

Aus dem
CharitéCentrum für Diagnostische und präventive Labormedizin

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Dietel

Habilitationsschrift

Poly(Adenosin Diphosphat-Ribose) Polymerase-1 und Genexpressionstests zur Charakterisierung von Mammakarzinomen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Pathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Berit Maria Pfitzner
in Bernau bei Berlin

Eingereicht: Dezember 2015

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

1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Wilfried Roth
2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Iver Petersen

Inhaltsverzeichnis

Widmung	iii
Abkürzungsverzeichnis	iv
1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des Mammakarzinoms.....	1
1.2 Etablierte Therapiemöglichkeiten des Mammakarzinoms	1
1.3 Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms	3
1.4 Neue Therapieansätze des Mammakarzinoms	4
1.5 Ergänzende Prognoseeinschätzung durch Genexpressionstests mit quantifizierbaren Biomarkern.....	6
1.6 Zielsetzung	8
2. Eigene Arbeiten.....	9
2.1 Die zytoplasmatische PARP-Expression ist prädiktiv und prognostisch bei neoadjuvant vorbehandelten Patientinnen	9
2.2 Starke zytoplasmatische und nukleäre PARP-Expression im familiären Mammakarzinom.....	19
2.3 Quantitative Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptors und der HER2mRNA in FFPE-Gewebe	28
2.4 Dezentrale Genexpressionsanalysen für Östrogenrezeptor positive, HER2-negative Mammakarzinome am Beispiel des EndoPredict- Tests	39
2.5 Der EndoPredict Genexpressionstest in der klinischen Praxis – Leistungsfähigkeit und Einfluss auf klinische Entscheidungen.....	50
3. Diskussion	58
3.1 Aktuelle Relevanz der PARP-1 in Bezug auf ihre therapeutische Beeinflussung.....	58
3.2 Genexpressionsuntersuchungen als diagnostische Ergänzung zur Vermeidung von Übertherapien	60
4. Zusammenfassung	63
Literaturverzeichnis.....	65
Danksagung.....	76
Erklärung.....	77

Widmung

Gewidmet meiner Familie.

Abkürzungsverzeichnis

BRCA-1/-2	Breast cancer gen-1/-2
ESR1	Estrogen receptor 1
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
HER2	Humane growth factor receptor 2
EGFR	Epidermale growth factor receptor
FDA	Food and Drug Administration
NST	No special type
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
PARP	Poly (Adenosin Diphosphat-Ribose) Polymerasen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
HDAC	Histondeacetylasen
PIK3CA	Phosphatidylinositol 3-kinase
mTOR	Mechanistic target of rapamycin, früher mammalian target of rapamycin
CGH	komparative genomische Hybridisierung
CCND1	Cyclin D1
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
CDK4/ 6	Cyclin-dependent kinase 4/ 6
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
pCR	pathologische Komplettremission
BIRC5	Baculoviral iap repeat- containing protein 5

UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C
DHCR7	7-Dehydrocholesterol Reductase
RBBP8	Retinoblastoma- binding protein 8
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer
AZGP1	Zinc-Alpha-2-Glycoprotein
MGP	Matrix Gamma-Carboxyglutamic acid
STC2	Stanniocalcin 2
CALM2	Calmodulin 2
OAZ1	Ornithine decarboxylase antizyme 1
RPL37A	Ribosomal protein L37A
RT-kPCR	Reverse Transkription kinetische Polymerasekettenreaktion
ESR1	Östrogenrezeptor alpha
PGR	Progesteronrezeptor
NCI	Nationcal Cancer Institute
tp53	tumor protein 53
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
TP53BP1	tumor protein 53 binding protein 1
MDR1	Multidrug resistance protein 1
ABCSG	Austrian Breast and Colorectal Cancer Group
ATAC	Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist in den USA mit über 200.000 Neuerkrankungen pro Jahr das bei Frauen am häufigsten diagnostizierte Karzinom. Das Lebenszeitrisiko wird auf 12% geschätzt. Innerhalb der Altersgruppe zwischen 20 und 59 Jahren ist das Mammakarzinom die am häufigsten zum Tode führende maligne Erkrankung bei Frauen [1]. Das Robert Koch Institut prognostizierte für das Jahr 2014 rund 75.000 Neuerkrankungen bei Frauen bezogen auf Deutschland. Die meisten Patientinnen erkranken in der Postmenopause, ungefähr 25% der Frauen sind bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre, ca. 10% jünger als 45 Jahre [2]. Neben einer familiären Belastung, welche z. T. durch eine Veränderung des Breast Cancer Gen 1 oder -2 (BRCA1 oder -2) bedingt ist, sind andere relevante Risikofaktoren u.a. Kinderlosigkeit, spätes Alter bei der ersten Geburt, frühe Menarche und späte Menopause [3,4].

