

Aus dem
CharitéCentrum für diagnostische und präventive Labormedizin
Institut für Pathologie
Direktor: Professor Dr. med. Manfred Dietel

Habilitationsschrift

Evaluation von Biomarkern im Formalin-fixierten, Paraffin- eingebetteten Gewebe zur Prädiktion von Prognose und Therapieansprechen des Ovarial- und Mammakarzinoms

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Pathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Silvia Darb-Esfahani
geboren am 01.05.1976 in Bielefeld

eingereicht im März 2013

öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am 15. Juli 2013

Dekanin: Frau Prof. Dr. A. Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. C. Röcken, Institut für Pathologie, UK Schleswig-Holstein, Kiel
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. H. Höfler, Institut für Pathologie, TU München

Abkürzungen

AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
ARID1A	AT-rich interaction domain-containing protein 1A
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BRCA1/2	breast cancer gene 1/2
CCC	klarzelliges Karzinom (clear cell carcinoma)
CRM1	chromosomal region maintenance/exportin 1
CSC	Tumorstammzellen (cancer stem cells)
CT	cycle threshold
DSF	krankheitsfreies Überleben (disease-free survival)
EC	endometrioides Karzinom (endometrioid carcinoma)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor)
ER	Östrogenrezeptor
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FOXM1	forkhead box M1
GBG	German Breast Group
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HGSC	high grade seröses Karzinom (high grade serous carcinoma)
HR	Hormonrezeptor
IHC	Immunhistochemie
I κ B α	inhibitor of kappa B alpha
IKKbeta	IkappaB-Kinase β
IL1 β	Interleukin 1 beta
ISH	In-Situ-Hybridisierung
LGSC	low grade seröse Karzinom (low grade serous carcinoma)
LMB	Leptomycin B
LPA	Lysophosphatidylsäure

LPAAT-β	Lysophosphatidylsäure-Acyl-Transferase β
MC	muzinöses Karzinom (mucinous carcinoma)
mTOR	mammalian target of rapamycin
NACT	neoadjuvante Chemotherapie
NF-κB	nuclear factor kappa B
OS	Gesamtüberleben (overall survival)
OR	Odds Ratio
PA	Phosphatidylsäure
PARP	Poly(ADP-Ribose)polymerase
pCR	pathologische Komplettremission (pathological complete remission)
PFS	progressionfreies Überleben (progression-free survival)
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PR	Progesteronrezeptor
RB1	retinoblastoma 1
(q)RT-PCR	(quantitative) reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
SOP	standard operating procedures
STIC	serous tubal intraepithelial carcinoma
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMSB15A	Thymosin beta 15A
TMA	tissue micro array
TNBC	tripel negatives Mammakarzinom (triple negative breast cancer)
TOC	tumor bank ovarian cancer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Epidemiologie und Klinik des Ovarialkarzinoms	1
1.2. Molekulare Grundlagen des Ovarialkarzinoms	2
1.3. Epidemiologie und Klinik des Mammakarzinoms	4
1.4. Molekulare Grundlagen des Mammakarzinoms	5
1.5. Zielstellung	6
2. Eigene Arbeiten	8
2.1. Prognosefaktoren im Ovarialkarzinom	8
2.1.1. Die Lysophosphatidylsäure-Acyl-Transferase β (LPAAT- β)	8
2.1.2. Der kanonische nuclear factor κ B (NF- κ B)-Pathway	9
2.1.3. Der Östrogenrezeptor (ESR1)	10
2.1.4. Die Aldehyd-Dehydrogenase-1 (ALDH1) und der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)	12
2.2. Prädiktive Biomarker im Mammakarzinom	13
2.2.1. Die Definition biologischer Tumortypen durch Expressionsbestimmung von Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor und humanem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (ER/PR/HER2)	13
2.2.2. Thymosin beta 15A (TMSB15A) im tripel negativen Mammakarzinom	14
3. Diskussion	17
3.1. Der aktuelle Stand der Entwicklung von Biomarkern für das Ovarialkarzinom und Erfordernisse für die Zukunft	17
3.2. Biomarker für prognostisch ungünstige molekulare Subgruppen des Mammakarzinoms	21
3.3. Die Methodik der Biomarkerbestimmung am Formalin-fixierten, Paraffin- eingebetteten (FFPE)-Gewebe	24
3.4. Ausblick	26
4. Zusammenfassung	27
5. Literaturangaben aus dem freien Text	29
Danksagung	37
Erklärung	38

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und Klinik des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom ist ein relativ seltener Tumor: gemäß Schätzung des National Cancer Institute für das Jahr 2012 steht es in den USA an neunter Stelle der häufigsten malignen Erkrankungen der Frau und macht 3% an der Gesamtkrebsinzidenz aus.¹ Dabei weist es eine hohe Mortalitätsrate auf und steht in der Liste der für 2012 geschätzten Krebstodesfälle bei Frauen an fünfter Stelle. Gemäß dem Jahresbericht 2005-2006 des Gemeinsamen Krebsregisters von Berlin und der ostdeutschen Bundesländer erkrankten im Einzugsraum durchschnittlich 1.532 Frauen an einem Ovarialkarzinom, durchschnittlich 1.122 Frauen sterben jährlich daran.² Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt stadienübergreifend 44%,^{1,2} wobei das lokal begrenzte Stadium (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique, FIGO I) eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 90% aufweist.¹ Allerdings werden lediglich 15% der Ovarialkarzinome im frühen, potentiell heilbaren Stadium diagnostiziert. Die weit überwiegende Zahl der Fälle manifestiert sich als fortgeschrittenes Tumorleiden mit peritonealer und lymphogener Dissemination.^{1,2} Frühsymptome fehlen häufig oder sind unspezifisch, symptomatisch werden die Betroffenen oft erst mit einer Zunahme des Bauchumfanges aufgrund einer Peritonealkarzinose und von Aszites; eine Heilung ist im fortgeschrittenen Stadium, also bei 85% aller Patientinnen nicht mehr möglich. Maßnahmen zur Früherkennung, zum Beispiel durch Sonographie oder Serumentumormarker waren bisher nicht erfolgreich.^{3,4} Als Richtlinien für Diagnostik und Therapie gilt in Deutschland die S2K-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO), Kommission Ovar.⁵ Die Standardtherapie besteht in einer radikalen Tumormassenreduktion mit adjuvanter Chemotherapie mit einer Kombination aus Taxanen und platinhaltigen Substanzen. Anders als bei sonstigen peritoneal disseminierten Tumoren wird hier also eine möglichst komplette Entfernung aller abdomineller und nodaler Tumormanifestationen angestrebt, wobei der intraoperativ makroskopisch bestimmte Tumorrest einen der wichtigsten Prognosefaktoren darstellt.⁵ 75% der Patientinnen sprechen auf eine adjuvante Chemotherapie an, das heißt sie bleiben mehr als sechs Monate nach Abschluss der Chemotherapie rezidivfrei (sogenannte Platinsensitivität), dennoch erleidet der größte Teil von ihnen im späteren Verlauf ein Rezidiv. In der Rezidivsituation besteht wieder die Option eines radikalen Tumorresektion mit anschließender platinhaltiger Chemotherapie oder mit

Alternativen wie Topotecan, pegyliertem liposomalen Doxorubicin oder Paclitaxel bei Platinresistenz.⁵ Die Erkrankung kann auf diese Weise teilweise über Jahre hinweg in einer chronischen Situation gehalten werden. Fortschritte insbesondere in der Chemotherapie des Rezidivs sowie die Weiterentwicklung des Operationsverfahrens haben wahrscheinlich über die letzten 30 Jahre zu einer leichten Zunahme des 5-Jahres-Überlebensraten geführt.^{2,6} Lediglich im Stadium FIGO Ia und bei hohem Tumordifferenzierungsgrad (G1) wird auf eine adjuvante Chemotherapie verzichtet, in alle anderen Tumorstadien erfolgt unabhängig vom histologischen Typ des Karzinoms die oben geschilderte Standardtherapie.⁵ Regime mit anderen Chemotherapie-Kombinationen oder Variationen von Zykluszahl oder Dosierung haben keine Prognoseverbesserung gegenüber der Standardtherapie erbracht; auch die Testung neuer, sogenannter zielgerichteter Substanzen (targeted therapy) mit small molecules oder Antikörpern führte lange Zeit nicht zu einem Durchbruch. Eine erste Ausnahme mag der nun der Angiogenesehemmer Bevacizumab darstellen, der beim fortgeschrittenen primären Ovarialkarzinom in zwei neueren Studien ein verlängertes progressionfreies Überleben (PFS) im Vergleich zur Standardtherapie erbrachte.^{7,8} Daten zum Gesamtüberleben stehen jedoch noch aus. Obwohl die aktuellen Therapiekonzepte oft ein mehrjähriges Überleben der Patientinnen ermöglichen, kann die Erkrankung selten geheilt werden und führt in den allermeisten Fällen zum Tode.

1.2. Molekulare Grundlagen des Ovarialkarzinoms

Mehrere histologische Varianten des Ovarialkarzinoms sind bekannt: das high grade seröse Karzinom (HGSC) macht mit 70% den größten Teil der Fälle aus und beeinflusst deswegen am stärksten die oben genannten epidemiologischen Daten. Weitere Subtypen sind das endometrioides (EC) und das klarzellige (CCC) mit jeweils 10%, das muzinöse (MC) mit 5% und das low grade seröse Karzinom (LGSC) mit circa 3%, daneben gibt es weitere, sehr seltene histologische Varianten. Diese histologischen Subtypen unterscheiden sich nicht nur morphologisch sondern auch auf molekularer Ebene, durch ihre Ätiologie, ihr Therapieansprechen und ihre Prognose.⁹ Eine umfassende Analyse der genetischen Eigenschaften des dominanten histologischen Typs, dem HGSC, wurde kürzlich im Rahmen des Cancer Genome Atlas Project (TCGA) an etwa 500 Tumoren durchgeführt.¹⁰ Praktisch alle HGSC sind demnach durch p53-Mutationen gekennzeichnet, ferner finden sich in 22% Mutationen im breast cancer 1/2-Gen (BRCA1/2). Wenige andere Mutationen finden sich in

geringeren Raten. Ausgesprochen hoch ist die chromosomale Instabilität des HGSC, die wahrscheinlich durch häufige Alterationen von Genen, die in die DNA-Reparatur involviert sind, erklärt werden kann. Die genomische Instabilität ist wahrscheinlich eine wichtige Ursache für die Sensitivität gegenüber einer zytotoxischen Therapie. Deregulation von Signaltransduktionswegen (Pathways) wie von retinoblastoma 1 (RB1), Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), forkhead box M1 (FOXO1) und Notch fanden sich in relevanten Gruppen des HGSC. Beachtenswert ist an dieser Stelle auch das aktuelle Konzept zur Entstehung des HGSC, das den Ursprung des Tumors nicht im Ovar sondern in der Tubenschleimhaut sieht, wo es sich aus einer in-situ-Vorläuferläsion, dem sogenannten serous tubal intraepithelial carcinoma (STIC) entwickelt.^{11,12} Die übrigen histologischen Subtypen weisen andere, spezifische molekulare Besonderheiten auf, so finden sich im LGSC häufig b-raf und k-ras-Mutationen,¹³ EC und CCC entstehen häufig in Endometriosen und beinhalten Mutationen im Tumorsuppressor AT-rich interaction domain-containing protein 1A (ARID1A)¹⁴ und MC enthalten k-ras-Mutationen¹⁵ und weisen in circa 30% eine human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-Amplifikation auf.^{16,17} Vorläuferläsionen dieser selteneren Subtypen sind Borderlinetumoren, die Atypien aufweisen, aber nicht destruierend invasiv wachsen. Die neuen Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen des Ovarialkarzinome haben zur Entwicklung des Typ1/Typ2-Konzeptes geführt, wobei unter Typ1 die (meist) gut differenzierten Subtypen, die über Borderlinetumoren entstehen subsumiert werden (LGSC, MC, EC, CCC) und unter den Typ2-Karzinomen die HGSC sowie die Karzinosarkome, undifferenzierten und high grade endometrioiden Karzinome verstanden werden. Letztere sind den HGSC auf molekularer Ebene sehr ähnlich und womöglich mit ihnen identisch.⁶ Diese noch relativ jungen Konzepte zum Ovarialkarzinom sind noch nicht in der geltenden WHO-Klassifikation der Malignome der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane von 2003 abgebildet.¹⁸ Insbesondere werden hierin LGSC und HGSC als unterschiedliche Differenzierungsgrade derselben Entität betrachtet und es wird noch das transitionalzellige Karzinom unterschieden, das heute eher als morphologische Sonderform des HGSC betrachtet wird.¹⁹

