos B, Cubedo R, Carcereny E, Bonilla F, Gea, T. Cancer Antigen 125 Associated With Multiple Benign and Malignant Pathologies. *Ann Oncol* 2002;10:150–154.
53. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DEC, Rosen B, Bradley L, Fan I, Tang J, Li S, Zhang S, Shaw PA, Narod SA. Population BRCA1 and BRCA2 Mutation Frequencies and Cancer Penetrances : A Kin – Cohort Study. *Journal of National Cancer Ins* 2006;98:1694–1706.
54. Leonard B, Starrett GJ, Maurer MJ, Oberg A, van Bockstal M, van Dorpe J, de Wever O, Helleman J, Sieuwerts AM, Berns EMJJ, Martens JWM, Anderson B, Brown WL, Kalli KR, Kaufmann SH, Harris RS. APOBEC3G expression correlates with T cell infiltration and improved clinical outcomes in high-grade serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2016;22:4746–4755.
55. Du Y, Tao X, Wu J, Huandi Y, Yinhua Y, Zhao H. APOBEC3B up-regulation independently predicts ovarian cancer prognosis: a cohort study. *Cancer Cell Int* 2018;78:1–10.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ulrike Rüder, geb. Unger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **HER3, CK5/6 und APOBEC3B als Biomarker in histologisch definierten Subtypen des Ovarialkarzinoms** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik und Resultaten werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit meiner Betreuerin, PD Dr. med. Silvia Darb-Esfahani, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Ulrike Rüder, geb. Unger, hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Unger U, Denkert C, Braicu I, Sehouli J, Dietel M, Loibl S, Darb-Esfahani S. Prognostic impact of HER3 based on protein and mRNA expression in high-grade serous ovarian carcinoma. *Virchows Arch* 2017;470:143–151.

Beitrag im Einzelnen:

- Literaturrecherche
- Durchführung der Immunhistochemie, Auswertung der Färbung
- Durchführung und Auswertung der quantitativen real-time PCR
- Aktualisierung der klinischen Parameter
- statistische Analysen, Erstellung der Tabellen und Abbildungen
- Verfassung, Einreichung, Revision des Manuskripts

Publikation 2:

Taube ET, Denkert C, Sehouli J, **Unger U**, Kunze CA, Budczies J, Dietel M, Braicu E, Darb-Esfahani S. Cytokeratin 5/6 expression, prognosis and association with ER- α in high-grade serous ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2017;67:30–36.

Beitrag im Einzelnen:

- Kollektiverweiterung: Einpflege klinischer und pathologischer Parameter
- Kollektiverweiterung: RNA-Isolierung für quantitative real-time PCR
- Korrekturlesen des Manuskripts

Publikation 3:

Rüder U, Denkert C, Kunze CA, Jank P, Lindner J, Jöhrens K, Kulbe H, Sehouli J, Dietel M, Braicu E, Darb-Esfahani S. APOBEC3B protein expression and mRNA analyses in patients with high-grade serous ovarian carcinoma. *Histol Histopathol* 2019;34:405–417.

Beitrag im Einzelnen:

- Literaturrecherche
- Testung des Antikörpers, Durchführung der Immunhistochemie, Auswertung der Färbung
- Durchführung und Auswertung der quantitativen real-time PCR
- Aktualisierung der klinischen Parameter
- statistische Analysen, Erstellung der Tabellen und Abbildungen
- Vortrag auf der Deutsche Gesellschaft für Pathologie (DGP)-Tagung (Berlin, 19.05.2016)
 - o U. Unger*, C. Denkert, C. A. Kunze, J. Lindner, K. Jöhrens, H. Kulbe, J. Sehouli, M. Dietel, E.I. Braicu, S. Darb-Esfahani: APOBEC3B on protein and gene expression is associated with survival in histologically defined subtypes of ovarian cancer (A-276)
- Verfassung, Einreichung, Revision des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Originalarbeiten als Promotionsleistung

(i) Prognostic impact of HER3 based on protein and mRNA expression in high-grade serous ovarian carcinoma

Unger U, Denkert C, Braicu I, Sehouli J, Dietel M, Loibl S, Darb-Esfahani S. Prognostic impact of HER3 based on protein and mRNA expression in high-grade serous ovarian carcinoma. *Virchows Arch* 2017;470:143–151.