1.2 Etablierte Therapiemöglichkeiten des Mammakarzinoms

Die Resektion des Primärtumors ist weiterhin die relevanteste Methode innerhalb der Therapie des primären Mammakarzinoms. Die Empfehlungen zu den nötigen Sicherheitsabständen des Tumors zum Resektionsrand haben sich in den letzten Jahren verändert. Die aktuellen Leitlinien verzichten beim invasiven Karzinom auf die Angabe von Sicherheitsabständen und empfehlen ausschließlich tumorfreie Resektionsränder [5]. Des Weiteren erfolgt die Untersuchung des Sentinellymphknotens und in Abhängigkeit der Anzahl und Größe nodaler Metastasen die axilläre Lymphonodektomie. Soweit indiziert,

erfolgt in den meisten Fällen eine brusterhaltende Therapie, gefolgt von einer hypofraktionierten Bestrahlung der Brust zur Reduktion der lokoregionären Rezidivrate. Die Indikation zu einer adjuvanten Chemotherapie wird u.a. unter Einbeziehung des molekularen Subtyps (s. Kapitel 1.3), der Anzahl befallener Lymphknoten und der Tumorgroße sowie ggf. nach Durchführung eines Genexpressionstests gestellt [5-7].

Der Östrogenrezeptor (Östrogenrezeptor Alpha, ESR1) spielt eine relevante Rolle in der Karzinogenese des Mammakarzinoms [8]. Die endokrine Therapie mit Modulatoren des Östrogenrezeptors oder Aromataseinhibitoren gehörte zu einer der ersten gezielten Therapien des Mammakarzinoms, welche in Ergänzung zur operativen Therapie durchgeführt wurde und deutlich zur Prognoseverbesserung beigetragen hat [9]. Etwa 70% aller Mammakarzinome zeigen eine Expression des Östrogenrezeptors alpha [10]. Seit der Zulassung des Östrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen 1970 gehört dieser zusammen mit den Aromataseinhibitoren zur Standardtherapie postmenopausaler Patientinnen mit Hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom. Diese werden bei prämenopausalen Patientinnen durch Gonadotropin releasing hormone- (GnRH-) Agonisten, Ovarablation oder Radiatio ersetzt [11].

Der Humane Growth Factor Receptor 2 (HER2) gehört zu der Familie der Epidermalen Growth Factor Rezeptoren (EGFR). Ungefähr 20% aller Mammakarzinome weisen eine Überexpression von HER2 auf [12]. Diese Tumore zeigen ein deutlich aggressiveres Verhalten, das u.a. durch ein verkürztes Gesamtüberleben und eine höhere Rezidivrate charakterisiert wird [13]. Seit der Zulassung des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin[®]; Roche, Basel, Schweiz) durch die Food and Drug Administration (FDA) 1998 wurden weitere Medikamente im Rahmen einer gezielten anti-HER2-Therapie zugelassen [14].

Im Rahmen der Behandlung des Mammakarzinoms gehören daher sowohl die immunhistochemische Bestimmung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren, als auch die Bestimmung des HER2-Status zur vollständigen pathologischen Untersuchung und werden in verschiedenen Leitlinien empfohlen [5,15,16].

1.3 Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom kann in verschiedene histologische Subtypen eingeteilt werden. Das invasive Karzinom of no special type (NST nach aktueller WHO, früher: invasiv duktales Karzinom) ist mit ca. 40-75% der häufigste Subtyp, gefolgt vom invasiv lobulären Mammakarzinom (5-15%). Weitere seltene histologische Subtypen sind z.B. muzinöse, metaplastische oder mikropapilläre Karzinome [17]. Die Arbeit von Perou et al. [18] eröffnete als erste eine neue Kategorisierung, basierend auf den molekularen Genexpressionsprofilen unter Verwendung der cDNA-Arrays. Darauf aufbauend werden Mammakarzinome in lumbinale Tumore, HER2-enriched, basal-like und normal-like Tumore eingeteilt. Ungefähr zwei Drittel aller Mammakarzinome ordnen sich in die luminalen Tumore ein. Innerhalb dieser Gruppe erfolgte eine weitere Unterteilung in Luminal A und Luminal B (geringere Hormonrezeptorexpression und höhere proliferative Aktivität im Vergleich zu Luminal A), wobei die aktuellen Empfehlungen von einer Differenzierung unter Einbeziehung des Ki67-Index als Maß der proliferativen Aktivität absehen [19,5]. Die HER2-enriched Tumore weisen eine hohe Expression von HER2 auf und werden bei ca. 5-10% aller Mammakarzinome gefunden. Tumore, die sowohl lumbinale und HER2-assoziierte Gene aufweisen, werden in die Gruppe der Luminal B-Tumore eingeordnet. Die Gruppe der basal-like Tumore (Östrogen- und Progesteronrezeptor negativ, HER2 negativ, Expression basaler Zytokeratine) wurde in der Folge ebenfalls weiter unterteilt [20]. Diese machen ca. 15-20% aller Mammakarzinome aus. Frauen mit BRCA1-Mutation entwickeln überwiegend basal-like Tumore. Die meisten

