

Aus dem
CharitéCentrum für Diagnostische und präventive
Labormedizin

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. David Horst

Habilitationsschrift

**“Evaluation prädiktiver und prognostischer
Biomarker in der Pathologie am Beispiel des
Mammakarzinoms und Pankreaskarzinoms”**

zur Erlangung der Lehrbefugnis für das Fach
Pathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Bruno Valentin Sinn

Eingereicht: März 2021

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachterin: Prof. Dr. Doris Mayr, München

2. Gutachter: Prof. Dr. Hans H. Kreipe, Hannover

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	4
2	Einleitung	5
2.1	Das Mammakarzinom - das klinische Problem	5
2.1.1	Epidemiologie	5
2.1.2	Subtypen des Mammakarzinoms	5
2.1.3	Therapieprädiktion im Mammakarzinom	5
2.1.4	Fragestellung	6
2.2	Das Pankreaskarzinom - das klinische Problem	8
2.2.1	Epidemiologie	8
2.2.2	Pathologie des Pankreaskarzinoms	8
2.2.3	Fragestellung	8
3	Eigene Arbeiten	9
3.1	SET _{ER/PR} - Ein Multigenassay für endokrine Sensitivität	9
3.1.1	Einleitung	9
3.1.2	Methoden	9
3.1.3	Ergebnisse	9
3.1.4	Diskussion	9
3.2	HLA I als prädiktiver und prognostischer Marker beim Mamma-karzinom .	19
3.2.1	Einleitung	19
3.2.2	Methoden	19
3.2.3	Ergebnisse	19
3.2.4	Diskussion	19
3.3	MUC1 als prädiktiver und prognostischer Marker beim Mamma-karzinom .	30
3.3.1	Einleitung	30
3.3.2	Methoden	30
3.3.3	Ergebnisse	30
3.3.4	Diskussion	31
3.4	TP53 Mutationen als prädiktiver Marker beim Pankreas-karzinom	41
3.4.1	Einleitung	41
3.4.2	Methoden	41
3.4.3	Ergebnisse	41
3.4.4	Diskussion	42
3.5	Stromaeigenschaften als prädiktive Marker beim Pankreas-karzinom	51
3.5.1	Einleitung	51
3.5.2	Methoden	51
3.5.3	Ergebnisse	51
3.5.4	Diskussion	52
4	Diskussion	60
5	Literatur	63
6	Danksagung	67

Sinn: Prädiktive und prognostische Biomarker beim Mamma- und Pankreaskarzinom 3

7 Erklärung 68

1 Abkürzungen

α -SMA	α -smooth muscle actin
BRCA1	Breast cancer associated 1
BRCA2	Breast cancer associated 2
CDH1	Cadherin 1
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
ER	Estrogen receptor
ERBB2	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
ESR1	Estrogen receptor 1
HE	Hämatoxylin und Eosin
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HR	Hazard ratio
HLA 1	Human leucocyte antigene class I
HLA-A, -B, -C	Human leucocyte antigene A, -B, -C
Ki-67	Kiel-67
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MUC1	Mucin 1
OR	Odds ratio
PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasia
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PCR	Polymerase chain reaction
pCR	Pathologic complete response
PD-L1	Programmed death-ligand 1
SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine
SET	Sensitivity to endocrine therapy
TILs	Tumor infiltrating lymphocytes
TP53	Tumor protein p53

2 Einleitung

2.1 Das Mammakarzinom - das klinische Problem

2.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Erkrankung der Frau und steht weltweit an zweiter Stelle der krebsbedingten Todesfälle [1]. In Deutschland wird bei Frauen für das Jahr 2016 eine Inzidenz von 112,2 (standardisierte Erkrankungsrate je 100.000) und eine Mortalität von 23,4 berichtet [2]. Bei Männern handelt es sich mit einer Inzidenz von 1,1 und Mortalität von 0,3 um eine seltene Erkrankung. Mammakarzinome treten mit einer familiären Häufung auf, wobei bei etwa 10 % der Fälle eine hereditäre Genese vorliegt [3] und insbesondere Keimbahnmutationen im *BRCA1*- oder *BRCA2*-Gen mit einem hohen Lebenszeitrisko assoziiert sind.

2.1.2 Subtypen des Mammakarzinoms

Mammakarzinom ist ein Sammelbegriff für klinisch und molekular heterogene Tumoren. Etwa 76 % der Karzinome zeigen in der histopathologischen Diagnostik eine nicht-spezielle histologische Differenzierung [4]. Der häufigste spezielle histologische Typ ist mit etwa 8 % das invasiv-lobuläre Karzinom, das durch Mutationen im *CDH1*-Gen mit Verlust des Zelladhäsionsmoleküls β -Catenin und ein diffus-infiltratives Wachstum gekennzeichnet ist [5]. Neben dem histologischen Typ richtet sich die Klassifikation nach dem Differenzierungsgrad [6] und nach der immunhistologischen Expression der Hormonrezeptoren Östrogen- (ER, kodiert durch das *ESR1*-Gen) und Progesteronrezeptor (PR, kodiert durch das *PGR*-Gen) [7] sowie des Wachstumshormonrezeptors HER2 (kodiert durch das *ERBB2*-Gen) [8]. Die Tumoren lassen sich so drei klinisch und therapeutisch divergierenden Gruppen zuordnen. 80 % der Tumoren sind hormonrezeptor-positiv mit Expression von ER und/oder PR, 23 % sind positiv für HER2 und 13 % gehören dem dreifach-negativen (triple-negativen) Subtyp an [9].

In grundlegenden Genexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass sich auch auf molekularer Ebene zuverlässig verschiedene Subtypen des Mammakarzinoms unterscheiden lassen [10, 11]. Es handelt sich dabei im Wesentlichen um die Subtypen *basal-like*, *luminal A*, *luminal B* und *HER2-enriched*. Die sogenannten intrinsischen Subtypen lassen sich, wenn auch nicht mit perfekter Übereinstimmung, immunphänotypisch nachvollziehen, wobei sich die meisten triple-negativen Tumoren dem *basal-like* Subtyp, die meisten ER-positiven Tumoren den luminalen Subtypen, und die HER2-positiven Tumoren dem *HER2-enriched* Subtyp zuordnen lassen. Auch unterscheidet sich die Landschaft der somatischen Mutationen innerhalb der molekularen Subtypen, und zwar mit vermehrter Häufigkeit von Mutationen im *PIK3CA*-Gen in den luminalen und vermehrter Häufigkeit von Mutationen im *TP53*-Gen in den basalen Tumoren [12].

2.1.3 Therapieprädiktion im Mammakarzinom

Die obige Klassifikation hat sowohl prognostische als auch therapeutische Relevanz, da hormonrezeptor-positive Mammakarzinome mit einer antihormonellen Therapie [13] und HER2-positive Tumoren mit einer anti-HER2-Therapie behandelt werden können [14].