<https://doi.org/10.1007/s00428-016-2050-6>

Seiten 26- 34

(ii) Cytokeratin 5/6 expression, prognosis and association with ER- α in high-grade serous ovarian carcinoma

Taube ET, Denkert C, Sehouli J, **Unger U**, Kunze CA, Budczies J, Dietel M, Braicu E, Darb-Esfahani S. Cytokeratin 5/6 expression, prognosis and association with ER- α in high-grade serous ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2017;67:30–36.

<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.03.020>

Seiten 36- 42

(iii) APOBEC3B protein expression and mRNA analyses in patients with high-grade serous ovarian carcinoma

Rüder U, Denkert C, Kunze CA, Jank P, Lindner J, Jöhrens K, Kulbe H, Sehouli J, Dietel M, Braicu E, Darb-Esfahani S. APOBEC3B protein expression and mRNA analyses in patients with high-grade serous ovarian carcinoma. *Histol Histopathol* 2019;34:405–417.

<https://doi.org/10.14670/HH-18-050>

Seiten 44- 56

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Publikation 1:

Unger U, Denkert C, Braicu I, Sehouli J, Dietel M, Loibl S, Darb-Esfahani S. Prognostic impact of HER3 based on protein and mRNA expression in high-grade serous ovarian carcinoma. *Virchows Arch* 2017;470:143–151.

Impact Factor 2,848

Publikation 2:

Taube ET, Denkert C, Sehouli J, **Unger U**, Kunze CA, Budczies J, Dietel M, Braicu E, Darb-Esfahani S. Cytokeratin 5/6 expression, prognosis and association with ER- α in high-grade serous ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2017;67:30–36.

Impact Factor 3,014

Publikation 3:

Rüder U, Denkert C, Kunze CA, Jank P, Lindner J, Jöhrens K, Kulbe H, Sehouli J, Dietel M, Braicu E, Darb-Esfahani S. APOBEC3B protein expression and mRNA analyses in patients with high-grade serous ovarian carcinoma. *Histol Histopathol* 2019;34:405–417.

Impact Factor 2,025

Danksagung

Hiermit möchte ich mich in erster Linie bei Frau PD Dr. med. Silvia Darb-Esfahani bedanken, die mir mein Promotionsthema zur Verfügung gestellt hat, immer für mich ansprechbar war und mich in meiner Arbeit stets exzellent unterstützt und zu immer neuen Herausforderungen motiviert hat.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Manfred Dietel, der mit seiner Leitung des Instituts für Pathologie an der Charité die strukturellen Voraussetzungen geschaffen hat, um mich als Doktorandin zu beschäftigen. Herrn Prof. Carsten Denkert, Leiter der AG für Translationale Tumorforschung, danke ich für die Schaffung eines angenehmen Arbeitsklimas und die interessanten Meetings.

Mein besonderer Dank gilt den Patientinnen, die sich entschlossen haben die Forschung zu unterstützen und damit auch diese Arbeit ermöglicht haben.

Dr. Eliane Taube danke ich für die Ko-Autorenschaft und die gute Zusammenarbeit. Ich möchte mich außerdem bei allen AG- Mitgliedern bedanken, die mir den Einstieg in die wissenschaftliche Arbeit so angenehm gemacht haben. Besonders für die Hilfe im Labor danke ich Sylwia Handzik, Paul Jank, Ines Koch, Judith Lindner, Barbara Meyer-Bartell und Petra Wachs. Außerdem danken möchte ich meinen Mitdoktorandinnen, Ivonne Kolaschinski, Mandy Stanske und Katharina Sychra, die im Labor zu treffen ich mich immer gefreut habe. Ich danke auch meinen Freunden, die immer an meiner Seite sind. Mein großer Dank gilt außerdem meiner ganzen Familie, die mir mein Studium ermöglicht hat und in jeder erdenklichen Hinsicht stets eine große Unterstützung ist.

Maik Rüder danke ich für die immerwährende Unterstützung, Geduld und Liebe und auch für die gemeinsamen Pausen, durch die ich immer wieder meine Motivation zum Weitermachen gefunden habe. Linus Rüder- danke, dass es dich gibt- du bereicherst mein Leben täglich.