basal-like Tumore besitzen jedoch einen sporadischen Ursprung. Der als letztes charakterisierte Subtyp innerhalb der triple-negativen (Hormonrezeptor-negativen, HER2-negativen) Karzinome ist der Claudin-low Subtyp, welcher durch eine hohe Genexpression von Genen, die mit dem epithelialen-mesenchymalen Übergang assoziiert sind, gekennzeichnet ist [21]. Normal-like Tumore zeigen u.a. eine hohe Genexpression von basalen Epithel- und Fettzellen [18]. Da die Bestimmung dieser molekularen Subtypen primär an kryokonserviertem Frischgewebe erfolgte, basiert die Einteilung heute auf dem immunhistochemischen Expressionsprofil an Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebe, auch wenn dies nicht vollständig identisch ist. Die drei klinisch relevanten Subtypen (luminal, HER2-positiv, triple negativ) sind entsprechend auch in den Leitlinien implementiert [5]. Die HER2-positive Subgruppe besteht hier aus Hormonrezeptor-positiven, HER2-positiven und Hormonrezeptor-negativen, HER2-positiven Mammakarzinomen und macht so ca. 15% aller Mammakarzinome aus. Aufbauend auf diesen „intrinsischen Subtypen“ wurden zuletzt Studien veröffentlicht, die Mutationsprofile oder andere genomische Aberrationen als potentielleres Kategorisierungsmerkmal zugrunde legten, welche möglicherweise Erklärungen für die Interpretation des Therapieansprechens liefern können [22,23].

1.4 Neue Therapieansätze des Mammakarzinoms

Trotz der etablierten Therapiemöglichkeiten (s. Kapitel 1.2) muss aufgrund der Progression der Erkrankung unter Therapie partiell eine Therapieänderung initiiert werden. Die Ursache für den Progress kann u.a. bei Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen in einer endokrinen Resistenz liegen, welche z.B. durch Mutation im ESR1 Gen bedingt sein kann [24]. Auch bei der Therapie mit Trastuzumab sind Resistenzen beschrieben, welche u.a. auf einer Aktivierung des PIK3CA/AKT/mTOR- Signalweges oder dem Einfluss anderer HER-

Rezeptoren beruhen [25]. Trotz zahlreicher Studien in den vergangenen Jahren fehlt noch immer ein klar definiertes und medikamentös angreifbares Ziel in der Therapie von triple negativen Mammakarzinomen [26,27]. Aufgrund der Aggressivität dieser Tumore gibt es immer neue Forschungsansätze.

Die Poly(Adenosin Diphosphat-Ribose) Polymerasen (PARP) gehören zu einer Familie von Enzymen, welche durch DNA-Strangbrüche aktiviert werden [28]. Die aktivierte PARP erleichtert u.a. die DNA-Reparatur, die zelluläre Proliferation und ist in verschiedene andere Signalwege involviert [29-31]. PARP-Inhibitoren zeigten speziell beim high grade serösen Ovarialkarzinom eine deutliche Verlängerung des rezidivfreien Überlebens, insbesondere bei Nachweis einer BRCA1/2 Mutation [32,33]. Der Einsatz des PARP-Inhibitors Olaparib ist aktuell beim rezidivierten platinsensitiven Ovarialkarzinom mit Nachweis einer BRCA1/2 Mutation von der Europäischen Kommission zugelassen [34]. Auch bei anderen soliden Karzinomen wird der Einsatz von PARP-Inhibitoren in aktuellen Studien untersucht [34,35]. Speziell beim Mammakarzinom sind aktuell z.B. die weltweite OlympiA-Studie (NCT02032823, Start: April 2014; Hochrisiko-HER2-negatives Mammakarzinom mit BRCA1/2- Keimbahnmutation), die OlympiAD-Studie (NCT02000622; Start: März 2014; metastasiertes Mammakarzinom mit BRCA1/2- Keimbahnmutation) oder die Bravo-Studie (NCT01905592; Start: Oktober 2013; HER2-negative Mammakarzinome mit BRCA1/2- Keimbahnmutation) für Studienteilnehmerinnen geöffnet. Weitere Studien mit PARP-Inhibitoren sind aktuell in Planung, so z.B. die GeparOla-Studie der German Breast Group.