Mit der Bestimmung des HER2- und Hormonrezeptorstatus stehen so effektive Methoden zur Verfügung, um Aussagen über das Ansprechen auf HER2- bzw. Hormontherapien treffen zu können [7, 8], da Tumoren, die eine Perturbation in einem dieser Mechanismen aufweisen, stark von den assoziierten biologischen Signalwegen abhängen. Für die verbleibenden Mammakarzinome, die sowohl für die Hormonrezeptoren als auch für HER2 negativ sind (triple-negativ), bleibt die zytotoxische Therapie die Grundlage der Systemtherapie.

Ein weiterer immunhistologischer Marker, der zur Abschätzung von Prognose und zur Therapieplanung herangezogen werden kann, ist der Proliferationsmarker Ki-67, der ein Maß für die Teilungsaktivität und Wachstumsrate liefern kann [15], wobei der Marker keine optimale Reproduzierbarkeit aufweist [16].

Während sich die Untersuchung von DNA-Veränderungen beim Mammakarzinom heute im Wesentlichen auf die Untersuchung von Amplifikationen des *ERBB2-Gens* [8] und von Mutationen im *ESR1-* [17, 18], *PIK3CA-* [19] oder *BRCA1/BRCA2-Gen* [20] beschränken, hat die transkriptom-basierte Analytik das biologische Verständnis von Mammakarzinomen maßgeblich geprägt und einen tiefen Einfluss auf das klinische Prozedere bei Patientinnen mit Mammakarzinomen [21]. So sind verschiedene kommerziell erhältliche Multigenassays verfügbar, die bei Patientinnen mit frühen, hormonrezeptorpositiven, HER2-negativen Mammakarzinomen die Prognose unter alleiniger endokriner (hormoneller) Therapie abschätzen und eine Entscheidungshilfe darstellen, ob auf eine ergänzende Chemotherapie verzichtet werden kann [22–24].

Die Vorhersage des Ansprechens auf eine zytotoxische Chemotherapie ist schwierig. Gründe hierfür sind in den im Gegensatz zu zielgerichteten Therapien multifaktoriellen Einflussgrößen zu suchen, die einer Sensitivität bzw. einer Resistenz gegenüber einer Chemotherapie zugrunde liegen können. Insbesondere gestaltet sich die Therapieprädiktion bei triple-negativen Karzinomen schwierig, da es sich um eine heterogene Gruppe von Tumoren handelt [25]. Als gemeinsame Faktoren eines besseren Ansprechens auf eine Chemotherapie konnten bislang Störungen der zellulären Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen identifiziert werden, etwa durch eine Mutation des *BRCA1-Gens* [26]. Als weiterer Marker kann die mittels der immunhistologischen Untersuchung bestimmte Proliferationsrate (Ki-67) dienen, wobei eine erhöhte Proliferation mit einem besseren Therapieansprechen verbunden ist [15]. In der Praxis ist der Marker jedoch von eingeschränktem Nutzen, da eine erhöhte Proliferation gleichzeitig mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Auch der intrinsische Subtyp ist mit dem Ansprechen auf Chemotherapie verbunden [27], wobei Tumoren vom basalen Typ besser auf eine Therapie ansprechen, aber gleichzeitig wiederum mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind.

Ein vielversprechender Marker sind die tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs), tumor-assoziierte Immunzellen, die sich sowohl im Tumorstroma als auch innerhalb der epithelialen Tumorzellnester zeigen [28]. Die prädiktive und prognostische Rolle von TILs konnte in zahlreichen Studien beschrieben werden [29]. Eine Besonderheit ist, dass die TILs auch innerhalb der triple-negativen Mammakarzinome mit einem besseren Therapieansprechen und mit gleichzeitig mit einer besseren Prognose assoziiert sind.

2.1.4 Fragestellung

Der erste Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich mit der Evaluation von Markern zur Vorhersage des Ansprechens

- auf die Chemotherapie innerhalb verschiedener Subtypen des frühen, mit kurativem Ansatz behandelten Mammakarzinoms mittels immunhistologischer und RNA-basierter Marker im Kontext neoadjuvanter Therapiestudien
- auf die antihormonelle Therapie beim fortgeschrittenen, mit palliativem Ansatz behandelten Mammakarzinom mittels kombinierter RNA- und DNA-basierter Biomarker

2.2 Das Pankreaskarzinom - das klinische Problem

2.2.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom steht weltweit an neunter Stelle der häufigsten bösartigen Erkrankungen der Frau und an zehnter Stelle bei Männern, stellt bei beiden Geschlechtern aber die vierthäufigste krebisbedingte Todesursache dar [1]. In Deutschland wird bei Frauen für das Jahr 2016 eine Inzidenz von 10,9 (je 100.000) und eine Mortalität von 10,1 berichtet [2], für Männer eine Inzidenz von 14,4 und eine Mortalität von 13,7.

2.2.2 Pathologie des Pankreaskarzinoms

Unter einem Pankreaskarzinom wird im Allgemeinen das duktaie Adenokarzinom des Pankreas verstanden, das seinen Ursprung in den Zellen des Ausführungssystems des exokrinen Pankreas nimmt. Demgegenüber stehen die seltenen, vom azinären Pankreasgewebe ausgehenden Azinuszellkarzinome und die neuroendokrinen Neoplasien des Pankreas [30]. Als Vorläuferläsionen der duktaien Adenokarzinome gelten pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN), wobei sich eine molekularpathologische PanIN-Karzinomsequenz nachvollziehen lässt [31]. Pankreaskarzinome sind histologisch heterogene Tumoren, die neben den eigentlichen epithelialen Tumorzellen auch Zellen der extrazellulären Matrix, Lymphozyten und Blutgefäße beinhalten. Insbesondere ist eine dichte desmoplastische Stromareaktion ein histopathologisch kennzeichnendes Merkmal [32]. Der Therapieansatz für lokal nicht-fortgeschrittene Pankreaskarzinome ist die Resektion des Tumors mit lokaler Lymphknotenextirpation und die adjuvante zytotoxische Therapie. Auch bei kurativem Behandlungsziel ist das Pankreaskarzinom mit einer ungünstigen Prognose behaftet [33]. Auf molekularer Ebene zeigen sich in etwa 90 % der Fälle Mutationen im *KRAS*-Gen, in etwa 70 % der Fälle im *TP53*-Gen und in jeweils 30 % Alterationen im *CDKN2A*- bzw. *SMAD4*-Gen [34]. Auf Ebene der RNA-Expression lassen sich zwei molekulare Subtypen definieren, ein klassischer Subtyp und ein basaler Subtyp, der interessanterweise Ähnlichkeiten mit den basalen Subtypen des Mamma- und auch des Harnblasenkarzinoms aufweist [34]. Neben der histopathologischen Differenzierung und der lokalen Tumorausdehnung gibt es derzeit keine etablierten pathologischen prognostischen Faktoren.