1.3. Epidemiologie und Klinik des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist das häufigste Malignom der Frau: 10.905 Frauen erkranken daran jährlich in Berlin und Ostdeutschland.² In den USA wird das Mammakarzinom im Jahre 2012 geschätzt 29% der Krebserkrankungen bei Frauen ausmachen und liegt damit deutlich vor dem Bronchialkarzinom als zweithäufigstem Malignom (14%).¹ Etwa jede zehnte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Im Gegensatz zum Ovarialkarzinom ist allerdings die Prognose deutlich günstiger: Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt stadienübergreifend 89%. Diese günstige Prognose ist zum Teil dadurch zu erklären, dass 60% der Erkrankungen im lokalisierten Stadium erkannt werden (5-Jahres-Überlebensrate 99%). Auch bei regionärem Lymphknotenbefall (33% bei Erstdiagnose) ist die Prognose noch relativ gut (5-Jahres-Überlebensrate 84%). Erst bei Fernmetastasierung (5% bei Erstdiagnose) fällt die Lebenserwartung stark ab und die 5-Jahres-Überlebensrate in diesem Fall beträgt nur noch 24%.¹ Mit dem Mammographiescreening existiert für das Mamakarzinom eine Früherkennungsmethode; das Screening wird in Deutschland seit 2009 für alle Frauen zwischen 50 und 70 Jahren angeboten. Die Mortalität des Mammakarzinoms sinkt seit den 90er Jahren. Dieser Trend ist in den USA und auch in Deutschland zu beobachten.^{2,20} Fortschritte in Früherkennung und Therapie werden dafür verantwortlich gemacht.²¹ Ein weiterer Gegensatz zum Ovarialkarzinom ist die deutlich differenziertere Therapie des Mammakarzinoms. Standardisierte Richtlinien für Diagnostik, Therapie und Nachsorge werden in der S3-Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft zusammengefasst,²² außerdem werden Empfehlungen von der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO, http://www.ago-online.de/index.php?lang=de&site=mamma_guide_topical&topic=mamma_guide) sowie bei der in St. Gallen stattfindenden Konsensuskonferenz herausgegeben und regelmäßig aktualisiert.²³ Meist erfolgt eine primäre Tumorsektion, die oft brusterhaltend durchgeführt werden kann, in Kombination mit einer axillären Lymphonodektomie nach dem Sentinelkonzept sowie eine post-operative Strahlentherapie. Eine adjuvante Chemotherapie ist häufig indiziert und richtet sich unter anderem nach Tumorgröße und – differenzierung sowie dem Rezeptorstatus. Eine neoadjuvante Chemotherapie (NACT) hat sich, auch beim operablen Mammakarzinom, gegenüber dem Standardvorgehen als ebenbürtig erwiesen^{23,24} und ist besonders für bestimmte Subgruppen des Mammakarzinoms geeignet (vergleiche Diskussion). Zielgerichtete Therapien werden je nach Rezeptorstaus des Tumors angeschlossen, wobei die antihormonelle Therapie mit

östrogenrezeptormodulierenden Substanzen (Tamoxifen) oder Aromataseinhibitoren (Letrozol, Anastrozol) bei Hormonrezeptor (HR)-positiven Tumoren (ca. 70%) wahrscheinlich wesentlich zur Prognoseverbesserung des Mammakarzinoms beigetragen hat.²¹ Tumoren, die HER2 überexprimieren, werden ein Jahr lang mit Trastuzumab behandelt. Trotz des allgemein hohen Niveaus der Versorgung existieren prognostisch ungünstige Subgruppen des Mammakarzinoms, insbesondere die HER2-positiven, tripel negativen (triple negative breast cancer, TNBC) oder luminal B-Karzinome, die neuer therapeutischer Optionen bedürfen. Die Besonderheiten dieser Subtypen werden nachfolgend ausgeführt (Kapitel 1.4).

1.4. Molekulare Grundlagen des Mammakarzinoms

Mammakarzinome sind zu ca. 70% duktale Adenokarzinome unterschiedlichen Differenzierungsgrades. Deutlich seltener sind die lobulären (circa 12%) und sehr selten andere histologische Typen (zum Beispiel (mikro-) papilläre, muzinöse, metaplastische, neuroendokrine Karzinome (vergleiche WHO-Klassifikation 2012)).²⁵ Das Verständnis der molekularen Grundlagen des Mammakarzinoms wurde vor zwölf Jahren revolutioniert, als Genexpressionsanalysen zeigten, dass Mammakarzinome fünf intrinsischen Subtypen zuzuordnen sind.^{26,27} Luminale Tumore machen etwa zwei Drittel aller Mammakarzinome aus; sie trennen sich weiter auf in den Subtyp luminal A (Östrogenrezeptor (ER)-positiv, hohe Expression ER-abhängiger Gene, luminal Zytokeratine) und luminal B (schwächere HR-Expression, zusätzlich Expression proliferationsassoziiierter Gene, HER2 kann zusätzlich überexprimiert sein). Der Subtyp HER2-enriched kommt in 5-10% der Fälle vor (HER2-überexprimierend, Ko-Expression von Genen im HER2-Amplikon, zum Beispiel Topoisomerase II alpha). Der Subtyp basal-like findet sich in 15-20% der Fälle (HR- und HER2-negativ, Expression von basalen Zytokeratinen, epidermal growth factor receptor (EGFR) und c-kit). Diesem Subtyp gehören auch die auf dem Boden einer BRCA1-Keimbahnmutation entstandenen Tumoren an.²⁸ Zuletzt findet sich noch der normal-like Subtyp, dessen Berechtigung als Entität umstritten ist sowie der relativ neu definierte Claudin-low Subtyp (HR- und HER2-negativ, Charakteristika der epithelial-mesenchymalen Transformation).²⁹ Die Existenz dieser intrinsischen Subtypen konnte mehrfach in unabhängigen Kollektiven bestätigt werden.³⁰⁻³³ Die intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms haben ohne adjuvante Therapie eine deutlich differierende Prognose, die von den luminalen über die HER2-positiven Karzinome bis zum basal-like Subtyp schlechter wird.³⁴ Da die Subtypisierung durch Genexpressionsprofiling für die Anwendung in der klinischen Routine nicht

praktikabel, da sie aufwendig und kostenintensiv ist und schockgefrorenes Gewebe erfordert, gab es Bemühungen, die intrinsischen Subtypen mittels Immunhistochemie (IHC) zu bestimmen.^{35,36} Mittlerweile werden in der klinischen Praxis die drei wichtigsten Subtypen vereinfacht durch IHC abgebildet: lumbale Karzinome (ER- und/oder Progesteronrezeptor (PR)-positiv), HER2-positive Karzinome, die entweder HR-positiv oder HR-negativ sein können und TNBC (ER-, PR- und HER2-negativ). Diese Subtypen stimmen nicht vollständig mit den molekularen Subtypen überein, sie haben jedoch ebenfalls prognostische und prädiktive Bedeutung und sind derzeit Grundlage von Therapieentscheidungen.

Luminale Tumoren können aufgrund ihrer HR-Expression antihormonell behandelt werden, wobei beobachtet werden kann, dass die luminal B-Subgruppe schlechter als die luminal A-Gruppe darauf anspricht und einen ungünstigeren Verlauf nimmt. Mit Trastuzumab oder neueren HER2-inhibierenden Substanzen steht eine spezifische Therapie für die HER2-positiven Karzinome zur Verfügung, was zu einer wesentlichen Prognoseverbesserung für die betroffenen Patientinnen geführt hat. Bei einem signifikanten Teil der Patientinnen besteht jedoch eine primäre Trastuzumab-Resistenz, die bei Kombination mit Chemotherapie bei circa 15% liegt.³⁷ Die TNBC sind derzeit die problematischste Subgruppe, da es sich um eine aggressive, häufig rasch zum Tode führende Entität handelt, für die derzeit keine spezifische Therapie zur Verfügung steht.³⁸

1.5. Zielstellung

Ziel der nachfolgend vorgestellten Arbeiten war es, im Gewebe von primären Ovarial- und Mammakarzinomen verschiedene Biomarker zu evaluieren, die eine bessere Einschätzung der Patientenprognose und des Ansprechens auf Chemotherapie ermöglichen und letztendlich die Therapie individualisieren und optimieren könnten. Die untersuchten Marker wurden jeweils hypothesenbasiert ausgewählt.

Spezifische Ziele im Ovariakarzinom waren:

- Analyse der Proteinexpression und des prognostischen Wertes der Lysophosphatidylsäure-Acyl-Transferase β (LPAAT- β)
- Bestimmung der Aktivität des kanonischen nuclear factor kappa B (NF- κ B)-Pathway und dessen prognostischer Relevanz mittels Proteinexpressionsanalyse wichtiger Pathway-Komponenten

- Vergleichende Analyse der prognostischen Relevanz der Östrogenrezeptor α -Expression auf Protein- und mRNA-Ebene
- Untersuchung der Beziehung zwischen der Proteinexpression der Aldehyd-Dehydrogenase-1 (ALDH1) und von EGFR im serösen high grade Ovarialkarzinom im Hinblick auf die Patientenprognose

Spezifische Ziele im Mammakarzinom waren:

- Analyse des prädiktiven und prognostischen Wertes einer molekularen Tumortypisierung mittels ER/PR/HER2-Expressionsbestimmung durch IHC
- Identifikation und Validierung des prädiktiven Wertes der Thymosin beta 15A (TMSB15A)-mRNA-Expression im tripel negativen Mammakarzinom

Ein methodisches Ziel in einigen der nachfolgend vorgestellten Arbeiten war zusätzlich die Optimierung der quantitativen reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebetteten Gewebe (FFPE-Gewebe).

Die vorgestellten Arbeiten wurden im Rahmen einer translationalen Tumorforschung durchgeführt, die als Bindeglied zwischen der Grundlagenforschung (*in vitro*-Modelle, Tiermodelle) und der klinischen Forschung gilt.

2. Eigene Arbeiten

2.1. Prognosefaktoren im Ovarialkarzinom

Die Untersuchungen zum Ovarialkarzinom wurden an einem Kollektiv aus primären, in der Charité diagnostizierten und behandelten Ovarialkarzinomen durchgeführt, wobei FFPE-Gewebe verwendet wurde. In allen Fällen lagen vollständige klinisch-pathologische Charakterisierungen sowie Überlebensdaten vor. Klinische Daten wurden von unseren Kooperationspartnern aus der Gruppe von Professor Jalid Sehouli beigetragen (Frauenklinik, Charité Campus Virchow Klinikum). Alle Fälle wurden hinsichtlich der Histologie und der Differenzierung (Silverberg-Grading)³⁹ gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation beurteilt.¹⁸

2.1.1. Die Lysophosphatidylsäure-Acyl-Transferase β (LPAAT- β)

Expression of lysophosphatidic acid acyltransferase beta (LPAAT- β) in ovarian carcinoma - Correlation with tumor grading and prognosis.

Silvia Niesporek, Carsten Denkert, Wilko Weichert, Martin Köbel, Aurelia Noske, Jalid Sehouli, JW Singer, Manfred Dietel, Steffen Hauptmann

British Journal of Cancer, 2005; 92(9):1729-36

Phospholipide wie Lysophosphatidylsäure (LPA) und Phosphatidylsäure (PA) sind in Ovarialkarzinomzellen wichtige Regulatoren von Proliferation, Migration und Invasion.^{40,41} Lysophosphatidylsäure-Acyl-Transferase β (LPAAT- β) konvertiert intrazelluläres LPA in PA und ist ein potentielles therapeutisches Zielmolekül.

Wir fanden in der RT-PCR, dass die LPAAT- β konstitutiv in acht Ovarialkarzinomzelllinien exprimiert wurde. Immunhistochemisch sahen wir eine Überexpression der LPAAT- β in 76 Ovarialkarzinomen im Vergleich zu 25 Boderlinetumoren, Zystadenomen oder normalem ovariellen Oberflächenepithel ($p < 0.0001$). Im Ovarialkarzinom war eine hohe LPAAT- β -Expression vorwiegend in gering differenzierten ($p = 0.044$) und fortgeschrittenen Tumoren zu finden ($p = 0.032$). Bei Patientinnen, die jünger als 60 Jahre alt waren, war die Expression des LPAAT- β ein negativer Prognosefaktor für das PFS ($p = 0.012$) und das Gesamtüberleben (overall survival, OS, $p = 0.024$).