Ein weiterer therapeutischer Angriffspunkt bietet sich im Phosphatidylinositol 3-kinase (PIK3CA)/Akt-Signalweg, in welchem Mutationen der PIK3CA im Mammakarzinom eine relevante Rolle einnehmen [36]. Darauf aufbauend gibt es aktuell mehrere Studien mit PIK3CA-Inhibitoren, u.a. zusammen mit einem mTOR-Inhibitor (NCT02077933; Start: Mai 2014). Fabrice André untersuchte mittels CGH und Sequenzierung ein großes Kollektiv

metastasierter Mammakarzinompatientinnen, wobei die häufigsten medikamentös angreifbaren Ziele neben der PIK3CA Mutation eine Amplifikation von Cyclin D1 (CCND1) sowie eine Amplifikation vom Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) waren [37]. Insbesondere die Hemmung der Cyclin dependent Kinase 4/6 (CDK4/6) wird in aktuellen Studien bei Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen unter Anwendung der CDK4/6-Inhibitoren untersucht (z.B. PALOMA-4, NCT02297438, Start: März 2015; PENELOPE-B, NCT01864746, Start: November 2013). Ein anderer therapeutischer Ansatzpunkt wird derzeit im Rahmen der Immuntherapie in Studien erforscht, wobei insbesondere die medikamentöse Blockade von PD-1/PD-L1 erfolgversprechend erscheint [38]. Sabatier et al. zeigten eine erhöhte PDL1-mRNA-Expression in basalen Mammakarzinomen [39].

1.5 Ergänzende Prognoseeinschätzung durch Genexpressionstests mit quantifizierbaren Biomarkern

Ergänzend zu den etablierten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms wie Nodalstatus, Tumorgroße und histologische Differenzierung können molekulare Genexpressionstests ergänzende Informationen zur Prognoseabschätzung liefern [40-43]. Insbesondere für die Östrogenrezeptor-positiven, HER2-negativen Tumore mit höherer proliferativer Aktivität („Luminal B“) erscheint diese Untersuchung sinnvoll und empfehlenswert [5]. Relevanz in der Praxis erlangten insbesondere der Oncotype DX[®] (Genomic Health; Redwood City, CA, United States of America), der EndoPredict[®]- Test (Sividon Diagnostics; Köln, Deutschland) und Pam50/Prosigna[®] (Nanostrings technologies; Seattle, WA, United States of America). Grundlage aller drei Tests ist die Bestimmung der Genexpression ausgewählter Gene im FFPE-Gewebe, wobei sowohl Anzahl, als auch Gene partiell differieren [40].

Filipits et al. [43] beschrieben 2011 erstmalig den EndoPredict[®]- Test als einen neuen Test zur Prädiktion von Fernmetastasen bei Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positivem, HER2-

negativem Mammakarzinom. Der Test untersucht die Expression von 8 Zielgenen (BIRC5, UBE2C, DHCR7, RBBP8, IL6ST, AZGP1, MGP und STC2), welche Hormonrezeptor assoziiert sind oder einen Einfluss auf die Proliferation haben. Ergänzend wird die Expression von 3 Referenzgenen (CALM2, OAZ1 und RPL37A) untersucht. Der EndoPredict[®]- Test gehört zu den Genexpressionstests der zweiten Generation, da zusätzlich zu dem molekularen Risiko (EPscore/EP class) unter Einbeziehung der postoperativ bestimmten TumorgroÙe (pT) sowie des Nodalstatus (pN) der sog. EPclin score berechnet wird. Aus diesem ergeben sich abschließend die klinische Risikoklassifikation (EPclin class) und das abgeschätzte Rezidivrisiko unter alleiniger endokriner Therapie bezogen auf ein 10-Jahresintervall. Eigene Untersuchungen [44] haben gezeigt, dass entzündliche Veränderungen im Sinne einer Stanzbiopsie keinen Einfluss auf das Testergebnis haben. Weiterhin konnten wir zeigen, dass auch präoperative Stanzbiopsien für den EndoPredict[®]- Test geeignet sind [44].

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Habilitationsschrift war es, vorhandene Mammakarzinomproben u.a. aus klinischen Studien immunhistochemisch und molekularbiologisch hinsichtlich möglicher prognostischer und prädiktiver Faktoren zu untersuchen sowie deren Auswirkung auf die klinische Therapieentscheidung.

Spezifische Ziele waren:

- Die Untersuchung der immunhistochemischen Expression der PARP-1 in einem Kollektiv neoadjuvant vorbehandelter Mammakarzinompatientinnen hinsichtlich der Expression in einzelnen Subgruppen sowie in Bezug auf das Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie.
- Die Untersuchung der immunhistochemischen Expression der PARP-1 in einem Kollektiv von Mammakarzinompatientinnen mit erhöhtem familiären Risiko und bekanntem BRCA-Mutationsstatus.
- Die quantitative Bestimmung etablierter prädiktiver und prognostischer Faktoren (Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, HER2) auf mRNA-Ebene mit Hilfe einer neuen, vollautomatischen RNA-Isolierungsmethode und die Korrelation dieser Ergebnisse mit den immunhistochemischen Expressionsprofilen.
- Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit dezentral bestimmter Genexpressionstests in Mammakarzinomen.
- Die Analyse der Auswirkungen der Ergebnisse eines Genexpressionstests in der klinischen Praxis auf die Therapieentscheidung.