2.2.3 Fragestellung

Im zweiten Abschnitt der Arbeit werden Biomarker evaluiert zur Vorhersage des Ansprechens

- auf die Chemotherapie beim frühen, mit kurativem Ansatz behandelten Pankreaskarzinom mittels histologischer und immunhistologischer Methoden im Kontext adjuvanter Theapiestudien
- auf die Chemotherapie beim frühen, mit kurativem Ansatz behandelten Pankreaskarzinom mittels DNA-basierter Methoden im Kontext adjuvanter Theapiestudien

3 Eigene Arbeiten

3.1 SET_{ER/PR} - Ein Multigenassay für endokrine Sensitivität

Sinn et al. SET_{ER/PR}: a robust 18-gene predictor for sensitivity to endocrine therapy for metastatic breast cancer. npj Breast Cancer 2019 [35]

<https://doi.org/10.1038/s41523-019-0111-0>

Im Folgenden ist das Abstract der Originalarbeit wiedergegeben (Übersetzung durch den Autor).

3.1.1 Einleitung

„Beim metastasierten, hormonrezeptor-positiven, HER2-negativen (HR+/HER2-) Mammakarzinom besteht ein klinischer Bedarf, die Sensitivität gegenüber einer endokrinen Therapie vorauszusagen. Eine zielgerichtete RNA-Sequenzierung (RNAseq) bietet dabei das Potential, sowohl die transkriptionelle Aktivität als auch das Vorhandensein funktio-neller Mutationen zu untersuchen.“

3.1.2 Methoden

„Wir haben den SET_{ER/PR} Index entwickelt, um die Expression von Genen mittels Microarray-Probesets zu messen, die mit der Expression der Hormonrezeptoren (ESR1 und PGR) korreliert sind sich robust gegenüber präanalytischen und analytischen Einflüssen verhalten. Wir haben die Assoziation des SET_{ER/PR} Index mit dem klinischen Verlauf von 140 Patientinnen mit metastasiertem, HR+/HER2- Mammakarzinom getestet. Wir haben dann ein zielgerichtetes SET_{ER/PR} Assay mittels droplet-basierter, zielgerichteter RNAseq entwickelt, um die Expression von 18 informativen Genen und 10 Referenzgenen zu messen und gleichzeitig die Ligandenbindungsdomäne (LBD) des ESR1-Gens zu sequenzieren. Der Index wurde anhand residueller RNA von 53 Patientinnen getestet.“

3.1.3 Ergebnisse

„Höhere Werte des SET_{ER/PR} Index in Biopsien aus Metastasen waren prädiktiv für längeres progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS), wenn die Patientinnen eine endokrine Therapie als nächste Behandlung erhalten haben, auch nach Adjustierung für klinisch-pathologische Risikofaktoren (PFS: HR 0,534, 95 % CI 0,299 bis 0,955, p = 0,035; OS: HR 0,315, 95% CI 0,157 bis 0.631, p = 0,001). Eine mutierte ESR1-LBD wurde in acht von 53 (15 %) der Metastasen gefunden und betraf 1 bis 98 % der ESR1-Transkripte (alle diese Fälle hatten hohe SET_{ER/PR} -Werte).“

3.1.4 Diskussion

„Eine Genesignatur, die auf Messungen von Genen mit einer guten präanalytischen und analytischen Reproduzierbarkeit beruht, ermöglichte uns, ein zielgerichtetes, akkurates RNAseq Assay zu entwickeln, das die Untersuchung des Phänotyps und Genotyps ER-assoziierter Transkription erlaubt. Höhere Werte von SET_{ER/PR} waren mit einer längeren

Sensitivität gegenüber endokriner Therapie bei Patientinnen mit metastasiertem, HR+/HER2-Mammakarzinom verbunden, insbesondere bei Fehlen mutierter ESR1-Transkripte.“

3.2 HLA I als prädiktiver und prognostischer Marker beim Mammakarzinom

Sinn et al. **Human leucocyte antigen class I in hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer: association with response and survival after neoadjuvant chemotherapy** Breast Cancer Research 2019 [36]
<https://doi.org/10.1186/s13058-019-1231-z>

Im Folgenden ist das Abstract der Originalarbeit wiedergegeben (Übersetzung durch den Autor).

3.2.1 Einleitung

„Die klinische Anwendung einer Immuntherapie in der Onkologie erfordert ein besseres Verständnis der Tumorummunogenität und des Mikromilieus des Tumors. HLA-Moleküle der Klasse I präsentieren Antigene gegenüber zytotoxischen, CD8+ T-Zellen. Ihr Verlust oder die Herunterregulation kann häufig in Tumoren beobachtet werden und resultiert in einer reduzierten T-Zellantwort und schlechteren Prognose.“

3.2.2 Methoden

„Wir haben die Expression von HLA Klasse I mittels Immunhistologie in 863 Biopsien untersucht (GeparTrio-Studie). Die Patientinnen wurden mittels neoadjuvanter Chemotherapie und adjuvanter endokriner Therapie behandelt, wenn die Tumoren hormonrezeptorpositiv waren (HR+). Außerdem wurde die Expression von HLA-A in einer Mikroarray-Kohorte von 320 Patientinnen untersucht, die am MD Anderson Cancer Center behandelt wurden. Wir haben die Assoziation mit dem klinischen Verlauf, tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) und Immunzellmetagenen untersucht.“

3.2.3 Ergebnisse

„In HR+/HER2-Mammakarzinomen war die Expression von HLA Klasse I mit vermehrten TILs und einem besseren Ansprechen gegenüber der Chemotherapie verbunden (7% vs. 14% pCR-Rate, $P = 0,029$), aber kürzerem krankheitsfreien Überleben (Hazard-Ratio (HR) 1,61 (1,1–2,4); $P = 0,024$). Ein signifikanter Effekt konnte auch in einem für klinische und pathologische Variablen adjustierten multivariablen Modell beobachtet werden (HR 1,7 (1,1–2,6); $P = 0,016$) und konnte in der Analyse der Expression von HLA-A in der Mikroarray-Kohorte bestätigt werden. HLA-A war mit allen Immunzell-Metagenen korreliert. Es gab keinen Zusammenhang mit dem Therapieansprechen oder dem Überleben im triple-negativen oder HER2+ Mammakarzinom.“

3.2.4 Diskussion

„Die Studie bestätigt die negative prognostische Rolle tumorinfiltrierender Lymphozyten im HR-positiven Mammakarzinom und deutet auf eine komplexe Interaktion zwischen Chemotherapie, endokriner Therapie und Tumorummunogenität hin. Die Ergebnisse deuten auf eine subtyp-spezifische und potentiell behandlungs-spezifische Rolle tumorimmu-

nologischer Prozesse im Mammakarzinom hin mit unterschiedlicher Implikation für triple-negative und hormonrezeptor-positive Karzinome.“

3.3 MUC1 als prädiktiver und prognostischer Marker beim Mammakarzinom

Sinn et al. **Evaluation of Mucin-1 protein and mRNA expression as prognostic and predictive markers after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer** *Annals of Oncology* 2013 [37] <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt162>

Im Folgenden ist der Inhalt der Originalarbeit zusammengefasst dargestellt.