Diefenbach et al. fanden nach uns eine Überexpression und prognostische Relevanz der LPAAT- β im Ovarialkarzinom.⁴² Die gleiche Beobachtung machten Springett et al., ferner fanden sie, dass spezifische LPAAT- β -Inhibitoren in Ovarialkarzinomzellen Apoptose

auslösten.⁴³ Diese Ergebnisse skizzieren die LPAAT- β als potentielles therapeutisches Target im Ovarialkarzinom.

2.1.2. Der kanonische nuclear factor kappa B (NF- κ B)- κ B-Pathway

Expression of classical NF- κ B pathway effectors in human ovarian carcinoma.

Silvia Darb-Esfshani, Bruno V. Sinn, Wilko Weichert, Jan Budczies, Annika Lehmann, Aurelia Noske, Ann-Christin Buckendahl, Berit Maria Müller, Jalid Sehouli, Dominique Koensgen, Balasz Györffy, Manfred Dietel, Carsten Denkert

Histopathology, 2010; 56(6):727-39

Die Komponenten der Transkriptionsfaktorfamilie nuclear factor kappa B (NF- κ B) sind essentielle Regulatoren des Immunsystems, der Apoptose und der Proliferation und spielen eine pathogenetische Rolle in verschiedenen hämatologischen und soliden Tumoren.⁴⁴ Für den potentiellen Einsatz von spezifischen Inhibitoren ist Einschätzung der NF- κ B-Aktivität im Tumorgewebe wünschenswert.

In 85 Ovarialkarzinomen analysierten wir die Expression von Komponenten des kanonischen NF- κ B-Pathway, p65, p(hospho)-p65, inhibitor of kappa B alpha (I κ B α), p-I κ B α durch IHC, zusätzlich die mRNA-Menge von I κ B α durch mRNA-In-Situ-Hybridisierung (ISH).

Die NF- κ B-Untereinheit p65 war rein zytoplasmatisch exprimiert und invers mit den anderen NF- κ B-Komponenten assoziiert. Eine Kaplan-Meier-Analyse zeigte, dass p65 ein Marker für ein kürzeres Gesamtüberleben war ($p=0.018$), während der NF- κ B-Regulator I κ B α ($p=0.001$) sowie nukleäres ($p=0.031$) und zytoplasmatisches p-I κ B α ($p=0.001$) günstige Prognosefaktoren waren. Dies galt auch für die Subgruppe der serösen Karzinome. In der multivariaten Analyse blieb zytoplasmatisches p-I κ B α ein unabhängiger Prognosefaktor ($p=0.010$). Wir suchten anschließend nach Ursachen dafür, dass wir lediglich eine zytoplasmatische p65-Expression im Ovarialkarzinom feststellen konnten, während in anderen Tumoren häufig nukleäres p65 gefunden wurde war, was für die aktive Form des Transkriptionsfaktors gehalten wird. In OVCAR-3-Zellen fanden wir nach Interleukin 1 beta (IL1 β)-Stimulation eine stark vermehrte DNA-Bindungskapazität von p65 im Transkriptionsfaktorassay ($p=0.002$), außerdem eine nukleäre Translokation in der Immunfluoreszenz. Anschließend inhibierten wir das für den nukleozytoplasmatischen Transport zuständige Protein chromosomal region maintenance/exportin 1 (CRM1) mit

Leptomycin B (LMB) und fanden, dass der Rücktransport von p65 vom Kern in das Zytoplasma in stimulierten OVCAR-3-Zellen dadurch im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen stark verzögert war. In der IHC fanden wir, dass die Expression von CRM1 positiv mit p65 assoziiert war ($p < 0.0001$).

I κ B α und insbesondere p-I κ B α , die gemeinhin als Indikatoren eines aktiven NF- κ B-Pathway gelten, fand wir hier also als Marker für eine gute Prognose, während eine Inaktivität des Pathway eher für eine ungünstige Prognose sprach. Zusätzlich erhielten wir *in vivo* und *in vitro* Hinweise darauf, dass die zytoplasmatische Retention von p65 im Ovarialkarzinom möglicherweise durch eine vermehrte Aktivität von CRM1 zu erklären ist. Annunziata et al. publizierten im selben Jahr, dass die Expression der NF- κ B-Untereinheit p50 ein signifikanter und die von p65 im Trend ein ungünstiger Prognosefaktor im Ovarialkarzinom war.⁴⁵ Interessanterweise war das NF- κ B-Zielgen Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) günstig mit der Prognose korreliert. Dieselbe Gruppe fand, dass die NF- κ B-aktivierende I κ B-Kinase beta (IKK β) ein negativer Prognosefaktor war und IKK β -Inhibition Proliferation, Inhibition und Adhäsion von Ovarialkarzinomzellen hemmte.⁴⁶ Die Bestimmung der NF- κ B-Aktivität im Tumorgewebe bleibt also eine Herausforderung und lässt einige Frage offen.

2.1.3. Der Östrogenrezeptor (ESR1)

Estrogen receptor 1 mRNA is a prognostic factor in ovarian carcinoma - determination by kinetic PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue.

Silvia Darb-Esfahani, Ralph M. Wirtz, Bruno V. Sinn, Jan Budczies, Aurelia Noske, Wilko Weichert, Areeg Faggad, Susanne Scharff, Jalid Sehouli, Guelten Oskay-Özcelik, Claudio Zamagni, Pierandrea De Iaco, Andrea Martoni, Manfred Dietel, Carsten Denkert

Endocrine-Related Cancer, 2009; 16(4):1229-39

Ein signifikanter Teil der Ovarialkarzinome exprimiert den ER. Ferner weisen Zellkulturexperimente darauf hin, dass Ovarialkarzinomzellen ER-abhängig wachsen.⁴⁷ Dennoch waren antihormonelle Therapieversuche meist wenig erfolgreich, wobei in den meisten Studien keine Stratifizierung gemäß der Rezeptorexpression vorgenommen wurde.⁴⁸

An einer Kohorte von 139 Ovarialkarzinomen untersuchten wir systematisch die Expression von ESR1, dem Gen, das für den ER α kodiert, auf mRNA- und Proteinebene. mRNA-Analytik

wurde mit qRT-PCR durchgeführt, nachdem RNA mittels eines neuen, auf magnetischen beads basierenden, von unseren Kooperationspartnern bei Siemens Healthcare (jetzt Sividon Diagnostics GmbH, Köln) entwickelten Verfahrens aus FFPE-Gewebe extrahiert worden war. Ziel der Arbeit war es, die Verteilung der RNA- und Proteinexpression sowie die prognostische Wertigkeit beider Marker miteinander zu vergleichen.

mRNA- und Proteinexpression waren signifikant miteinander korreliert. Die ESR1-mRNA-Expression war ein signifikanter positiver Prognosemarker für das OS der Patientinnen, wenn eine Cox-Regression mit kontinuierlichen mRNA-Daten durchgeführt wurde (hazard ratio 0.756 (95% Konfidenzintervall (CI)=0.634–0.903) pro $\Delta\Delta\text{CT}$, $p=0.002$). Um zu prüfen, ob die ESR1 mRNA-Expression zur Dichotomisierung von Ovarialkarzinompatientinnen mit guter und schlechter Prognose verwendbar sei, ermittelten wir einen sogenannten „optimalen“ cut-off-Punkt. Dafür trugen wir mit einem auf der statistischen Sprache R basierenden Verfahren die hazard ratios gegen alle möglichen cut-off-Punkte auf.⁴⁹ Ein $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert von 34.10 trennte die Studiengruppe mit einer minimalen hazard ratio (0.230, 95% Konfidenzintervall 0.102–0.516). Auch in relevanten Subgruppen war die ESR1-Expression prognostisch signifikant, so in serösen ($p=0.0007$), schlecht differenzierten (G2-3, $p=0.0003$), weit fortgeschrittenen (FIGO III-IV, $p=0.0012$) Ovarialkarzinomen sowie in Tumoren, die ohne Tumorrest operiert worden waren ($p=0.0001$). Auch in der multivariaten Überlebensanalyse war ESR1 ein signifikanter Prognosefaktor ($p=0.001$). Trotz einer starken Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression war letztere kein signifikanter Prognosefaktor in unserer Studiengruppe.

Die qRT-PCR scheint geeigneter als die IHC zu sein, biologisch relevante ER-Expressionsunterschiede im Ovarialkarzinom zu unterscheiden. Es wäre lohnenswert, in einer klinischen Studie mit Stratifizierung gemäß ESR1-Expression, die Wertigkeit einer antihormonellen Therapie im Ovarialkarzinom zu evaluieren.

2.1.4. Die Aldehyd-Dehydrogenase-1 (ALDH1) und der epidermale Wachstumsfaktor-rezeptor (EGFR)

Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)/epidermal growth factor receptor (EGFR) co-expression is characteristic of a highly aggressive, poor-prognosis subgroup of high grade serous ovarian carcinoma.

Catarina Alisa Liebscher, Judith Prinzler, Bruno Valentin Sinn, Jan Budczies, Carsten Denkert, Aurelia Noske, Jalid Sehouli, Elena Ioana Braicu, Manfred Dietel & Silvia Darb-Esfahani

Human Pathology, 2013, 44(8):1465-71

In Modellsystemen für das TNBC ist kürzlich gezeigt worden, dass EGFR in den sogenannten Tumorstammzellen (cancer stem cells, CSC) hochreguliert wird.⁵⁰ Als Tumorstammzellen gelten diejenigen Zellen, die für Tumorentstehung und -rezidiv sowie für Chemoresistenz verantwortlich gemacht werden. Die Aldehyd-Dehydrogenase-1 (ALDH1) gilt als Marker für CSC. Da das HGSC molekulare Ähnlichkeiten mit dem TNBC aufweist, untersuchten wir die Assoziation der EGFR-Expression mit der ALDH1-Expression. Die EGFR-Expression war bereits in einer früheren Arbeit unserer Gruppe untersucht worden.⁵¹ In 112 primären HGSC fand sich eine hochsignifikante Assoziation zwischen ALDH1 und EGFR ($p < 0.0001$). Außerdem war ALDH1 ein unabhängiger ungünstiger Prognosefaktor für das OS ($p = 0.041$). Karzinome, die positiv für ALDH1 und EGFR waren, stellten eine Subgruppe mit besonders ungünstiger Prognose in univariater ($p < 0.0001$) und multivariater Überlebensanalyse dar ($p = 0.004$).

Therapieversuche mit EGFR-Inhibitoren zeigten in (unselektierten) Ovarialkarzinomen bisher nur mäßigen Erfolg.⁵² Allerdings standen bisher auch noch keine zuverlässigen Biomarker zur Verfügung, um Patientinnen mit einem potentiellen Nutzen zu selektieren; immunhistochemische Verfahren mit gängigen Antikörpern zeigten Expressionsraten zwischen 4% und 70% und sehr unterschiedliche Einflüsse auf die Prognose.⁵³ Der gegen die intrazelluläre Domäne gerichtete anti-EGFR-Antikörper, den wir in unserer Kohorte verwendet hatten, produzierte ein sehr distinktes membranäres Färbemuster und zeigte einen klaren prognostischen Wert der EGFR-Expression.⁵¹ Dieser Assay stellt deshalb einen attraktiven potentiellen Biomarker für eine EGFR-Überexpression im Ovarialkarzinom dar. EGFR zusammen mit ALDH1 identifizierte eine hoch-aggressive Subgruppe von HGSC, die einerseits einen aktivierten EGFR-Pathway, andererseits einen erhöhten Gehalt an CSC

aufweisen könnten. Für Patienten mit EGFR und ALDH1-ko-exprimierenden Karzinomen sollten alternative Therapieoptionen – potentiell EGFR-Inhibitoren – evaluiert werden.

2.2. Prädiktive Biomarker im Mammakarzinom

Die Untersuchungen zum Mammakarzinom wurden an FFPE-prä-therapeutischen Stanzbiopsien aus den neoadjuvanten Phase III-Studien (GeparDuo, GeparTrio, GeparQuattro) der German Breast Group (GBG) durchgeführt. Alle Angaben zu klinisch-pathologischen Variablen, Therapieansprechen und Überleben wurden der zentralen Studiendatenbank entnommen.