2. Eigene Arbeiten

2.1 Die zytoplasmatische PARP-Expression ist prädiktiv und prognostisch bei neoadjuvant vorbehandelten Patientinnen

Cytoplasmic poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy.

Gunter von Minckwitz, Berit Maria Müller*, Sibylle Loibl, Jan Budczies, Claus Hanusch, Silvia Darb-Esfahani, Jörn Hilfrich, Erich Weiss, Jens Huober, Jens Uwe Blohmer, Andreas du Bois, Dirk-Michael Zahm, Fariba Khandan, Gerald Hoffmann, Bernd Gerber, Holger Eidtmann, Falko Fend, Manfred Dietel, Keyur Mehta, Carsten Denkert

* jetzt Berit Maria Pfitzner

J Clin Oncol. 2011 Jun 1;29(16):2150-7. [45]

<http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.31.9079>

Für diese Arbeit wurden prätherapeutische Stanzbiopsien von 638 Patientinnen der neoadjuvanten GeparTrio-Studie (NCT00544765) immunhistochemisch hinsichtlich der nukleären und zytoplasmatischen PARP1-Expression untersucht. Die Auswertung der tissue microarrays (TMA) erfolgte an den digitalisierten Schnittpräparaten unter Anwendung des VMscope Slide Explorer (VMscope, Berlin, Germany).

Wir fanden eine starke zytoplasmatische Expression in 23.7% der Fälle. Diese war mit einer histologischen Entdifferenzierung ($p < 0.001$), einem positiven Nodalstatus ($p = 0.049$), einem negativen Hormonrezeptorstatus ($p < 0.001$) sowie einer nicht lobulären Morphologie ($p < 0.001$) assoziiert. Bezogen auf die molekularen Subtypen fanden wir eine starke Expression am häufigsten (35.5%) in triple negativen (Östrogen- und Progesteronrezeptor negativ, HER2 negativ) Tumoren (HER2-positive Tumore: 24.6%; Hormonrezeptor-positive HER2-negative Tumore: 18.0%; $p < 0.001$). Die Patientinnen mit Tumoren, welche eine

starke zytoplasmatische PARP-Expression gezeigt haben, hatten die größte Rate an pathologischen Komplettremissionen (pCR) nach vorangegangener neoadjuvanter Chemotherapie (26.5%; $p < 0.001$), verglichen mit Patientinnen mit intermediärer (19.1%) oder negativer (8.0%) Expression. Hinsichtlich des rezidivfreien und Gesamtüberlebens stellte sich eine starke zytoplasmatische PARP-Expression als ein negativer, jedoch kein unabhängiger prognostischer Faktor dar (rezidivfreies Überleben: $p = 0.0025$; Gesamtüberleben: $p = 0.0022$). Hinsichtlich der nukleären PARP-Expression fanden sich keine signifikanten Korrelationen.

Aufgrund der für dieses Kollektiv nicht bekannten Korrelation zwischen der PARP-Expression und dem BRCA-Mutationsstatus haben wir dies im Folgenden an einem anderen Kollektiv untersucht.

2.2 Starke zytoplasmatische und nukleäre PARP-Expression im familiären

Mammakarzinom

Higher cytoplasmic and nuclear poly(ADP-ribose) polymerase expression in familial than in sporadic breast cancer

Marie-Luise Klauke, Nicoline Hoogerbrugge, Jan Budczies, Peter Bult, Judith Prinzler, Cornelia Radke, J. Han J. M. van Krieken, Manfred Dietel, Carsten Denkert, Berit Maria Müller*

* jetzt Berit Maria Pfitzner

Virchows Arch (2012) 461:425–431. [46]

<http://dx.doi.org/10.1007/s00428-012-1311-2>

Aufgrund des fehlenden BRCA-Mutationsstatus in der vorangegangenen Arbeit war es hier das Ziel, die PARP-Expression in Bezug zum Mutationsstatus zu untersuchen. Die Grundlage dieser Untersuchung bildete ein Patientenkollektiv, welches sich aus FFPE-Gewebe von in Berlin diagnostizierten Patientinnen mit sporadischem Mammakarzinom und von Patientinnen mit erhöhtem familiären Risiko und überwiegend bekanntem BRCA-Mutationsstatus unserer Kooperationspartner der Universität Nijmegen zusammengesetzt hat. Die Auswertung der immunhistochemischen Expression der zytoplasmatischen und nukleären Expression der PARP-1 erfolgte analog zur vorangegangenen Arbeit [45]. In familiären Mammakarzinomen war sowohl der Anteil an Tumoren mit stark exprimierter zytoplasmatischer, als auch nukleärer PARP-Expression signifikant höher im Vergleich zu den sporadischen Tumoren (zytoplasmatisch: $p = 0.008$; nukleär: $p = 0.005$). In Zusammenschau beider Expressionsmuster fanden wir in familiären Mammakarzinomen häufiger eine Kombination aus starker zytoplasmatischer und starker nukleärer PARP-Expression (33%), wobei sporadische Karzinome überwiegend eine Kombination aus geringer zytoplasmatischer und intermediärer nukleärer PARP-Expression (39%) zeigten. Zusammenfassend unterstützt dies die Hypothese, dass die Patientinnen mit einem höheren familiären Risiko aufgrund der erhöhten PARP-Expression ein potentiell besseres Ansprechen

auf PARP-Inhibitoren haben könnten, was in weiteren prospektiven Studien untersucht werden sollte.