3.3.1 Einleitung

Mucin-1 (MUC1) ist ein auf der apikalen Zellmembran von Epithelien exprimiertes Glykoprotein und eine Expression ist in normalen Epithelien, im Mammakarzinom und anderen Karzinomen beschrieben [38]. Aufgrund seiner extrazellulären Domäne, seiner abberanten Expression, Glykosylierung und Lokalisation in Karzinomen könnte MUC1 neben seinem Einfluss auf intrazelluläre Signalwege eine Rolle in tumorimmunologischen Prozessen und als mögliches molekulares Target spielen [39]. Therapieansätze sind in Form von Tumor-Vakzinen in klinischer Erprobung. In einer kürzlich veröffentlichten Phase I Studie konnte die Sicherheit einer Vakzinierungsstrategie gezeigt werden, die auch gegen MUC1 gerichtet ist [39]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MUC1 eine Expression des Immuncheckpunkt-Proteins PD-L1 induzieren kann [40]. Dies ist im Zusammenhang mit momentanen Therapieansätzen mittels PD-L1 Inhibition im triple-negativen Mammakarzinom relevant [41]. Ziel der Studie war die Evaluation der MUC1-Expression als prädiktiver und prognostischer Marker im Mammakarzinom nach neoadjuvanter Chemotherapie.

3.3.2 Methoden

Die Expression von MUC1 wurde innerhalb der neoadjuvanten *GeparTrio Studie* [42] mittels Immunhistologie (N = 691) und an den gleichen Proben auch mittels quantitativer RT-PCR aus Paraffingewebe (N = 286) untersucht.

3.3.3 Ergebnisse

Die meisten Fälle (95 %) waren immunhistologisch zumindest fokal positiv. Es wurden dann zwei Gruppen mit hoher (70 %) und niedriger Expression definiert. Die Expression von MUC1 war mit einem positiven Hormonrezeptorstatus, niedrigem histopathologischen Grading und lobulärer Histologie assoziiert. Eine hohe Expression von MUC1-Protein war mit einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit einer pathologischen Komplettremission nach neoadjuvanter Therapie verbunden, und zwar in der gesamten Studienkohorte (MUC1 niedrig vs. MUC1 hoch: OR 0,42 (95 % Konfidenzintervall 0,29–0,62); $P < 0,001$) und innerhalb hormonrezeptor-positiver, HER2-negativer/hormonrezeptor-positiver und HER2-negativer Karzinome. Mittels mRNA Analyse konnte der Zusammenhang bestätigt werden (Kontinuierliche mRNA Expression: OR 0,66 (95 % Konfidenzintervall 0,56–0,78); $P < 0,001$). In einer multivariaten Analyse waren sowohl die mRNA als auch die Proteinexpression unabhängige prädiktive Marker für das Therapieansprechen. MUC1 war auf Ebene der mRNA, nicht aber auf Proteinebene, mit einem längeren rezidivfreien Überleben

verbunden, sowie auf beiden biologischen Ebenen mit einem längeren Gesamtüberleben (MUC1 hoch vs. MUC1 niedrig: HR 0,39 (95 % Konfidenzintervall 0,17–0,91); $P = 0,029$ bzw. kontinuierliche mRNA Expression: HR 0,74 (95 % Konfidenzintervall 0,59–0,91); $P = 0,005$).

3.3.4 Diskussion

Die Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, in denen die Expression von MUC1 zumeist mit einem längeren Überleben verbunden war [43–45]. Dies liegt möglicherweise auch an der Assoziation mit günstigen Prognosefaktoren wie positivem Hormonrezeptorstatus und niedrigem Grading, wobei die Zusammenhänge in unserer Studie auch innerhalb der hormonrezeptor-positiven Tumoren und in einer multivariaten Analyse sichtbar waren. Ein zusätzlicher Effekt könnte aus immunogenen Eigenschaften resultieren, die insbesondere aberrant glykosylierten MUC1-Epitopen zugesprochen werden [38]. In diesem Zusammenhang könnte MUC1 eine Immunantwort induzieren, die möglicherweise durch die neoadjuvante Therapie potenziert bzw. erst ausgelöst wird. Inwieweit eine MUC1-Expression eine immunomodulatorische Therapie beeinflusst, muss in ergänzenden Studien mit entsprechenden Therapien gezeigt werden.

3.4 TP53 Mutationen als prädiktiver Marker beim Pankreaskarzinom

Sinn et al. **TP53 Mutations Predict Sensitivity to Adjuvant Gemcitabine in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Next-Generation Sequencing Results from the CONKO-001 Trial.** *Clinical Cancer Research* 2020 [46]
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3034>

Im Folgenden ist der Inhalt der Originalarbeit zusammengefasst dargestellt.

3.4.1 Einleitung

Die in Pankreaskarzinomen anzutreffenden Mutationen wurden in großen Studien beschrieben [34]. Dabei werden Mutationen im *KRAS*-Gen in etwa 90 %, im *TP53*-Gen in etwa 70 %, im *CDKN2A*- und im *SMAD4*-Gen in jeweils etwa 30 % beobachtet. Mutationen in anderen Genen kommen hingegen mit niedrigeren Frequenzen vor. Der Einfluss dieser molekularen Veränderungen auf Prognose und Therapieansprechen wurde noch nicht systematisch untersucht. In der Phase III-Studie CONKO-I konnte ein Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie mit Gemcitabine nach Operation mit kurativem Ansatz gezeigt werden [47]. Aufgrund des Studiendesigns mit einem Behandlungs- und Beobachtungsarm bildet die Studie einen guten Ausgangspunkt für translationale Forschungsprojekte, da Biomarker im Hinblick auf Prognose und Prädiktion des Therapieansprechens getrennt betrachtet werden können.

In der vorliegenden Arbeit haben wir eine zielgerichtete DNA-Sequenzierung an formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben der CONKO-I Studie durchgeführt. Ziel war die Analyse der Assoziation verschiedener Mutationen mit Therapieansprechen und Patientinnen-/Patientenüberleben.

3.4.2 Methoden

Von den 354 Patientinnen/Patienten der Studienpopulation stand Material von 146 für die Studie zur Verfügung. Aus dem Paraffingewebe wurde DNA isoliert und eine Sequenzierung mittels Next Generation Sequencing und einem Genpanel von 37 Genen durchgeführt, das die am häufigsten alterierten Gene im Pankreaskarzinom abdeckt. Aufgrund mitunter nicht optimaler Probenqualität haben wir konservative Filter für die Detektion von Varianten angewendet, um die Datenqualität und Verlässlichkeit unter Inkaufnahme einer verminderten Sensitivität zu erhöhen. Ergänzend wurden Daten eines öffentlich verfügbaren Datensatzes [34] verwendet, um eine differentielle Genexpressionsanalyse entsprechend des *TP53*-Mutationsstatus durchzuführen.

3.4.3 Ergebnisse

Insgesamt konnten 101 Proben erfolgreich und mit guter Datenqualität untersucht werden. Am häufigsten waren Mutationen in den Genen *KRAS* (75 %), *TP53* (60 %), *SMAD4* (10 %) und *CDKN2A* (9 %). Die meisten der Tumoren mit *TP53*-Mutationen wiesen eine einzelne Mutation auf, in 12 % waren mehrere Mutationen im *TP53*-Gen vorhanden.