2.2.1. Die Definition biologischer Tumortypen durch Expressionsbestimmung von Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor und humanem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (ER/PR/HER2)

Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormone and HER2 receptor expression in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy.

Silvia Darb-Esfahani, Sibylle Loibl, Berit M. Müller, Marc Roller, Carsten Denkert, Martina Komor, Karsten Schlüns, Jens-Uwe Blohmer, Jan Budczies, Bernd Gerber, Aurelia Noske, Andreas du Bois, Wilko Weichert, Christian Jackisch, Manfred Dietel, Klaus Richter, Manfred Kaufmann, Gunter von Minckwitz

Breast Cancer Research 2009;11(5):R69

Prä-therapeutische Stanzbiopsien aus der neoadjuvanten Phase III-Studie GeparDuo (NCT00793377), die von unseren Kooperationspartnern von der German Breast Group (GBG) durchgeführt worden war,⁵⁴ wurden mittels einem von uns entwickeltem, hier erstmalig angewandten Verfahren auf einen tissue micro array (TMA) gebracht und immunhistochemisch auf die Expression von ER, PR und HER2 sowie mehrerer anderer Marker hin untersucht. Die Markerkombinationen ergaben vier biologische Tumortypen, wobei unser besonderes Augenmerk auf dem Unterschied zwischen HER2-positiven Tumoren mit und ohne zusätzliche HR-Expression lag. Die IHC-Auswertung erfolgte mit Hilfe einer von der Firma VMscope GmbH (Berlin) in Kooperation mit unserer Gruppe entwickelten Software (TMA Evaluator) am digitalisierten Schnitt.

116 Fälle konnten ausgewertet werden. Die vier biologischen Tumortypen, HR+/HER2-, HR+/HER2+, HR-/Her2+, HR-/HER2 (TNBC), zeigten deutliche Unterschiede im Ansprechen auf Anthracyclin/Taxan-haltige NACT, wobei das Ansprechen als pathologische Komplettremission (pathological complete remission, pCR) bestimmt wurde. So erreichte nur eine von 57 Patientinnen mit HR+/HER2- -Karzinom eine pCR (1.8%), während die pCR-Raten bei HR+/HER2+ mit 23.1% und bei HR-/HER2- -Tumoren mit 24.2% signifikant höher waren (Odds Ratio (OR)= 16.80, 95% CI=1.59-178.12, p=0.019 und OR=17.92, 95% CI=2.13-151.04, p=0.008, jeweils verglichen mit HR+/HER2-). Trotz der geringen Ansprechrate war das krankheitsfreie Überleben (disease-free survival, DFS) bei HR+-Tumoren durchweg gut, und wurde auch bei Ko-Expression von HER2 nicht signifikant schlechter (3-Jahres-Überlebensrate: HR+/HER2- 96.3%, HR+/HER2+ 90.0%). Dagegen war trotz hoher pCR-Rate die Überlebenszeit von Patientinnen mit HR-/HER2- -Tumoren deutlich kürzer: 3-Jahres-Überlebensrate 65.0% (p=0.016 verglichen mit HR+/HER2-). Die kürzesten Intervalle bis zum Rezidiv fanden sich bei Patientinnen mit HR-/HER2+-Karzinomen: 3-Jahres-Überlebensrate 33.3% (p<0.0001, verglichen mit HR+/HER2-). Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit war, dass mit Hilfe des ki67-Proliferationsindex TNBC mit hoher Ansprechrate von solchen mit geringerer Ansprechrate unterschieden werden können (pCR-Rate 63.6% vs. 0%, p<0.0001).

Mammakarzinome mit Ko-Expression von HR und HER2 stellen eine besondere Gruppe dar, die sich durch ein gutes Ansprechen auf Anthracyclin/Taxan-haltige Chemotherapie und lange Überlebenszeiten auszeichnet. Dieser Sachverhalt wurde auch in anderen, größeren Studiengruppen gezeigt.^{55,56} Die pCR-Raten bei HER2-positiven Karzinomen konnten durch die mittlerweile standardmäßige Hinzufügung von Trastuzumab zur NACT noch gesteigert werden.⁵⁷

2.2.2. Thymosin beta 15A (TMSB15A) im triple negativen Mammakarzinom

Thymosin beta 15A (TMSB15A) is a predictor of chemotherapy response in triple negative breast cancer.

Darb-Esfahani S, Kronenwett R, von Minckwitz G, Denkert C, Gehrman M, Rody A, Budczies J, Brase JC, Mehta MK, Bojar H, Ataseven B, Karn T, Weiss E, Zahm DM, Khandan F, Dietel M, Loibl S

Br J Cancer, 2012;107(11):1892-900

Diese Arbeit war Teil einer vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)-geförderten systematischen Screening-, Training- und Validierungsstudie mit dem Ziel, prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf eine Anthracyclin/Taxan-haltige NACT zu identifizieren (NeoPredict, Fördernummer 01ES1002). Vier Patientenkohorten wurden untersucht: schockgefrorene prä-therapeutische Stanzbiopsien wurden einer Genexpressionsanalyse mit Affymetrix-Chips (U133) unterzogen, wobei hier 86 Proben aus einer populationsbasierten Kohorte stammten und 55 Proben aus der davon unabhängigen neoadjuvanten Phase III-Studie GeparTrio (NCT00544765) stammten.^{58,59} Die Trainingskohorte bestand aus 212 FFPE-Stanzen aus GeparTrio, die Validierungskohorte aus 383 Proben aus der neoadjuvanten Phase III-Studie GeparQuattro (NCT00288002),⁶⁰ wobei die FFPE-Proben mit qRT-PCR untersucht wurden.

In beiden Screening-Kohorten war TMSB15A, eine Isoform des Gens, das für Thymosin beta 15 kodiert, prädiktiv für die pCR ($p < 0.0001$, $p < 0.0042$). In der GeparTrio FFPE-Kohorte fand sich eine signifikant höhere TMSB15A-Expression in TNBC (ESR1-/HER2-) als bei luminalen Karzinomen (ESR1+/HER2-, $p < 0.0001$), sodass wir weitere Analysen in den Subgruppen separat durchführten. Bei TNBC aus der GeparTrio Trainingskohorte war TMSB15A ebenfalls ein signifikanter prädiktiver Biomarker für die pCR (OR=1.25 pro Δ CT, 95% CI=1.01-1.55, $p=0.040$), während sich in luminalen Tumoren kein signifikanter prädiktiver Effekt fand. Dieses Ergebnis ließ sich in TNBC aus GeparQuattro validieren (OR=1.26 pro Δ CT, 95% CI=1.04-1.52, $p=0.017$), ebenso wie ein Cut-off-Punkt für die TMSB15A-mRNA-Expression, der in GeparTrio mittels der oben beschriebenen Methode prädefiniert worden war und der TNBC in eine Gruppe mit geringer TMSB15A-Expression und niedriger pCR-Rate (17.0%) und eine Gruppe mit hoher TMSB15A-Expression und hoher pCR-Rate teilte (36.8%, OR=2.84, 95% CI=1.18-6.82, $p=0.020$). In der multivariaten logistischen Regression in der Trainingskohorte war die TMSB15A-Expression ein unabhängiger prädiktiver Faktor, neben dem Patientenalter und dem klinischen Tumor- (cT) und Nodalstatus (cN, $p=0.041$). Wurden die molekularen Tumortypen nicht RNA-basiert sondern, wie der aktuellen diagnostischen Praxis entsprechend immunhistochemisch bestimmt, zeigte sich in GeparTrio und GeparQuattro das gleiche Ergebnis. In der Zellkultur prüften wir, ob sich ein funktioneller Zusammenhang zwischen TMSB15A und der Chemosensitivität nachweisen ließe. Tripel negative Cal-51-Zellen zeigten hohe Expressionslevel von TMSB15A, die interessanterweise nach Induktion einer sekundären Paclitaxel-Resistenz deutlich abnahmen ($p=0.004$). Ein

knockout von TMSB15A durch siRNA in parental Cal-51-Zellen wirkte sich jedoch nicht auf die Sensitivität gegen Doxorubicin oder Paclitaxel aus, so dass ein kausaler Zusammenhang zwischen TMSB15A und Chemoresponse nicht nachweisbar war und TMSB15A somit eher als Surrogatmarker für das Ansprechen auf Anthracyclin/Taxan-haltige Chemotherapie gelten sollte.

TNBC sind eine heterogene Gruppe von Mammakarzinomen mit allgemein schlechter Prognose.³⁸ Jedoch können Patientinnen mit einem TNBC, die in der neoadjuvanten Therapie eine pCR erreichen, mit einem günstigen Lanzeitverlauf rechnen.⁶¹ Die Bestimmung des TMSB15A-mRNA-Levels als validierter Biomarker könnte bei der Entscheidung für eine NACT bei Patientinnen mit TNBC hilfreich sein. Für Patientinnen mit einem gering TMSB15A-exprimierenden Karzinom, deren Chance auf eine pCR niedriger ist, könnten wiederum alternative, experimentelle Behandlungsoptionen erwogen werden.

3. Diskussion

3.1. Der aktuelle Stand der Entwicklung von Biomarkern für das Ovarialkarzinom und Erfordernisse für die Zukunft

In den hier vorgestellten Arbeiten wurden verschiedene Biomarker im Gewebe von primären Ovarialkarzinomen auf ihre prognostische Wertigkeit hin untersucht. Einen zum Teil unabhängigen prognostischen Wert konnten wir für die Expression der LPAAT-beta, ESR1, von NF- κ B-Pathway-Komponenten und ALDH1/EGFR nachweisen. Diese Ergebnisse könnten als Grundlage von Validierungsstudien in unabhängigen Kohorten, präferentiell mit prospektivem Ansatz dienen. Dennoch haben die hier vorgestellten Marker den Weg in eine klinische Anwendung bisher nicht gefunden, ebenso wie zahlreiche andere Marker, die bis dato publiziert worden sind (eine im Januar 2013 durchgeführte PubMed-Recherche mit den Schlagwörtern „ovarian cancer“ und „pronostic factor“ ergab 1.924 Treffer). Die Tatsache, dass prognostische Biomarker sich beim Ovarialkarzinom – im Gegensatz zum Mammakarzinom – schwer in die klinische Anwendung bringen lassen, hat inhaltliche und strukturelle Gründe.

Die therapeutischen Möglichkeiten beim Ovarialkarzinom beschränken sich auf die Chirurgie und wenige zytotoxische Substanzen (vergleiche Kapitel 1.1). Mangels Therapiealternativen ergaben sich bisher aus neueren Erkenntnissen über molekulare oder histologische Subgruppen des Ovarialkarzinoms keine klinischen Konsequenzen. Auch fast alle targeted therapies haben in den bisherigen Studien keinen relevanten Nutzen beim Ovarialkarzinom gezeigt. Die erste Ausnahme stellt Bevacizumab dar, das von der AGO mittlerweile für die adjuvante Therapie des fortgeschrittenen primären Ovarialkarzinoms empfohlen wird (http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/ovar/ovar_empfehlungen_maligner_tumoren_de_12.pdf). Diese targeted therapies sind die Hauptanwendungsgebiete prädiktiver Biomarker. Auch die hier untersuchten Marker sind mit der Implikation, therapeutische Targets zu identifizieren, untersucht worden. Die LPAAT-beta ist als Zielmolekül spezifischer Inhibitoren von der US-amerikanischen Firma Cell Therapeutics Inc. selektiert worden, die die Entwicklung dieser Medikamente allerdings mittlerweile eingestellt hat. Auch NF- κ B-Inhibitoren waren vor circa fünf Jahren potentielle neue Krebsmedikamente,⁴⁴ allerdings sind bisher keine NF- κ B-Inhibitoren in fortgeschrittener klinischer Testung in soliden Tumoren angekommen. Möglicherweise riefen hier

unerwünschte Arzneimittelwirkungen Probleme hervor, da es sich bei NF- κ B um eine ubiquitär aktive Transkriptionsfaktorfamilie mit multiplen Effekten handelt.⁶² Der relativ unspezifischen und nicht selektiv NF- κ B-hemmenden Substanzen Bortezomib und Thalidomid werden allerdings bereits bei hämatologischen Malignomen, insbesondere dem Plasmozytom eingesetzt. Interessanterweise hat unsere Arbeit Hinweise darauf erbracht, dass die Aktivität des kanonischen NF- κ B-Pathway eine günstige Prognose im Ovarialkarzinom anzeigt und eine Inhibition desselben möglicherweise nicht zum Vorteil des Patienten sein könnte. Unsere Erkenntnisse über die ESR1-Expression im Ovarialkarzinom könnten Basis für neue Therapieversuche mit einer der ältesten der zielgerichteten Therapiestrategien sein, der antihormonellen Therapie. In den 80er Jahren wurden Therapieversuche mit diesen Substanzen zumeist bei rezidivierten, mehrfach vorbehandelten Ovarialkarzinomen unternommen, wobei die Ergebnisse enttäuschend waren.⁴⁸ Allerdings wurden in diesen Studien meist keine Stratifizierungen gemäß einer ER-Expression vorgenommen; was eine Ursache für die negativen Ergebnisse gewesen sein könnte. Mit der Expressionsanalyse der ESR1-mRNA bieten wir einen vielversprechenden Biomarker an und eine klinische Studie auf diesem Gebiet erscheint lohnenswert.