2.3 Quantitative Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptors und der HER2 mRNA in FFPE-Gewebe

Quantitative Determination of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2 mRNA in Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue-A New Option for Predictive Biomarker Assessment in Breast Cancer

Berit Maria Müller*, Ralf Kronenwett, Guido Hennig, Heike Euting, Karsten Weber, Kerstin Bohmann, Wilko Weichert, Gabriela Altmann, Claudia Roth, Klaus-Jürgen Winzer, Glen Kristiansen, Christoph Petry, Manfred Dietel, Carsten Denkert

* jetzt Berit Maria Pfitzner

Diagn Mol Pathol. 2011 Mar;20(1):1-10. [47]

<http://dx.doi.org/10.1097/PDM.0b013e3181e3630c>

Der aktuelle Goldstandard in der Bestimmung des Östrogenrezeptors (ESR1), des Progesteronrezeptors und von HER2 als relevante prädiktive Marker im Mammakarzinom ist die Immunhistochemie [48]. Diese semiquantitative Methode offenbarte in zahlreichen Studien eine teils große Streuung zwischen verschiedenen Laboratorien [49,50]. Wir haben in dieser Arbeit eine neue, vollautomatische, roboterbasierte Methode zur RNA-Isolierung in bis zu 21 Jahre altem FFPE-Gewebe von 167 Mammakarzinomen untersucht. Daran anschließend führten wir eine Reverse Transkription kinetische Polymerasekettenreaktion (RT-kPCR) zur Analyse von ESR1, PGR und HER2 durch und korrelierten diese Ergebnisse mit der immunhistochemischen Expression. Die RNA Isolierung war in allen Proben erfolgreich. Wir fanden eine gute Konkordanz für ESR1 (Übereinstimmung 98.4%), PGR (84.4%) und HER2 (89.8%). Damit konnten wir zeigen, dass auch sehr altes FFPE-Gewebe für diese standardisierte Hochdurchsatzmethode geeignet ist und vergleichbare Ergebnisse zum aktuellen Goldstandard erzielt. Weiter zukünftige Studien sind notwendig, um den Nutzen für klinische Entscheidungen prospektiv zu bestimmen.

2.4 Dezentrale Genexpressionsanalysen für Östrogenrezeptor-positive, HER2-negative Mammakarzinome am Beispiel des EndoPredict-Tests

Decentral gene expression analysis for ER+/Her2- breast cancer: results of a proficiency testing program for the EndoPredict assay.

Carsten Denkert, Ralf Kronenwett, Werner Schlake, Kerstin Bohmann, Roland Penzel, Karsten E. Weber, Heinz Höfler, Ulrich Lehmann, Peter Schirmacher, Katja Specht, Margaretha Rudas, Hans-Heinrich Kreipe, Peter Schraml, Gudrun Schlake, Zsuzsanna Bago-Horvath, Frank Tiecke, Zsuzsanna Varga, Holger Moch, Marcus Schmidt, Judith Prinzler, Dentscho Kerjaschki, Bruno Valentin Sinn, Berit Maria Müller*, Martin Filipits, Christoph Petry, Manfred Dietel

* jetzt Berit Maria Pfitzner

Virchows Arch. 2012 Mar;460(3):251-9. [51]

<http://dx.doi.org/10.1007/s00428-012-1204-4>

Im Rahmen der individualisierten Tumorthherapie wurde bisher die molekularpathologische Bestimmung von Biomarkern zur Therapieprädiktion insbesondere bei Karzinomen der Lunge und des Kolons aus FFPE-Gewebe in den letzten Jahren in der Routinediagnostik etabliert. Die Indikation für eine adjuvante Chemotherapie ist insbesondere beim luminalen Mammakarzinom oft schwierig. In diesem Fall bieten sich Genexpressionstests zur genaueren Risikobewertung des Tumors an. Die Variabilität eines solchen sollte in unterschiedlichen Laboratorien so gering wie möglich ausfallen. In dieser Arbeit wurden FFPE-Proben von verschiedenen Mammakarzinomen in sieben verschiedene molekulare pathologische Institute in Deutschland, Österreich und der Schweiz zur Bestimmung des EP versandt. Die Extraktion einer ausreichenden RNA-Menge war in allen Proben (100 %) möglich. Die in den einzelnen Instituten gemessenen EPscores zeigten eine hohe Konkordanz (Korrelationskoeffizient nach Pearson: 0.987 bis 0.999) mit den entsprechenden Referenzwerten, welche im Labor des Herstellers bestimmt wurden. Die dezentral bestimmten EPscores wichen nicht mehr als 1.0 score Einheiten von den Referenzwerten ab. Somit wurden alle Proben in die richtige EP