Im Beobachtungsarm waren *TP53*-Mutationen mit schlechterem progressionsfreiem Überleben (Mutation vs. Wildtyp: HR 2,43 (95 % Konfidenzintervall 1,32–4,51); P =

0,005) und Gesamtüberleben verbunden. Interessanterweise konnte für die Subgruppe der Patientinnen/Patienten mit *TP53*-mutierten Tumoren ein längeres krankheitsfreies Überleben bei Behandlung mit Gemcitabine gezeigt werden (Gemcitabine vs. Beobachtung: HR 0,24 (95 % Konfidenzintervall 0,13–0,42); $P < 0.001$), während bei Patientinnen/Patienten mit *TP53*-wildtypischen Tumoren kein unterschiedliches Überleben in Behandlungs- bzw. Beobachtungsarm gezeigt werden konnte. In einer ergänzenden Untersuchung anhand eines öffentlich verfügbaren Datensatzes fiel in *TP53*-mutierten Tumoren eine höhere Expression von den Genen auf, die eine Schlüsselrolle in der Regulation der Glykolyse einnehmen. Der *TP53*-Mutationsstatus war hier in diesem unabhängigen Datensatz ein negativer prognostischer Marker für das krankheitsfreie, nicht aber das Gesamtüberleben, wobei Informationen zur adjuvanten Behandlung nicht verfügbar waren.

3.4.4 Diskussion

Zusammengefasst haben Patientinnen/Patienten mit *TP53*-mutierten Tumoren eine schlechtere Prognose im Beobachtungsarm, aber einen deutlichen Vorteil durch die Behandlung mit Gemcitabine. Unsere Daten deuten darauf hin, dass der *TP53*-Mutationsstatus ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine adjuvante Therapie sein könnte. In einer ergänzenden Genexpressionsanalyse beobachteten wir eine differentielle Regulation der Glykolyse in *TP53*-mutierten Tumoren als Hinweis auf einen erhöhten Stoffwechsel. Ein ähnlicher Zusammenhang ist auch beim Mammakarzinom beschrieben [48]. Inwieweit die Ergebnisse einen Einfluss auf die Behandlung von Patientinnen/Patienten mit Pankreaskarzinomen haben könnten und wie der *TP53*-Mutationsstatus mit dem Ansprechen auf modernere Chemotherapieregime assoziiert ist, muss in zukünftigen Studien validiert bzw. untersucht werden.

3.5 Stromaeigenschaften als prädiktive Marker beim Pankreaskarzinom

Sinn et al. **Alpha-Smooth muscle actin expression and desmoplastic stromal reaction in pancreatic cancer: results from the CONKO-001 study**. British Journal of Cancer 2014 [49] <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.495>

Im Folgenden ist der Inhalt der Originalarbeit zusammengefasst dargestellt.

3.5.1 Einleitung

Das dichte desmoplastische Stroma ist ein histologisches Merkmal von Pankreaskarzinomen. Es wird angenommen, dass die extrazelluläre Matrix von Myofibroblasten produziert wird, die ihrerseits von den epithelialen Tumorzellen induziert werden [50]. Das dichte Stroma wird als mechanische Barriere verstanden, die einerseits den Zugang chemotherapeutischer Substanzen erschwert, andererseits einer Infiltration durch Immunzellen entgegenwirken könnte [32].

Deshalb gilt das Stroma als mögliches therapeutisches Ziel. Ein Ansatz ist beispielsweise die Behandlung mit Hyaluronidase, was jedoch zu keinem Vorteil in der Kombination mit Gemcitabine geführt hat [32]. Auch andere Ansätze, wie die Inhibition von in der Stromainduktion beteiligten Signalwegen, haben sich als nicht erfolgreich erwiesen [32]. Dass es sich hier um ein komplexes Phänomen handelt, zeigt sich nicht nur in klinischen Studien, sondern auch experimentell. Im Mausmodell führt eine experimentelle Verminderung der Stromainduktion zu vermehrter Metastasierung und einem kürzeren Überleben [51].

Ein besseres Verständnis der extrazellulären Matrix ist notwendig, um neue Konzepte zur Therapieoptimierung zu unterstützen.

Ziel der vorliegenden Studie war die Charakterisierung des peritumoralen Stromas im Pankreaskarzinom. Dazu wurde die Stromadichte und die Expression des myofibroblastären Markers α -SMA immunhistologisch an Tumoren von Patientinnen/Patienten untersucht, die im Rahmen der adjuvanten Studie CONKO-1 behandelt worden sind.

3.5.2 Methoden

Die Beurteilung von Stromadichte und α -SMA Immunhistologie erfolgte an Gewebearrays von 162 Tumoren. Negative und schwache Positivität bzw. moderate und starke Färbeintensität wurden für die folgenden Analysen gruppiert. Die Stromadichte wurde anhand HE-gefärbter histologischer Präparate evaluiert und in drei Gruppen eingeteilt: lockeres Stroma mit myxoidem Aspekt, dichtes Stroma mit flächenhaft und dicht liegenden, festen Faserbündeln sowie eine Zwischenkategorie mittlerer Dichte. Der Zusammenhang beider Parameter mit den klinischen und pathologischen Charakteristika und dem progressionsfreien bzw. Gesamtüberleben wurde untersucht.

3.5.3 Ergebnisse

Insgesamt konnten 160 Fälle ausgewertet werden. Die stromale Expression von α -SMA war in 17 % der Fälle negativ oder schwach positiv, in 83 % der Fälle moderat oder stark positiv. Die Stromaqualität wurde in 28 % als locker, in 61 % als moderat und in 11 % als dicht bewertet.

Stromales α -SMA oder die stromale Dichte zeigten keine signifikante Assoziation mit pathologischen oder klinischen Charakteristika (pT, pN, R-Status, Grading).

Negatives/schwaches α -SMA war mit längerem Gesamtüberleben verbunden (α -SMA niedrig vs. hoch: medianes krankheitsfreies Überleben 13,8 vs. 10,1 Monate; $P = 0,05$ und Gesamtüberleben 28,0 vs. 20,2 Monate; $P = 0,047$). Innerhalb der beiden Arme (Gemcitabine vs. Beobachtung) konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

Dichtes Stroma war mit einem längeren krankheitsfreien und Gesamtüberleben verbunden (medianes krankheitsfreies Überleben, lockeres vs. moderates vs. dichtes Stroma: 12,8 vs. 8,5 vs. 29,0 Monate; $P < 0,001$ und für das Gesamtüberleben: 28,0 vs. 18,5 vs. 46,00 Monate; $P < 0,001$), wobei der Effekt nur in der Gruppe der unbehandelten Patienten beobachtet wurde. Unter Therapie mit Gemcitabine fand sich keine prognostische Assoziation.