Zielgerichtete Therapien helfen erfahrungsgemäß nur Subgruppen von Patienten, deren Tumoren ganz bestimmte molekulare Defekte aufweisen, die eine besondere Sensibilität dem spezifischen Wirkungsmechanismus gegenüber hervorrufen. Als Beispiele seien hier HER2-positive Mammakarzinome (Trastuzumab, Lapatinib), EGFR-mutierte nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (Gefitinib, Erlotinib) oder auch c-kit-mutierte gastrointestinale Stromatumoren (Imatinib) genannt. Während die Kenntnisse über die molekularen Grundlagen des Ovarialkarzinoms bis vor etwa 10 Jahren stagnierten, gab es in den letzten Jahren einen starken Wissenszuwachs, der potentiell zu einer hilfreichen molekularen Subtypisierung der Ovarialkarzinome führen wird.⁶³ Diese sollte letztendlich Subgruppen definieren, die von bestimmten Therapeutika profitieren und die Entwicklung von neuen targeted therapies befördern. Eine wichtige neue Erkenntnis ist, dass die histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms sich in molekularer, ätiopathogenetischer und prognostischer Hinsicht deutlich unterscheiden. Köbel et al. zeigten, dass zahlreiche immunhistochemische Marker in den histologischen Subtypen differentiell exprimiert werden und darüber hinaus ihre prognostische Relevanz innerhalb der Subtypen zum Teil völlig unterschiedlich ist.⁶⁴ Wir sind diesen Erkenntnissen in unseren jüngeren Projekten

dadurch nachgekommen, dass wir Biomarker auch separat innerhalb der größten histologischen Gruppe der serösen Karzinome analysierten, so bei der Untersuchung des NF- κ B-Pathway und von ESR1. Bei der Untersuchung der ALDH1-Expression beschränkten wir uns dann nur noch auf die homogene Gruppe der HGSC. Diese machen etwa 70% der Ovarialkarzinome aus, die neueren, sich verdichtenden Erkenntnissen gemäß wahrscheinlich über eine Vorläuferläsion (STIC) aus der Tubenschleimhaut hervorgehen.¹¹ Diese Erkenntnis wird die Konsequenz haben, dass bei Vergleichen zwischen HGSC und Ursprungsgewebe das Tubenepithel und nicht mehr wie bisher meist geschehen das ovarielle Oberflächenepithel untersucht werden wird. Die Ergebnisse des TCGA-Projektes bestätigte frühere Erkenntnisse, dass praktisch alle HGSC p53-Mutationen sowie eine hohe chromosomale Instabilität aufweisen, die in circa 50% der Fälle auf genetische Aberrationen von Regulatoren der homologen Rekombination, unter anderem BRCA1/2 zurückzuführen sind.¹⁰ Als potentiell nützliche Therapeutika für diese Fälle galten kürzlich Inhibitoren der Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP) sein; diese hatten sich in mehreren Phase-II-Studien bereits als vielversprechend herausgestellt,⁶⁵ jedoch machten sich bei einigen Substanzen später Probleme mit der Spezifität bemerkbar und Zweifel an einem Effekt auf das Langzeitüberleben kamen auf. Ob PARP-Inhibitoren bei bestimmten Patientensubgruppen einen Nutzen haben, wird jedoch noch weiterhin in laufenden Studien untersucht. Auch andere häufig im HGSC alterierte Pathways sind im TCGA-Projekt identifiziert worden, für die zum Teil bereits spezifische Inhibitoren existieren. Inwiefern die vier transkriptionellen, drei Mikro-RNA-, vier Promotormethylierungs-Subtypen sowie die prognostische Genexpressionssignatur für individuelle Therapienentscheidungen nützliche Subtypen darstellen werden, werden zukünftige Studien zeigen. Die vier transkriptionellen Subtypen des HGSC, bezeichnet als immunoreactive, differentiated, proliferative und mesenchymal sind praktisch identisch mit bereits 2008 durch Genexpressionsanalyse gefundenen Subtypen, haben prognostische Potenz und überlappen teilweise mit den miRNA-Subtypen.⁶⁶ Die selteneren histologischen Ovarialkarzinomtypen (EC, CCC, MC, LGSC) werden hinreichend lediglich im Multicentersetting untersucht werden können, um ausreichende Fallzahlen erreichen zu können. Kleinere Fallserien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass MC häufig HER2-amplifiziert sind,^{16,17} die Endometriose-assoziierten CCC und EC Karzinome dagegen häufig pathogenetische Mutationen im Tumorsuppressorgen ARID1A,¹⁴ die EC außerdem phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10

(PTEN)- oder beta-Catenin (CTNNB1)-Mutationen aufweisen.^{67,68} Hieraus könnten sich in Zukunft spezifische Therapieoptionen herausbilden (zum Beispiel HER2-Inhibitoren für MC, Inhibitoren des PI3K/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) für EC). Auch zukünftige Therapiestudien werden im Multicentersetting stattfinden müssen, wobei die Evaluation zugehöriger prädiktiver Biomarker idealerweise parallel gehen sollte.

Die Herausforderung in der gewebebasierten translationalen Ovarialkarzinomforschung wird in den nächsten Jahren sein, die relevanten neuen molekularen Subgruppen durch im FFPE-Routinematerial anwendbare Biomarkerassays zu definieren, eine Aufgabe, der sich unter anderem das von der EU geförderte FP7-Projekt OCTIPS, an dem auch unsere Gruppe beteiligt ist, widmen wird (<http://www.octips.eu/>). Seit mehreren Jahren ist unsere Gruppe zudem Partner in der Tumor Bank Ovarian Cancer (TOC, <http://www.toc-network.de/>), die von unseren Kooperationspartnern in der Frauenklinik der Charité, CVK (Prof. Jalid Sehouli) geleitet wird. In TOC sammeln Partner aus mehreren europäischen Ländern prospektiv Tumorgewebe sowie Aszites-, Blut- und Serumproben von Ovarialkarzinompatientinnen und dokumentieren standardisiert klinisch-pathologische Variablen und Überlebensdaten. Im Dezember 2012 war Biomaterial von insgesamt 2.184 Patientinnen im TOC archiviert. Proben und Daten werden den Partnern für Projekte zur Verfügung gestellt. Multicentersetting und Standardisierung in TOC ermöglichen qualitativ hochwertige Forschungsprojekte, insbesondere bei selteneren Ovarialkarzinomsubgruppen. Ein weiterer struktureller Fortschritt in der Ovarialkarzinomforschung sollte die Implementierung translationaler Forschungsprogramme innerhalb von klinischen Studien sein, die bei häufigeren Tumoren wie dem Mammakarzinom mittlerweile Standard sind. Eine wesentliche Komponente dieser translationalen Programme sollte insbesondere die prospektive zentrale Gewebesammlung sein, die die Beantwortung prädefiniertes Fragestellungen erlaubt, aber auch die retrospektive Prüfung von zum späteren Zeitpunkt aufkommenden Hypothesen zulässt. Die erste Ovarialkarzinomstudie, für die unsere Gruppe die zentralpathologische Beurteilung liefert, ist die PROVE-Studie (NCT01388621), die den Nutzen des EGFR-Inhibitors Panitumumab beim rezidivierten, platinsensitiven Ovarialkarzinom prüft. An unserem Institut erfolgt dabei die Bestimmung des k-ras-Mutationsstatus, die Voraussetzung für die Studienteilnahme ist.

3.2. Entwicklung von Biomarkern für prognostisch ungünstige molekulare Subgruppen des Mammakarzinoms

In den beiden hier vorgestellten Studien zum Mammakarzinom definierten wir eine vereinfachte molekulare Tumortypisierung des Mammakarzinoms mit prädiktivem und prognostischem Wert bei NACT und identifizierten TMSB15A als hilfreichen Marker für die Stratifizierung von TNBC für eine NACT. Bei TMSB15A handelt es sich dabei um einen in einer systematischen Screening-, Training- und Validierungsstudie in unabhängigen Kohorten geprüften Marker. Unsere Ergebnisse tragen zu den Kenntnissen über das Ansprechen der molekularen Subtypen auf Chemotherapie bei und haben das Potential, in die Entscheidungsfindung in der Klinik einbezogen zu werden. Die Studien entstanden im Kontext eines bereits umfangreichen Wissens über die molekularen Grundlagen des Mammakarzinoms und unter Nutzung bereits vorhandener weitentwickelter Strukturen für die translationale Forschung. Seit 2005 wird von unserer Arbeitsgruppe (AG Translationale Tumorforschung, Professor Denkert, Institut für Pathologie der Charité) die zentrale Gewebebank für die Studien der GBG betreut. In der Tumorbank werden prä-therapeutische Stanzbiopsien und Gewebe von Operationspräparaten retrospektiv und bei neueren Studien auch prospektiv zusammengetragen. Im Januar 2013 waren circa 14.000 Proben aus neoadjuvanten und adjuvanten Studien in der Tumorbank archiviert. Um einen hohen Probendurchsatz bei IHC-Studien zu ermöglichen, hat unserer Arbeitsgruppe eine Technik entwickelt, prä-therapeutische Stanzbiopsien auf einen TMA zu bringen. Entsprechend kontinuierlich aktualisierter standard operating procedures (SOP) wird während der TMA-Herstellung von den Stanzbiopsien auch Material für die Extraktion RNA und DNA asserviert. Publiziert wurden neben den hier vorgestellten mehrere weitere Forschungsprojekte, die TMAs und Nukleinsäuren aus den neoadjuvanten Studien GeparDuo, GeparTrio und GeparQuattro genutzt haben.⁶⁹⁻⁷⁵

Die NACT, die in ihrer Anfangszeit inoperablen, insbesondere inflammatorischen Mammakarzinomen vorbehalten war, ist mittlerweile eine Behandlungsoption des operablen Mammakarzinoms geworden.^{23,24} Das Ansprechen auf die Therapie kann klinisch durch Palpation und Sonographie festgestellt werden, der Goldstandard dafür ist aber das histopathologische Regressionsgrading am post-chemotherapeutischen Tumor(bett)resektat (zum Beispiel das Regressionsgrading nach Sinn et al.).⁷⁶ Die pCR ist das Ziel jeder NACT und

primärer Endpunkt in neoadjuvanten Therapiestudien. Gemeinhin ist eine pCR als vollständiges Fehlen invasiv wachsender Tumorzellen im Tumorbett und in den axillären Lymphknoten definiert (ypT0/Tis, ypN0). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die pCR ein Surrogatmarker für das Langzeitüberleben ist.⁷⁷⁻⁷⁹ Aktuelle Metaanalysen aller bisher von unseren Kooperationspartnern von der GBG durchgeführten Studien zeichnen ein differenzierteres Bild, wobei die pCR insbesondere bei HER2-positiven Karzinomen und TNBC ein wichtiger Prognosemarker ist, während luminalen Karzinome selten pCRs erreichen und dennoch meist ein sehr gutes Überleben zeigen.⁶¹ Letzteres konnten wir in unserer Arbeit zu den molekularen Tumortypen in der GeparDuo-Studie auch zeigen; mittlerweile ist dies ein mehrfach belegter Sachverhalt. Abgesehen vom therapeutischen Nutzen für die Patientinnen bietet die NACT auch ein großes Potential für Biomarkerstudien, da prädiktive Marker schnell auf ihren Wert hin evaluiert werden können, denn die langen Nachbeobachtungs-Phasen, die außerdem zusätzlich durch andere Einflüsse als den Therapieeffekt beeinflusst werden, entfallen hier.