Risikogruppe eingeordnet. Einige der bisher verfügbaren molekularen Genexpressionstests des Mammakarzinoms finden in Zentrallaboratorien in Europa oder den USA statt. Durch die dezentrale Bestimmung des EP-Tests kann im Vergleich mit der Untersuchung in einem Zentrallabor mit einem deutlich schneller verfügbaren Testergebnis gerechnet werden. Ergänzend ist auf diese Weise eine enge Abstimmung zwischen dem lokalen Pathologen und dem klinischen Kollegen möglich.

2.5 Der EndoPredict Genexpressionstest in der klinischen Praxis-Einfluss auf klinische Entscheidungen

The EndoPredict Gene-Expression Assay in Clinical Practice-Performance and Impact on Clinical Decisions

Berit Maria Müller*, Elke Keil, Annika Lehmann, Klaus-Jürgen Winzer, Christiane Richter-Ehrenstein, Judith Prinzler, Nikola Bangemann, Angela Reles, Sylvia Stadie, Winfried Schoenegg, Jan Eucker, Marcus Schmidt, Frank Lippek, Korinna Jöhrens, Stefan Pahl, Bruno Valentin Sinn, Jan Budczies, Manfred Dietel, Carsten Denkert

* jetzt Berit Maria Pfitzner

PLoS One. 2013 Jun 27;8(6):e68252. [52]

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068252>

Aufbauend auf der Untersuchung zur dezentralen Genexpressionsanalyse des EndoPredict-Tests wird dieser seit 2011 routinemäßig in den molekularpathologischen Laboratorien eingesetzt. Die hier vorliegende Arbeit untersuchte die Auswirkung des Testergebnisses auf die klinische Therapieentscheidung. Zur Einschätzung des Risikopotentials von Mammakarzinomen und zur Optimierung der darauf aufbauenden Therapie erlangten Genexpressionsanalysen insbesondere bei Luminal B-Tumoren als diagnostisches Hilfsmittel in den letzten Jahren größere Relevanz. Grundlage der hier vorliegenden retrospektiven Untersuchung bildeten die Ergebnisse von 167 EndoPredict-Tests, welche wir zwischen August 2011 und Juli 2012 an unserem Institut durchgeführt haben. Wir versandten Fragebögen an alle Einsender hinsichtlich der Therapieentscheidung vor und nach Durchführung des EndoPredict-Tests. Ergänzend haben wir die therapeutisch relevanten Parameter aus den uns vorliegenden pathologischen Befundberichten (Tumorgröße, histologische Differenzierung, Lymphknotenstatus, Tumorproliferation) mit erfasst. Der EndoPredict-Test konnte in den Proben aller 167 Patientinnen durchgeführt werden. Der überwiegende Anteil aller Patientinnen hatte pT1c (40.7%) bzw. pT2-Tumore (40.1%),

welche überwiegend tumorfreie Lymphknoten (62.1%) aufwiesen. Ungefähr zwei Drittel (66.5%) aller Patientinnen hatten ein molekulares Hochrisikogenexpressionsprofil. Nach Integrierung der postoperativen Tumorgöße und des Nodalstatus zeigten 53.6% aller Patientinnen einen EPclin score im Hochrisikobereich. Von 130 der 167 Patientinnen (77.8%) erhielten wir Informationen über die Therapieentscheidung vor und nach Durchführung des EndoPredict-Tests. Hier zeigte sich eine Therapieveränderung bei 37.7% der Patientinnen nach Erhalt des Testergebnisses. Für 12.3% der Patientinnen wurde eine zusätzliche Chemotherapie beschlossen, bei ungefähr einem Viertel der Patientinnen (25.4%) wurde auf die ursprünglich empfohlene Chemotherapie aufgrund des Testergebnisses verzichtet.

Zusammenfassend wurden durch den EndoPredict-Test zusätzliche relevante Informationen gewonnen, die bei mehr als einem Drittel der eingeschlossenen Patientinnen zu einer Therapieänderung führte und jede vierte Patientin vor einer Übertherapie bewahrte.