3.5.4 Diskussion

Zusammengefasst war ein dichteres Stroma (und höhere Expression von α -SMA) bei unbehandelten Patientinnen/Patienten mit einem längeren Überleben verbunden, sodass ein dichtes desmoplastisches Stroma im natürlichen Verlauf der Erkrankung ein günstiger prognostischer Faktor sein könnte. Dass eine dichte Stromareaktion mit einem schlechteren Ansprechen auf eine zytotoxische Therapie verbunden ist, konnte nicht gezeigt werden.

Der Nachweis einer negativen prognostischen Assoziation von α -SMA mit dem Überleben deckt sich mit vorangegangenen Studien [52], und auch andere stroma-assoziierte Marker wie SPARC sind mit kürzerem Überleben verbunden [53].

Die Studie unterstreicht den biologischen Einfluss der extrazellulären Matrix im Pankreaskarzinom und deutet auf ein komplexes Wechselspiel zwischen epithelialen und stromalen Tumorbestandteilen hin, deren besseres Verständnis eine Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz stroma-modifizierender Therapien ist.

4 Diskussion

Die Arbeit beschäftigt sich mit der Evaluation von prädiktiven und prognostischen Biomarkern im Mammakarzinom und im Pankreaskarzinom, zumeist im Rahmen von neoadjuvanten oder adjuvanten Therapiestudien. Ein wichtiger Aspekt der Arbeit ist die Verwendung von formalin-fixiertem, in Paraffin eingebetteten Gewebe, da dieses Gewebe als Standard der diagnostischen Pathologie die Arbeit auch mit älteren Studienkollektiven ermöglicht, aus denen wertvolle Informationen abgeleitet werden können. Die immunhistologische Untersuchung erlaubt dabei eine Lokalisation der Proteinexpression auf Gewebe- und subzellulärer Ebene. Die Analyse der mRNA erlaubt demgegenüber eine quantitative Messung zur Detektion auch kleinerer, möglicherweise biologisch relevanter Unterschiede.

Der erste Abschnitt widmet sich dem Mammakarzinom. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung von Markern mit potenziellen tumorimmunologischen Eigenschaften wie Mucin 1 als möglicher verstärkender Faktor einer Immunantwort und HLA 1 als Teil des Antigenpräsentationsmechanismus [36, 37]. Hierbei konnten wir zeigen, dass die Expression von HLA 1 bei Patientinnen mit hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom mit besserem Therapieansprechen und kürzeren Überleben assoziiert ist. Die Expression von Mucin 1 war mit einem schlechteren Therapieansprechen, aber längerem Überleben verbunden. Da sich bei der Betrachtung von HLA1 ein ähnlicher Effekt zeigt wie bei der Betrachtung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten selbst, stellt die Expression von HLA 1 offenbar einen relevanten Parameter zur Charakterisierung des immunologischen Infiltrats dar. Das Überleben bei Patientinnen mit hormonrezeptor-positivem, HER2-negativen Mammakarzinom hängt von der Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber der neoadjuvanten Chemotherapie, von der endokrinen Therapie und der natürlichen Tumorbilogie ab. Da das Ansprechen auf die Chemotherapie in Tumoren mit hoher HLA-Expression besser war, haben wir die Hypothese aufgestellt, dass ein kürzeres progressionsfreies Überleben auf eine Interaktion zwischen Immunsystem und der endokrinen Therapie zurückzuführen sein könnte. Die beschriebene Assoziation der Mucin 1 Expression mit klinischen Endpunkten deutet auf andere Zusammenhänge hin, wie die Assoziation mit einem östrogenrezeptor-positiven Phänotyp. Besonders im Kontext aktueller Therapiestudien mit Immuncheckpunkt-Inhibitoren bleibt die Charakterisierung tumorimmunologischer Prozesse ein relevantes Forschungsgebiet [41]. Inwieweit die beschriebenen Biomarker im Kontext von immunomodulatorischen Therapien der Vorhersage des Therapieansprechens dienen können, werden Studien in einem entsprechenden Kontext zeigen.

Die Beschreibung von SET_{ER/PR} geht über die Beurteilung einzelner Marker auf Ebene der mRNA hinaus [35]. SET_{ER/PR} ist ein Multigenassay für die Vorhersage des Therapieansprechens auf eine endokrine Therapie beim metastasierten Mammakarzinom.

Neben der Aktivität östrogen- und progesteron-assoziiierter Genexpression wurden gleichzeitig auch Mutationen in der Ligandenbindungsdomäne des *ESR1*-Gens betrachtet. Diese kommen in primären Mammakarzinomen selten vor [17, 18, 54]. Häufiger sind sie in rezidivierten oder metastasierten Mammakarzinom anzutreffen, insbesondere nach Therapie mit Aromataseinhibitoren. Mutationen führen zu einer konsekutiven Aktivität des Östrogenrezeptors und vermitteln so eine Resistenz gegenüber antihormoneller Therapie. Solche Patientinnen könnten von selektiven östrogenrezeptor-degradierenden Substanzen neuerer Generation (etwa Fulvestrant) profitieren [55]. In unserer Studie war das Auftreten

von Mutationen im *ESR1*-Gen mit höheren Expressionswerten von SET_{ER/PR} assoziiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die transkriptionale Aktivität der Hormonrezeptoren, und gleichzeitig auch das Auftreten von *ESR1*-Mutationen betrachtet werden sollten.

Neben der klinischen Relevanz lag ein besonderer Schwerpunkt bei der Signaturentwicklung auf der Reproduzierbarkeit, weshalb Datensätze zur Beurteilung verschiedener Quellen technischer und biologischer Variabilität herangezogen worden sind, unter anderen auch die Beurteilung der intratumoralen Heterogenität der Genexpression. So konnte eine wenige Gene umfassende, robuste Gensignatur entwickelt werden, die erfolgreich in eine RNA-Sequenzierung überführt werden konnte [56]. Die Arbeit zeigt damit auf, wie Wissen über die Reproduzierbarkeit von Assays schon bei deren Entwicklung berücksichtigt werden können und beschreibt ein Modell für die zukünftige Signaturentwicklung. Weiterhin wird gezeigt, wie ein modernes Assay sowohl die Expression ausgewählter Gentranskripte, als auch funktionell relevante Mutationen untersuchen kann.

Die Messung der mRNA ist heutzutage eine in der Routinediagnostik verwendete Methode, die in Form von Genexpressionstests beim Mammakarzinom in der klinischen Anwendung ist [21]. Diese Tests, die der Abschätzung der Prognose unter endokriner Therapie beim frühen, hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom dienen, sind ein gutes Beispiel, wie die Analyse des Transkriptoms mittels RNA Microarrays das biologische Verständnis von Mammakarzinomen geprägt hat. Dass diese Technologie auch heute noch erfolgreich genutzt werden kann, um klinisch relevante Probleme zu beantworten, zeigt das Beispiel SET_{ER/PR} [35].