Die beiden hier vorgestellten Arbeiten zum Mammakarzinom, die Proben aus GeparDuo, GeparTrio und GeparQuattro untersuchten, zeigen exemplarisch, welchen großen Einfluss biologische Subgruppen auf das Ansprechen auf eine Chemotherapie und auf das Überleben der Patientinnen haben. So zeigten wir in der GeparDuo-Studie, wie stark sich Mammakarzinome unterschiedlicher Rezeptorexpression in pCR-Raten und Langzeitprognose unterscheiden. Unsere Arbeit über GeparTrio und GeparQuattro zeigt, wie wichtig die Beachtung molekularer Subgruppen auch für die Biomarkerevaluation ist. Für TMSB15A zeigte sich nämlich ein prädiktiver Wert lediglich für die TNBC, während es bei luminalen Karzinomen nicht signifikant hilfreich war. Die Evaluierung eines Biomarkers in einer Gesamtkohorte gemischter Subtypen kann demnach zu verfälschten Ergebnissen führen. Auch therapeutisch müssen die unterschiedlichen Subtypen separat angegangen werden, was auch zunehmend umgesetzt wird. Erhielten zum Beispiel in der GeparDuo- und GeparTrio-Studie noch alle Patientinnen eine identische Chemotherapie, wurden der NACT in der GeparQuattro-Studie und den nachfolgenden Studien bei HER2-Positivität HER2-Inhibitoren hinzugefügt. Neuere Studien testen bereits differenzierte Therapieregime für Subtypen des Mammakarzinoms. So widmet sich die laufende GeparSixto-Studie (NCT01426880) lediglich den HER2-positiven Karzinomen und den TNBC. Beide Typen zeichnen sich im Vergleich zur der luminalen Gruppe durch eine intrinsische schlechte

Prognose aus. Bei den HER2-Positiven sind die Überlebensraten seit Einführung des spezifischen HER2-inhibierenden Therapie mit Trastuzumab deutlich gestiegen, jedoch weist ein signifikanter Teil der Patientinnen eine primäre Resistenz gegen Trastuzumab auf, die auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen ist, zum Beispiel auf eine kompensatorische Überaktivität des PI3K/AKT/mTOR-Pathway.³⁷ Diese Patientinnen benötigen also, damit Trastuzumab seine Wirkung entfalten kann, zusätzliche Therapien, zum Beispiel mit Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Pathway. Entsprechende Substanzen befinden sich bereits in klinischer Testung.⁸⁰ Zur Identifikation der Patientinnen, bei denen eine primäre Resistenz gegen Trastuzumab zu erwarten ist und zur Identifikation des spezifischen Resistenzmechanismus wiederum sind Biomarker erforderlich. TNBC sind insofern die problematischste Gruppe von Mammakarzinomen, weil bisher keine spezifische Therapie gegen sie existiert. Es handelt sich um eine heterogene Gruppe von Tumoren, relativ unscharf umrissen durch die gemeinsame Charakteristik des Fehlens einer ER-, PR und HER2-Expression (= tripel negativ) und inkomplett mit der durch Genexpressionsprofiling definierten Gruppe der basal-like Karzinome überlappend.⁸¹ Da Patientinnen mit TNBC im Falle einer pCR jedoch mit einem günstigen Verlauf rechnen dürfen, ist die Identifikation von Tumoren mit großer Chance auf ein Therapieansprechen für die Entscheidung zur NACT sehr wichtig. In unseren hier vorgestellten Arbeiten konnten wir den ki67-Proliferationsindex und TMSB15A als prädiktive Marker für TNBC finden. Anders als bei den HER2-positiven Tumoren allerdings gibt es für die TNBC ohne pCR (noch) keine alternativen Therapien. Die klinische Problematik ähnelt hier der Situation bei den HGSC, was zum Teil dadurch erklärt werden kann, dass diese beiden Tumortypen sich auch auf molekularer Ebene sehr ähneln (p53- und BRCA-Mutationen, Defekte in der homologen Rekombination mit resultierender chromosomaler Instabilität). Nicht überraschend wurde deshalb auch bei den TNBC wie beim HGSC große Hoffnung auf PARP-Inhibitoren gesetzt.⁸² Studien, die die Wertigkeit dieser Medikamente beim TNBC prüfen, laufen zurzeit. Als weiteres Medikament mit Potential bei TNBC wurde Bevacizumab in der GeparQuinto-Studie identifiziert (NCT00567554).⁸³

Der Erfordernis, prädiktive Biomarker für prognostisch ungünstige Subgruppen wie dem HER2-positiven Karzinom, dem luminal B-Subtyp oder dem TNBC zu entwickeln, trägt unsere Gruppe in aktuellen Forschungsprojekten Rechnung. Im Rahmen des aktuell angelaufenen EU-geförderten F7-Projektes Responsify (<http://www.responsify-fp7.eu/>) werden die bestehenden Kollektive erweitert und Proben von GeparQuinto, GeparSixto sowie TECHNO⁸⁴

aufbereitet und analysiert. Ziel ist eine systematisierte Identifikation und Validierung von prädiktiven Biomarkern, die für die Patientenstratifizierung sowohl für konventionelle Chemotherapie als auch für die zielgerichtete Therapie von Nutzen sein sollen. Ein wichtiger Teil von Responsify ist dabei auch die prospektive Validierung von Markern in der aktuell rekrutierenden GeparSixto-Studie, die bereits in retrospektiven Analysen der vorhandenen Studienkollektive gefunden worden sind. Die mRNA-Expression von TMSB15A im TNBC gehört unter anderem dazu.

3.3. Die Methodik der Biomarkerbestimmung am Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebetteten-Gewebe

In den hier vorstellten Arbeiten wurden die Biomarkeranalysen am FFPE-Gewebe durchgeführt, das sich dadurch auszeichnet, dass es in der klinischen und histopathologischen Routine verwendet wird und damit von jedem in der Pathologie befundeten Fall in ausreichender Menge vorliegt. Die am häufigsten verwendeten Methoden waren die IHC sowie die qRT-PCR. Beides sind mittlerweile gut etablierte Techniken, die auch im Hochdurchsatzverfahren anwendbar sind. Die IHC ist ein Standardverfahren in der Pathologie, sie ermöglicht die Beurteilung der Expression von spezifischen Proteinen, wobei die Färbesignale lichtmikroskopisch exakt den exprimierenden Zellen zugeordnet werden können, das heißt es kann zum Beispiel eine Proteinexpression im Stroma oder in Entzündungszellen von jener in den Tumorzellen unterschieden werden. Die qRT-PCR aus FFPE-Gewebe ist eine im Vergleich dazu junge Methode, wobei unter anderem einige der hier vorgestellten Arbeiten zu ihrer Etablierung als Standardmethode beigetragen haben. Alle Arbeiten, die die qRT-PCR beinhalten, sind in intensiver Kooperation mit Sividon Diagnostics GmbH, Köln (früher Siemens Health Care) entstanden, wobei Sividon maßgeblich zur Entwicklung der Nukleinsäureextraktion aus FFPE-Gewebe und der qRT-PCR-Assays beigetragen hat. Die qRT-PCR hat gegenüber der IHC zwei große Vorteile: 1. Sie ist quantitativ und 2. Sie ist objektiv und Untersucher-unabhängig. Die Expressionsbestimmung desselben Faktors auf Protein- und mRNA-Ebene erbringt nicht unbedingt identische Informationen. So zeigten wir, dass die ESR1-Genexpression im Ovarialkarzinom prognostische Bedeutung hatte, jedoch nicht die ER-Proteinexpression, obwohl beide Faktoren miteinander korreliert waren. Insbesondere in der ER-negativen Gruppe fiel auf, dass hier eine signifikante Menge an ESR1-positiver Tumoren enthalten waren, die qRT-PCR

also sensitiver war. Bei der IHC werden erst starke Unterschiede im Expressionslevel in Signalintensitätsunterschiede umgesetzt, die qRT-PCR detektiert dagegen bereits winzige Unterschiede. Für die Bestimmung des ER-Gehaltes im Ovarialkarzinom scheint also letztere Methode die geeignetere zu sein. Im Mammakarzinom ist der prognostische und prädiktive Effekt der ER-Proteinexpression gut etabliert,⁸⁵ aber auch hier stellen die Objektivität und Quantifizierbarkeit der qRT-PCR einen Vorteil dar. So zeigten wir, dass im Mammakarzinom die Expressionsdaten von ER, PR und HER2 auf Protein- und RNA-Ebene stark miteinander korrelierten und gleich guten prognostischen und prädiktiven Wert hatten.⁷³ Die HER2-qRT-PCR war in der Aussage einem standardisierten, zentral mit IH und Silber-verstärkter ISH (SISH) bestimmten HER2-Status ebenbürtig.⁷⁴ In allen translationalen Studien an den neoadjuvanten Studienkohorten bestimmen wir daher den Rezeptorstatus bevorzugt per qRT-PCR. Dies erfolgte auch in der hier vorgestellten Studie zur TMSB15A-Expression und ermöglichte so eine trennscharfe Unterscheidung von TNBC von luminalen Mammakarzinomen. Als Nachteile der qRT-PCR aus FFPE-Gewebe ist zu erwähnen, dass es sich (noch) nicht um eine in allen pathologischen Laboren etablierte Standardmethode handelt, ferner, dass die gemessene mRNA-Menge aus dem gesamten Gewebe stammt und nicht selektiv den Tumorzellen zugeordnet werden kann. So können Marker, die differentiell im Stroma oder im Entzündungszellinfiltrat und im Tumor selbst exprimiert werden, verfälscht abgebildet werden. Wir begegnen diesem Problem, indem wir für die qRT-PCR mindestens eine Tumorzellmenge von 30% fordern und gegebenenfalls den Tumoranteil durch manuelle Mikrodissektion erhöhen. Welche Bestimmungsmethode für welchen Biomarker die am besten geeignete ist, muss empirisch festgestellt werden. Weitere Methoden, die an FFPE-Gewebe anwendbar sind, sind RNA/DNA-In-Situ-Hybridisierungen, Mutationsanalysen und mit gewissen Einschränkungen Genexpressionsprofiling und deep-sequencing-Methoden. Einige dieser Methoden gehören mittlerweile zum diagnostischen Standard, zum Beispiel Translokationsanalysen in mesenchymalen Tumoren mittels Fluoreszenz-ISH (FISH) oder sind etablierte prädiktive Biomarker, zum Beispiel die EGFR-Mutationsanalyse in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen mittels Sequenzierung. Die hier vorgestellten Arbeiten sollten dazu beitragen, dass auch die qRT-PCR in die Auswahl der routinemäßig anwendbaren Methoden aufgenommen wird. Gelungen ist dies bereits mit dem Endopredict-Test, der aus dem NeoPredict-Projekt weiterentwickelt wurde (BMBF-Fördernummer 01ES1002), aus dem unter anderem TMSB15A als Marker hervorging

(<http://www.sividon.com/endopredict.html>). Dieser Test beruht auf der Expressionsbestimmung von 12 Genen mittels qRT-PCR aus FFPE-Gewebe und gibt eine unabhängige Information über die Langzeitprognose (fernmetastasenfreies Überleben) von luminalen Mammakarzinomen und hilft bei der Entscheidung, ob eine adjuvante Chemotherapie notwendig oder eine alleinige endokrine Therapie ausreichend ist.^{86,87} Er wird an 25 pathologischen Institutes im deutschsprachigen Raum angeboten und ist hier mittlerweile ein bei den behandelnden Klinikern etabliertes diagnostisches Verfahren für das luminale Mammakarzinom.

3.4. Ausblick

Ovarial- und Mammakarzinome werden zunehmend als heterogene Gruppen von Tumoren wahrgenommen, die sich durch Unterschiede in den molekularen Grundlagen, der Ätiologie, dem Therapieansprechen und der Prognose auszeichnen. Das bis vor einigen Jahren geltende Therapieprinzip des „one size fits it all“ gilt hier nicht mehr. Im Mammakarzinom haben diese Erkenntnisse bereits in gewissem Maße auf die Therapie ausgewirkt und es existieren Biomarker zur Subtypisierung. Die Verfeinerung der Trennschärfe dieser Biomarker und die Identifikation weiterer, in der klinischen Routine für die Therapienentscheidung hilfreicher Biomarker im Rahmen von klinischen Studien ist unser Anliegen für die Zukunft. Im Ovarialkarzinom sind die Kenntnisse über die molekularen Subtypen noch nicht so weitreichend. Marker für die Definition der Subtypen sind notwendig; spezifische Therapien für die Subtypen müssen entwickelt und geprüft werden. Die Etablierung von Tumorkollektiven aus klinischen Studien sowie die Kooperation im interdisziplinären Multicentersetting wie im EU-Projekt OCTIPS und im translationalen Forschungsverbund TOC werden Schwerpunkte zukünftiger Forschungsprojekte sein.

4. Zusammenfassung

Trotz aller neuen therapeutischen Ansätze haben Ovarialkarzinome immer noch eine sehr ungünstige Prognose. Neue Forschungsergebnisse zeigen die molekulare Heterogenität dieser Tumoren auf; dies kann in der Zukunft zu einer weiteren Differenzierung der therapeutischen Strategien führen. Diese molekulare Differenzierung ist für das Mammakarzinom bereits klinische Realität, hier stellen vor allem die prognostisch ungünstigen Subgruppen ein Problem dar. Für beide Tumorentitäten werden zusätzliche Biomarker zur Definition von therapeutisch relevanten Subgruppen benötigt.

Für das Mammakarzinom konnte in den hier zusammengefassten Arbeiten gezeigt werden, dass durch eine standardisierte Tumortypisierung mittels ER-, PR- und HER2-Expressionsanalyse Subgruppen definiert werden, die sich in Prognose und Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie deutlich unterscheiden. In der Subgruppe der HER2-positiven Tumoren bestehen deutliche Unterschiede bei Tumoren mit und ohne Ko-Expression von Hormonrezeptoren. In der prognostisch ungünstigen Gruppe der tripel negativen Mammakarzinome konnten wir in einer systematischen Screening-, Training- und Validierungsstudie TMSB15A als neuen molekularen Marker für das Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie identifizieren. Unsere Ergebnisse vertiefen das Wissen über die Chemosensitivität der molekularen Mammakarzinom-Subtypen und könnten die Grundlage für neue Ansätze zur Indikationsstellung für eine neoadjuvante Chemotherapie bilden. Die molekularen Marker werden derzeit in klinischen Studienkohorten weiter validiert.

Für das Ovarialkarzinom war ein wesentliches Element unserer Untersuchungen die Schaffung von Strukturen, die - analog zum Mammakarzinom - die Biomarkerevaluation in klinischen Kohorten ermöglichen. Parallel zu den Untersuchungen beim Mammakarzinom haben wir auch im Ovarialkarzinom die Expression des Östrogenrezeptors untersucht. Hier zeigt die quantitative Bestimmung auf mRNA Ebene mittels RT-PCR deutliche Vorteile gegenüber der klassischen Bestimmung mittels Immunhistochemie. Mit der qRT-PCR konnten wir somit eine neue Methode etablieren, die prognostisch relevante Unterschiede in der Östrogenrezeptorexpression detektierte, die mit der Immunhistochemie nicht nachgewiesen werden konnten.

Als weitere Marker wurden beim Ovarialkarzinom in den hier vorgestellten Arbeiten die LPAAT- β , ALDH1 sowie Komponenten des kanonischen NF- κ B-Pathway im Gewebe von primären Ovarialkarzinomen auf Protein- und teils auch auf mRNA-Ebene untersucht. Hier konnte unter anderem gezeigt werden, dass ALDH1/EGFR-ko-exprimierende Karzinome eine Subgruppe mit extrem schlechter Prognose darstellen, die möglicherweise einer Therapie mit EGFR-Inhibitoren zugänglich sein könnte.

Unsere Ergebnisse bilden die Grundlage für die weitere Evaluierung der untersuchten Proteine als therapeutische Zielmoleküle und schaffen eine methodische Basis für neue prädiktive Tests für zielgerichtete Therapien.

5. Literaturangaben aus dem freien Text

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(1):10-29.
2. Gemeinsames Krebsregister der Länder Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und der Freistaaten Sachsen und Thüringen (Hrsg.). *Krebsinzidenz und Krebsmortalität 2005-2006 (Jahresbericht)*, Berlin 1/2009.
3. Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, Reding DJ, Greenlee RT, Yokochi LA, Kessel B, Crawford ED, Church TR, Andriole GL, Weissfeld JL, Fouad MN, Chia D, O'Brien B, Ragard LR, Clapp JD, Rathmell JM, Riley TL, Hartge P, Pinsky PF, Zhu CS, Izmirlian G, Kramer BS, Miller AB, Xu JL, Prorok PC, Gohagan JK, Berg CD; PLCO Project Team. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 2011;305(22):2295-303.
4. Moore RG, MacLaughlan S, Bast RC Jr. Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2010;116(2):240-5.
5. Deutsche Krebsgesellschaft, Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. in der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (Hrsg.). *Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren.* Zuckschwerdt Verlag GmbH, 2007.
6. Bast RC Jr, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(6):415-28.
7. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, Mannel RS, Homesley HD, Fowler J, Greer BE, Boente M, Birrer MJ, Liang SX; Gynecologic Oncology Group. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2011;365(26):2473-83.
8. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, Kurzeder C, du Bois A, Sehouli J, Kimmig R, Stähle A, Collinson F, Essapen S, Gourley C, Lortholary A, Selle F, Mirza MR, Leminen A, Plante M, Stark D, Qian W, Parmar MK, Oza AM; ICON7 Investigators. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2011;365(26):2484-96.
9. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch.* 2012;460(3):237-49.
10. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011;474(7353):609-15.
11. Kurman RJ, Shih IeM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(3):433-43.
12. Kurman RJ, Shih IeM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol.* 2011;42(7):918-31.
13. Singer G, Oldt R 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih IeM. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(6):484-6.
14. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, Senz J, McConechy MK, Anglesio MS, Kalloger SE, Yang W, Heravi-Moussavi A, Giuliany R, Chow C, Fee J, Zayed A, Prentice L, Melnyk N,

- Turashvili G, Delaney AD, Madore J, Yip S, McPherson AW, Ha G, Bell L, Fereday S, Tam A, Galletta L, Tonin PN, Provencher D, Miller D, Jones SJ, Moore RA, Morin GB, Oloumi A, Boyd N, Aparicio SA, Shih leM, Mes-Masson AM, Bowtell DD, Hirst M, Gilks B, Marra MA, Huntsman DG. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med*. 2010;363(16):1532-43.
15. Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer*. 1997;79(8):1581-6.
 16. McAlpine JN, Wiegand KC, Vang R, Ronnett BM, Adamiak A, Köbel M, Kalloger SE, Swenerton KD, Huntsman DG, Gilks CB, Miller DM. HER2 overexpression and amplification is present in a subset of ovarian mucinous carcinomas and can be targeted with trastuzumab therapy. *BMC Cancer*. 2009;9:433.
 17. Yan B, Choo SN, Mulyadi P, Srivastava S, Ong CW, Yong KJ, Putti T, Salto-Tellez M, Lim GS. Dual-colour HER2/chromosome 17 chromogenic in situ hybridisation enables accurate assessment of HER2 genomic status in ovarian tumours. *J Clin Pathol*. 2011;64(12):1097-101.
 18. Tavassoli FA, Devilee P Eds.). World Health Organization Classification of Tumours,. Pathology, and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press, Lyon, 2003.
 19. Cuatrecasas M, Catusus L, Palacios J, Prat J. Transitional cell tumors of the ovary: a comparative clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic analysis of Brenner tumors and transitional cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(4):556-67.
 20. DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(6):409-18.
 21. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, Mandelblatt JS, Yakovlev AY, Habbema JD, Feuer EJ; Cancer Intervention and Surveillance Modeling Network (CISNET) Collaborators. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1784-92.
 22. Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) (Hrsg.). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Zuckschwerdt Verlag GmbH, 2012
 23. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736-47.
 24. Kaufmann M, von Minckwitz G, Mamounas EP, Cameron D, Carey LA, Cristofanilli M, Denkert C, Eiermann W, Gnant M, Harris JR, Karn T, Liedtke C, Mauri D, Rouzier R, Ruckhaeberle E, Semiglazov V, Symmans WF, Tutt A, Pusztai L. Recommendations from an International Consensus Conference on the Current Status and Future of Neoadjuvant Systemic Therapy in Primary Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(5):1508-16.
 25. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver. World Health Organization Classification of tumors of the breast. IARC Prsee, Lyon, 2012.

26. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 17;406(6797):747-52.
27. Carey LA. Through a glass darkly: advances in understanding breast cancer biology, 2000-2010. *Clin Breast Cancer*. 2010;10(3):188-95.
28. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Bégin LR, Goffin JR, Wong N, Trudel M, Akslen LA. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;1;95(19):1482-5.
29. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8(5):R76.
30. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8418-23.
31. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 2;100(18):10393-8.
32. Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, Glas AM, Perou CM, Van't Veer LJ. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(20):9155-8.
33. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.
34. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-7.
35. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367-74.
36. Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, Rakha E, Paish C, Robertson JF, Macmillan D, Blamey RW, Ellis IO. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer*. 2005;116(3):340-50.

37. Bedard PL, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ. Stemming resistance to HER-2 targeted therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009;14(1):55-66.
38. Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist*. 2011;16 Suppl 1:1-11.
39. Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Hasumi K, Akiyama F, Silverberg SG. Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. I. Prognostic significance of histopathologic features--problems involved in the architectural grading system. *Gynecol Oncol*. 1998;70(1):2-12.
40. Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(8):582-91.
41. English D. Phosphatidic acid: a lipid messenger involved in intracellular and extracellular signalling. *Cell Signal*. 1996;8(5):341-7.
42. Diefenbach CS, Soslow RA, Iasonos A, Linkov I, Hedvat C, Bonham L, Singer J, Barakat RR, Aghajanian C, Dupont J. Lysophosphatidic acid acyltransferase-beta (LPAAT-beta) is highly expressed in advanced ovarian cancer and is associated with aggressive histology and poor survival. *Cancer*. 2006;107(7):1511-9.
43. Springett GM, Bonham L, Hummer A, Linkov I, Misra D, Ma C, Pezzoni G, Di Giovine S, Singer J, Kawasaki H, Spriggs D, Soslow R, Dupont J. Lysophosphatidic acid acyltransferase-beta is a prognostic marker and therapeutic target in gynecologic malignancies. *Cancer Res*. 2005;65(20):9415-25.
44. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):301-10.
45. Annunziata CM, Stavnes HT, Kleinberg L, Berner A, Hernandez LF, Birrer MJ, Steinberg SM, Davidson B, Kohn EC. Nuclear factor kappaB transcription factors are coexpressed and convey a poor outcome in ovarian cancer. *Cancer*. 2010;116(13):3276-84.
46. Hernandez L, Hsu SC, Davidson B, Birrer MJ, Kohn EC, Annunziata CM. Activation of NF-kappaB signaling by inhibitor of NF-kappaB kinase beta increases aggressiveness of ovarian cancer. *Cancer Res*. 2010;70(10):4005-14.
47. Langdon SP, Crew AJ, Ritchie AA, Muir M, Wakeling A, Smyth JF, Miller WR. Growth inhibition of oestrogen receptor-positive human ovarian carcinoma by anti-oestrogens in vitro and in a xenograft model. *Eur J Cancer*. 1994;30A(5):682-6.
48. Tropé C, Marth C, Kaern J. Tamoxifen in the treatment of recurrent ovarian carcinoma. *Eur J Cancer*. 2000;36 Suppl 4:S59-61.
49. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Györfy 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(12):e51862.
50. Burga LN, Hu H, Juvekar A, Tung NM, Troyan SL, Hofstatter EW, Wulf GM. Loss of BRCA1 leads to an increase in epidermal growth factor receptor expression in mammary epithelial cells, and epidermal growth factor receptor inhibition prevents estrogen receptor-negative cancers in BRCA1-mutant mice. *Breast Cancer Res*. 2011;13(2):R30.