Derzeitiger Forschungsschwerpunkt im Bereich des Mammakarzinoms kombiniert obige Ansätze, indem untersucht wird, inwieweit immun-assoziierte Genexpression mittels RNA-Sequenzierung das Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie mit und ohne Immuncheckpunktblockade beeinflussen [57]. Weiterhin werden Studien zur intratumoralen Heterogenität durchgeführt, um zu beleuchten, wie sich die intratumorale Heterogenität des Immunzellinfiltrats und der Genexpression im Hinblick auf Therapieansprechen und Prognose verhält, z.B. in Bezug auf die intratumorale Heterogenität der molekularen Subtypen und der Aktivierung alternativer Signalwege in verschiedenen Tumorebenen. Das Ansprechen auf die Chemotherapie beim Mammakarzinom ist ein multifaktorielles Geschehen, beeinflusst beispielsweise von der Proliferationsaktivität [15] und dem Ausmaß des lymphozytären Infiltrats [29]. Ziel ist die Identifikation weiterer biologischer Faktoren, die über die intertumorale Heterogenität hinweg gelten, damit letztlich ein umfassender Blick auf die Tumorbiologie und eine optimierte, personalisierte Therapieplanung gelingen kann.

Auch beim Pankreaskarzinom wurde im zweiten Abschnitt der Arbeit die Interaktion zwischen Tumorzellen und Zellen der extrazellulären Matrix betrachtet, hier in Form der Qualitätsbeurteilung der desmoplastischen Stromareaktion. Die Stromaqualität und auch die Expression des myofibroblastären Markers α -SMA waren bei unbehandelten Patientinnen/Patienten mit einem längeren Überleben verbunden [49]. Es konnte aber kein negativer prädiktiver Effekt der dichten Stromareaktion auf das Ansprechen auf die Chemotherapie gezeigt werden. Dies deutet auf ein komplexes Wechselspiel zwischen stromalen und epithelialen Tumoranteilen hin, das über die mechanistische Vorstellung einer mechanischen Barriere hinausgeht.

In unserer Mutationsanalyse der CONKO-1 Studie konnten wir eine umfassende Mutationsanalyse im Rahmen einer klinisch annotierten und gut charakterisierten Studien-

kohorte durchführen [46]. Wir konnten zeigen, dass Mutationen im TP53-Gen bei unbehandelten Patientinnen/Patienten mit einer schlechteren Prognose verbunden sind. Allerdings zeigte sich auch, dass Patientinnen/Patienten mit TP53-mutierten Tumoren besser auf eine Therapie mit Gemcitabine anzusprechen scheinen. In einer explorativen Analyse anhand eines öffentlich verfügbaren Datensatzes fanden wir eine höhere Expression von Schlüsselgenen der Glykolyse in TP53-mutierten Tumoren als möglichen relevanten tumorbiologischen Unterschied.

Das Pankreaskarzinom liegt im Hinblick auf die personalisierte Medizin noch hinter der Therapie des Mammakarzinoms zurück. Das kann einerseits an den wenigen häufig zu beobachtenden Alterationen auf DNA-Ebene liegen, die zudem zumeist eine zielgerichtete therapeutische Intervention nicht zulassen [34]. Andererseits wurden auf RNA-Ebene verschiedene molekulare Subtypen des Pankreaskarzinoms beschrieben, von denen sich zwei, der basale und der klassische Subtyp, reproduzierbar darstellen lassen [34]. Der prognostische und prädiktive Wert dieser Klassifikation sind noch nicht innerhalb klinischer Studien gezeigt. Derzeitiger Forschungsfokus richtet sich darauf aus, diese Lücke zu schließen.

5 Literatur

Literatur

- [1] Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **70**, 7–30 (2020).
- [2] RKI. *Krebs in Deutschland für 2015/2016* (Robert Koch Institut, 2020).
- [3] Couch, F. J. *et al.* Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. *JAMA Oncol* **3**, 1190–1196 (2017).
- [4] Li, C. I., Uribe, D. J. & Daling, J. R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* **93**, 1046–1052 (2005).
- [5] Ciriello, G. *et al.* Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. *Cell* **163**, 506–519 (2015).
- [6] Elston, C. W. & Ellis, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. i. the value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19**, 403–410 (1991).
- [7] Allison, K. H. *et al.* Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: Asco/cap guideline update. *Journal of Clinical Oncology* **Epub ahead of print** (2020).
- [8] Wolff, A. C. *et al.* Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of american pathologists clinical practice guideline focused update. *Journal of Clinical Oncology* **36**, 2105–2122 (2018).
- [9] Parise, C. A., Bauer, K. R., Brown, M. M. & Caggiano, V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (er), progesterone receptor (pr), and the human epidermal growth factor receptor 2 (her2) among women with invasive breast cancer in california, 1999-2004. *Breast J* **15**, 593–602 (2009).
- [10] Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000). URL <https://doi.org/10.1038/35021093>.
- [11] Sørlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS; Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 10869–10874 (2001).
- [12] The Cancer Genome Atlas, . Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
- [13] Davies, C. *et al.* Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **378**, 771–784 (2011).
- [14] Slamon, D. *et al.* Adjuvant trastuzumab in her2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **365**, 1273–1283 (2011).

- [15] Luporsi, E. *et al.* Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat* **132**, 895–915 (2012).
- [16] Polley, M.-Y. C. *et al.* An international ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst* **105**, 1897–1906 (2013).
- [17] Toy, W. *et al.* ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nature genetics* **45**, 1439–45 (2013).
- [18] Robinson, D. R. *et al.* Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nature genetics* **45**, 1446–51 (2013).
- [19] André, F. *et al.* Alpelisib for pik3ca-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* **380**, 1929–1940 (2019).
- [20] Robson, M. *et al.* Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline brca mutation. *N Engl J Med* **377**, 523–533 (2017).
- [21] Litton, J. K., Burstein, H. J. & Turner, N. C. Molecular testing in breast cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* e1–e7 (2019).
- [22] van 't Veer, L. J. *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530–536 (2002).
- [23] Paik, S. *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine* **351**, 2817–2826 (2004).
- [24] Filipits, M. *et al.* A new molecular predictor of distant recurrence in er-positive, her2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clinical Cancer Research* **17**, 6012–6020 (2011).
- [25] Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E. & Gianni, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology* **13**, 674–690 (2016).
- [26] Belli, C., Duso, B. A., Ferraro, E. & Curigliano, G. Homologous recombination deficiency in triple negative breast cancer. *The Breast* **45**, 15 – 21 (2019).
- [27] Prat, A. *et al.* Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. *BMC Med* **13**, 303 (2015).
- [28] Zitvogel, L., Kepp, O. & Kroemer, G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nature Reviews Clinical Oncology* **8**, 151–160 (2011).
- [29] Denkert, C. *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet Oncology* **19**, 40–50 (2018).
- [30] Klimstra, D. S. Noductal neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol* **20 Suppl 1**, S94–112 (2007).