51. Noske A, Schwabe M, Weichert W, Darb-Esfahani S, Buckendahl AC, Sehouli J, Braicu EI, Budczies J, Diemel M, Denkert C. An intracellular targeted antibody detects EGFR as an independent prognostic factor in ovarian carcinomas. *BMC Cancer*. 2011;11:294.
52. Sheng Q, Liu J. The therapeutic potential of targeting the egfr family in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2011;104:1241-1245.
53. de Graeff P, Crijns AP, de Jong S, Boezen M, Post WJ, de Vries EG, van der Zee AG, de Bock GH. Modest effect of p53, egfr and her-2/neu on prognosis in epithelial ovarian cancer: A meta-analysis. *Br J Cancer*. 2009;101(1):149-159.
54. von Minckwitz G, Raab G, Caputo A, Schütte M, Hilfrich J, Blohmer JU, Gerber B, Costa SD, Merkle E, Eidtmann H, Lampe D, Jackisch C, du Bois A, Kaufmann M. Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPARDUO study of the German Breast Group. *J Clin Oncol*. 2005 20;23(12):2676-85.
55. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Puzstai L. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;10;26(8):1275-81.
56. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007;13(8):2329-34.
57. Houssami N, Macaskill P, von Minckwitz G, Marinovich ML, Mamounas E. Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2012;48(18):3342-54.
58. von Minckwitz G, Kümmel S, Vogel P, Hanusch C, Eidtmann H, Hilfrich J, Gerber B, Huober J, Costa SD, Jackisch C, Loibl S, Mehta K, Kaufmann M; German Breast Group. Neoadjuvant vinorelbine-capecitabine versus docetaxel-doxorubicin-cyclophosphamide in early nonresponsive breast cancer: phase III randomized GeparTrio trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(8):542-51.
59. von Minckwitz G, Kümmel S, Vogel P, Hanusch C, Eidtmann H, Hilfrich J, Gerber B, Huober J, Costa SD, Jackisch C, Loibl S, Mehta K, Kaufmann M; German Breast Group. Intensified neoadjuvant chemotherapy in early-responding breast cancer: phase III randomized GeparTrio study. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(8):552-62.
60. von Minckwitz G, Rezai M, Loibl S, Fasching PA, Huober J, Tesch H, Bauerfeind I, Hilfrich J, Eidtmann H, Gerber B, Hanusch C, Kühn T, du Bois A, Blohmer JU, Thomssen C, Dan Costa S, Jackisch C, Kaufmann M, Mehta K, Untch M. Capecitabine in addition to anthracycline- and taxane-based neoadjuvant treatment in patients with primary breast cancer: phase III GeparQuattro study. *J Clin Oncol*. 2010;28(12):2015-23.
61. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, Gerber B, Eiermann W, Hilfrich J, Huober J, Jackisch C, Kaufmann M, Konecny GE, Denkert C, Nekljudova V, Mehta K, Loibl S. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012;30(15):1796-804.

62. Baud V, Karin M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(1):33-40.
63. Vaughan S, Coward JI, Bast RC Jr, Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, Coukos G, Crum CC, Drapkin R, Etemadmoghadam D, Friedlander M, Gabra H, Kaye SB, Lord CJ, Lengyel E, Levine DA, McNeish IA, Menon U, Mills GB, Nephew KP, Oza AM, Sood AK, Stronach EA, Walczak H, Bowtell DD, Balkwill FR. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(10):719-25.
64. 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;5(12):e232.
65. Banerjee S, Kaye SB, Ashworth A. Making the best of PARP inhibitors in ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7(9):508-19.
66. Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, Johnson DS, Trivett MK, Etemadmoghadam D, Locandro B, Traficante N, Fereday S, Hung JA, Chiew YE, Haviv I; Australian Ovarian Cancer Study Group, Gertig D, DeFazio A, Bowtell DD. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2008 15;14(16):5198-208.
67. Palacios J, Gamallo C. Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 1998 1;58(7):1344-7.
68. Catasús L, Bussaglia E, Rodríguez I, Gallardo A, Pons C, Irving JA, Prat J. Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas. *Hum Pathol.* 2004;35(11):1360-8.
69. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, von Törne C, Weichert W, Engels K, Solbach C, Schrader I, Dietel M, von Minckwitz G. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010 1;28(1):105-13.
70. Loibl S, Müller BM, von Minckwitz G, Schwabe M, Roller M, Darb-Esfahani S, Ataseven B, du Bois A, Fissler-Eckhoff A, Gerber B, Kulmer U, Alles JU, Mehta K, Denkert C. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(2):477-87.
71. von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Loibl S, Huober J, Tesch H, Solbach C, Holms F, Eidtmann H, Dietrich K, Just M, Clemens MR, Hanusch C, Schrader I, Henschel S, Hoffmann G, Tiemann K, Diebold K, Untch M, Denkert C. Responsiveness of adjacent ductal carcinoma in situ and changes in HER2 status after neoadjuvant chemotherapy/trastuzumab treatment in early breast cancer—results from the GeparQuattro study (GBG 40). *Breast Cancer Res Treat.* 2011.
72. von Minckwitz G, Müller BM, Loibl S, Budczies J, Hanusch C, Darb-Esfahani S, Hilfrich J, Weiss E, Huober J, Blohmer JU, du Bois A, Zahm DM, Khandan F, Hoffmann G, Gerber B, Eidtmann H, Fend F, Dietel M, Mehta K, Denkert C. Cytoplasmic poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression

- is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2150-7.
73. Denkert C, Loibl S, Kronenwett R, Budczies J, von Törne C, Nekljudova V, Darb-Esfahani S, Solbach C, Sinn BV, Petry C, Müller BM, Hilfrich J, Altmann G, Staebler A, Roth C, Ataseven B, Kirchner T, Diemel M, Untch M, von Minckwitz G. RNA-based determination of ESR1 and HER2 expression and response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2012. [Epub ahead of print]
74. Noske A, Loibl S, Darb-Esfahani S, Roller M, Kronenwett R, Müller BM, Steffen J, von Toerne C, Wirtz R, Baumann I, Hoffmann G, Heinrich G, Grasshoff ST, Ulmer HU, Denkert C, von Minckwitz G. Comparison of different approaches for assessment of HER2 expression on protein and mRNA level: prediction of chemotherapy response in the neoadjuvant GeparTrio trial (NCT00544765). *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126(1):109-17.
75. Wenners AS, Mehta K, Loibl S, Park H, Mueller B, Arnold N, Hamann S, Weimer J, Ataseven B, Darb-Esfahani S, Schem C, Mundhenke C, Khandan F, Thomssen C, Jonat W, Holzhausen HJ, von Minckwitz G, Denkert C, Bauer M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) predicts response to neoadjuvant chemotherapy and clinical outcome in primary human breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(10):e45826.
76. Sinn HP, Schmid H, Junkermann H, Huober J, Leppien G, Kaufmann M, Bastert G, Otto HF. [Histologic regression of breast cancer after primary (neoadjuvant) chemotherapy]. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 1994;54(10):552-8.
77. Scholl SM, Pierga JY, Asselain B, Beuzeboc P, Dorval T, Garcia-Giralt E, Jouve M, Palangí T, Remvikos Y, Durand JC, et al. Breast tumour response to primary chemotherapy predicts local and distant control as well as survival. *Eur J Cancer*. 1995;31A(12):1969-75.
78. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, Theriault RL, Singh G, Binkley SM, Sneige N, Buchholz TA, Ross MI, McNeese MD, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Singletary SE. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1999;17(2):460-9.
79. van der Hage JA, van de Velde CJ, Julien JP, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C, Duchateau L. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol*. 2001;19(22):4224-37.
80. Hernandez-Aya LF, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *Oncologist*. 2011;16(4):404-14.
81. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Rakha EA, Richardson AL, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Weigelt B, Ellis IO, Reis-Filho JS. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol*. 2011;24(2):157-67.
82. Anders CK, Winer EP, Ford JM, Dent R, Silver DP, Sledge GW, Carey LA. Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition: "targeted" therapy for triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(19):4702-10.

83. von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M, Fasching PA, Tesch H, Eggemann H, Schrader I, Kittel K, Hanusch C, Kreienberg R, Solbach C, Gerber B, Jackisch C, Kunz G, Blohmer JU, Huober J, Hauschild M, Fehm T, Müller BM, Denkert C, Loibl S, Nekljudova V, Untch M; German Breast Group; Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie–Breast Study Groups. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2012 26;366(4):299-309.
84. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, Hasmüller S, Lebeau A, Kreienberg R, Camara O, Müller V, du Bois A, Kühn T, Stickeler E, Harbeck N, Höss C, Kahlert S, Beck T, Fett W, Mehta KM, von Minckwitz G, Loibl S. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. *J Clin Oncol*. 2011;29(25):3351-7.
85. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2784-95.
86. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Singer CF, Dietze O, Greil R, Jelen A, Sevelda P, Freibauer C, Müller V, Jänicke F, Schmidt M, Kölbl H, Rody A, Kaufmann M, Schroth W, Brauch H, Schwab M, Fritz P, Weber KE, Feder IS, Hennig G, Kronenwett R, Gehrman M, Gnant M; EP Investigators. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res*. 2011;17(18):6012-20.
87. Dubsy P, Filipits M, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, Dietze O, Luisser I, Klug E, Sedivy R, Bachner M, Mayr D, Schmidt M, Gehrman MC, Petry C, Weber KE, Kronenwett R, Brase JC, Gnant M; on behalf of the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (ABCSG). EndoPredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer. *Ann Oncol*. 2012. [Epub ahead of print]

Danksagung

Vielen, die meine wissenschaftlich Arbeit in fachlicher und persönlicher Hinsicht unterstützt haben, gilt mein Dank. Ich danke Herrn Prof. Manfred Dietel, der als Leiter des Instituts für Pathologie stets das wissenschaftliche Engagement aller Mitarbeiter besonders fördert. Herrn Prof. Carsten Denkert gilt mein besonderer Dank, denn er hat als Leiter der Arbeitsgemeinschaft Translationale Tumorforschung und molekulare Pathologie, in der ich seit bald zehn Jahren mitarbeite, eine kooperative und kreative hergestellt, die mich immer motiviert hat und er ist mir auch in persönlicher Hinsicht ein großes Vorbild. Allen Mitarbeitern unsere Arbeitsgruppe, auch denen, die mittlerweile an anderen Instituten zum Teil in leitenden Positionen tätig sind, danke ich für die gute Zusammenarbeit und den inspirierenden Austausch über wissenschaftliche Fragen und über unsere Projekte. Insbesondere danke ich dabei Herrn Prof. Wilko Weichert, Frau Dr. Berit Müller, Herrn Dr. Bruno Sinn, Frau Dr. PD Dr. Aurelia Noske und Herrn Dr. Jan Budczies. Ich danke unseren medizinisch-technischen Assistentinnen, Frau Britta Beyer, Frau Ines Koch und Frau Petra Wachs, ohne deren exzellente Laborarbeit unsere Projekte nicht hätten durchgeführt werden können. Ich danke den medizinischen und biologischen Doktoranden, die in unserer Arbeitsgruppe mitgearbeitet haben, insbesondere Frau Catarina Liebscher, Frau Antonia Gahler und Frau Dr. Areeg Faggad. Unseren engen Kooperationspartnern möchte ich danken für die hervorragende gegenseitiger Ergänzung unseres jeweiligen Expertise. Ich danke dabei besonders Herrn PD Dr. Kronenwett von Sividon Diagnostics, Frau Prof. Sibylle Loibl und Herrn Prof. von Minckwitz von der German Breast Group und Herrn Prof. Jalid Sehoul und seinem Team von der Tumor Bank Ovarian Cancer, besonders Frau Dr. Ioana Elena Braicu. Ich danke meinen Kollegen aus dem Institut für Pathologie, ganz besonders Frau Dr. Anja Rieger, Frau Dr. Ann-Christin von Brünneck und Frau Dr. Christiane Blind. Ich danke meinen Eltern, die durch ihre Erziehung und die Bildung, die sie mir verschafften, den Grundstein für meine jetzige Tätigkeit legten. Ich danke meinen Schwiegereltern, die meine Familie und mich stets mit Rat und Tat unterstützen und mir so ermöglichen, meine wissenschaftlichen Interessen und Verpflichtungen im erforderlichen Maße zu verfolgen und wahrzunehmen. Nicht zuletzt danke ich meinem Mann und meinen Kindern. Ohne sie hätte ich wohl mehr Zeit aber möglicherweise nicht die Energie und Freude, um mich meiner wissenschaftlichen Arbeit zu widmen.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

1. weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
2. 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,
3. mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

Unterschrift