- [31] Hruban, R. H. *et al.* Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* **25**, 579–586 (2001).
- [32] Ho, W. J., Jaffee, E. M. & Zheng, L. The tumour microenvironment in pancreatic cancer - clinical challenges and opportunities. *Nat Rev Clin Oncol* **17**, 527–540 (2020).
- [33] Ryan, D. P., Hong, T. S. & Bardeesy, N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med* **371**, 1039–1049 (2014).
- [34] The Cancer Genome Atlas, . Integrated genomic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **32**, 185–203 (2017).
- [35] Sinn, B. V. *et al.* Seter/pr: a robust 18-gene predictor for sensitivity to endocrine therapy for metastatic breast cancer. *npj Breast Cancer* **5** (2019).
- [36] Sinn, B. V. *et al.* Human leucocyte antigen class i in hormone receptor-positive, her2-negative breast cancer: association with response and survival after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Research* **21** (2019).
- [37] Sinn, B. V. *et al.* Evaluation of mucin-1 protein and mrna expression as prognostic and predictive markers after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Ann Oncol* **24**, 2316–2324 (2013).
- [38] Kufe, D. W. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer* **9**, 874–885 (2009).
- [39] Rajabi, H. & Kufe, D. Muc1-c oncoprotein integrates a program of emt, epigenetic reprogramming and immune evasion in human carcinomas. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1868**, 117–122 (2017).
- [40] Maeda, T. *et al.* Muc1-c induces pd-l1 and immune evasion in triple-negative breast cancer. *Cancer Res* **78**, 205–215 (2018).
- [41] Adams, S. *et al.* Current landscape of immunotherapy in breast cancer. *JAMA Oncology* **5**, 1205 (2019).
- [42] von Minckwitz, G. *et al.* Neoadjuvant vinorelbine-capecitabine versus docetaxel-doxorubicin-cyclophosphamide in early nonresponsive breast cancer: phase iii randomized gearpartrio trial. *J Natl Cancer Inst* **100**, 542–551 (2008).
- [43] Mukhopadhyay, P. *et al.* Mucins in the pathogenesis of breast cancer: implications in diagnosis, prognosis and therapy. *Biochim Biophys Acta* **1815**, 224–240 (2011).
- [44] van der Vegt, B. *et al.* The expression pattern of muc1 (ema) is related to tumour characteristics and clinical outcome of invasive ductal breast carcinoma. *Histopathology* **51**, 322–335 (2007).
- [45] Rakha, E. A. *et al.* Expression of mucins (muc1, muc2, muc3, muc4, muc5ac and muc6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Mod Pathol* **18**, 1295–1304 (2005).

- [46] Sinn, M. *et al.* Tp53 mutations predict sensitivity to adjuvant gemcitabine in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma: Next-generation sequencing results from the conko-001 trial. *Clin Cancer Res* **26**, 3732–3739 (2020).
- [47] Oettle, H. *et al.* Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* **297**, 267–277 (2007).
- [48] Mantovani, F., Collavin, L. & Del Sal, G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ* **26**, 199–212 (2019).
- [49] Sinn, M. *et al.* alpha-smooth muscle actin expression and desmoplastic stromal reaction in pancreatic cancer: results from the conko-001 study. *Br J Cancer* **111**, 1917–1923 (2014).
- [50] Vonlaufen, A. *et al.* Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res* **68**, 2085–2093 (2008).
- [51] Rhim, A. D. *et al.* Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **25**, 735–747 (2014).
- [52] Fujita, H. *et al.* alpha-smooth muscle actin expressing stroma promotes an aggressive tumor biology in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* **39**, 1254–1262 (2010).
- [53] Sinn, M. *et al.* Sparc expression in resected pancreatic cancer patients treated with gemcitabine: results from the conko-001 study. *Ann Oncol* **25**, 1025–1032 (2014).
- [54] Jeselsohn, R. *et al.* Emergence of constitutively active estrogen receptor- α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research* **20**, 1757–1767 (2014).
- [55] Fribbens, C. *et al.* Plasma ESR1 Mutations and the treatment of estrogen receptor-Positive advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* **34**, 2961–2968 (2016).
- [56] Marczyk, M. *et al.* The impact of RNA extraction method on accurate RNA sequencing from formalin- fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Cancer* 1–12 (2019).
- [57] Loibl, S. *et al.* A randomised phase ii study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: clinical results and biomarker analysis of geparnuevo study. *Annals of Oncology* **30**, 1279–1288 (2019).

6 Danksagung

Mein Dank gilt zuerst meinen Eltern, Frau Dr. Gabriele Sinn und Herrn Dr. Martin Sinn, die mich immer unterstützt und meinen Werdegang ermöglicht haben.

Besonders herzlich danke ich mich bei meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Carsten Denkert für die wissenschaftliche Ausbildung, Inspiration und langjährige, andauernde gute Zusammenarbeit. In herausragender Weise hat auch Frau PD Dr. Silvia Darb-Esfahani meinen wissenschaftlichen und ärztlichen Werdegangs gefördert, auch als Betreuerin meiner Dissertation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. David Horst, dessen Institutsleitung es mir ermöglicht, meine Habilitation abzuschließen und meine wissenschaftliche Tätigkeit weiter zu führen. Herrn Prof. Dr. Manfred Dietel gilt mein Dank, seine Institutsleitung hat meinen Einstieg in die Forschung ermöglicht und unterstützt.

Herrn Prof. Dr. William Fraser Symmans danke ich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme und vielfältige Inspiration während meines Forschungsaufenthaltes in seiner Arbeitsgruppe am MD Anderson Cancer Center (Houston, Texas). Auch Herrn Dr. Tsung-Heng Tsai, Frau Dr. Rosanna Lau, Frau Dr. Lili Fu und Frau Rebekah Gould gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit in der dortigen Arbeitsgruppe. Herrn Prof. Dr. Christos Hatzis (New Haven, Connecticut) bin ich dankbar für seine freundliche Unterstützung bei der Einarbeitung in die bioinformatische Datenanalyse.

Frau Prof. Dr. Sibylle Loibl und ihrem Team der German Breast Group danke ich für die langjährige und vertrauensvolle Zusammenarbeit im Rahmen zahlreicher Kooperationsprojekte. Ebenso danke ich meinen klinischen Kolleginnen und Kollegen an der Charité, insbesondere Frau PD Dr. Marianne Sinn, Herrn PD Dr. Uwe Pelzer und Herrn Prof. Dr. Marcus Bahra.

Dankbar bin ich auch für die Möglichkeit der Teilnahme am Clinician Scientist Program des Berlin Institute of Health, hier insbesondere Frau Prof. Dr. Duska Dragun, die das Programm mit viel persönlichem Einsatz gegründet und geleitet hat.

Auch danke ich unserer gesamten Arbeitsgruppe für translationale Tumorforschung, insbesondere Frau Ines Koch und Frau Petra Wachs, für ihre Hilfe und ihren Einsatz bei meiner Einarbeitung in die Labortechniken. Frau Dr. Judith Lindner und Frau Dr. Iris Piwonski danke ich für ihre fortwährende freundschaftliche Unterstützung. Herrn Dr. Jan Budczies, Frau Dr. Denise Treue und Herrn Prof. Frederick Klauschen danke ich die gute Zusammenarbeit bei zahlreichen Projekten.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen an unserem Institut für Pathologie für die immer kooperative und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Frau Ulrike Schäfer für die private Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit.

7 Erklärung

§4 Absatz 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

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.

Datum und Unterschrift