3. Diskussion

3.1 Aktuelle Relevanz der PARP-1 in Bezug auf ihre therapeutische Beeinflussung

PARP-Inhibitoren gehören zur Gruppe der sogenannten small molecule-Inhibitoren und inhibieren die Aktivität der PARP-Enzyme. Der aktuell am häufigsten eingesetzte Wirkstoff aus dieser Gruppe ist Olaparib. In Folge der ersten erfolgversprechenden Studien des Einsatzes von PARP-Inhibitoren gewannen diese immer mehr an Relevanz. Sonnenblick et al. geben ergänzend einen Überblick über die derzeit beim US National Cancer Institute (NCI) angemeldeten 127 Studien mit PARP-Inhibitoren [53]. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von Bao et al. gibt in einer Metaanalyse von 126 Arbeiten einen Überblick über die Sicherheit und Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren [54]. Ergänzend beschreiben Sonnenblick et al. [53] eine gute Verträglichkeit von einer Monotherapie mit Olaparib. Die molekularen Mechanismen der PARP-Inhibitoren im Rahmen von Kombinationstherapien mit anderen Chemotherapeutika sind aktuell noch Teil klinischer Forschung. Ergebnisse präklinischer Studien zeigten, dass PARP-Inhibitoren die Wirksamkeit von Chemotherapeutika erhöhen können. Benafif et al. [55] geben einen Überblick über aktuelle Studien hinsichtlich der Kombination von PARP-Inhibitoren mit verschiedenen Chemotherapeutika in unterschiedlichen Malignomen.

Zellen mit BRCA-Mutation sind unfähig, Doppelstrangbrüche durch homologe Rekombination zu reparieren. Daher erscheint der Einsatz von PARP-Inhibitoren insbesondere bei Patienten mit BRCA-Mutation erfolgversprechend. Dieser simultane Ausfall von zwei zellulären Signalwegen mit konsekutivem Zelltod wird auch als „synthetische Letalität“ bezeichnet [56]. Auch wir konnten im Vergleich zu sporadischen Mammakarzinomen eine signifikant höhere nukleäre und zytoplasmatische PARP-Expression in BRCA-mutierten Mammakarzinomen nachweisen (siehe Kapitel 2.2). Basal-like triple negative Mammakarzinome haben ähnliche klinisch-pathologische Eigenschaften wie BRCA-

mutierte Mammakarzinome, u. a. tumor protein 53 (tp53) Mutationen und Sensitivität auf platinhaltige Chemotherapeutika. Diese Charakteristika werden auch als „BRCAness“ bezeichnet. Domagala et al. [57] beschrieben eine höhere PARP-1 Expression in basal-like und triple negativen Mammakarzinomen. Dies unterstützt die Ergebnisse unserer Arbeit, in welcher auch wir eine starke PARP-Expression in triple negativen Mammakarzinomen beschrieben haben (siehe Kapitel 2.1). Ergänzend zu basal-like triple negativen Mammakarzinomen erscheinen auch Patienten mit PTEN-mutierten Mammakarzinomen ein höheres Ansprechen auf PARP-Inhibitoren zu haben [53]. Insbesondere aufgrund der potentiellen Relevanz der Assoziation zu BRCA-Mutationen erfolgten auch im Ovarialkarzinom weitere Untersuchungen. Hier fanden Godoy et al. eine immunhistochemische Überexpression der PARP in entdifferenzierten, weiter fortgeschrittenen Tumoren [58]. Nach der Zulassung des PARP-Inhibitoren LynparzaTM (Olaparib) beim rezidivierten, platin sensitiven high grade serösen Ovarialkarzinom, Eileiterkarzinom oder primären peritonealen Karzinom mit Nachweis einer BRCA-1/-2 Mutation im Tumor (somatische Mutation) oder einer Keimbahnmutation ist dies eine häufiger gewählte Therapieoption.

Die Expression der PARP-1 wurde ergänzend in verschiedenen anderen soliden Tumoren wie dem Prostatakarzinom untersucht. So beschrieben Salemi et al. eine höhere nukleäre PARP-1-Expression im Prostatakarzinom verglichen mit Normalgewebe [59]. Ossovskaya et al. untersuchten ergänzend die mRNA-Expression der PARP-1 in verschiedenen humanen malignen Tumoren und fanden eine Hochregulierung in verschiedenen histologischen Entitäten [60]. Nichtsdestotrotz sind insbesondere die Ergebnisse der immunhistochemischen Arbeiten hinsichtlich der beobachteten PARP-Lokalisation (zytoplasmatisch vs. nukleär) uneinheitlich. Die Ursache hierfür ist u.a. in der Komplexität der PARP-Regulierung zu suchen [61]. Zum aktuellen Zeitpunkt ist jedoch weiterhin unklar, welche Patienten den größten Nutzen von einer Therapie mit PARP-Inhibitoren haben werden. Der Einfluss der

BRCA-Mutation ist dabei bisher am intensivsten untersucht worden. Scott et al. [34] beschreiben jedoch auch, dass nicht alle Patienten mit BRCA1- oder BRCA2-Mutation auf eine PARP-Inhibitor-Therapie ansprechen. Die Ursachen dafür können sehr vielfältig sein. Am relevantesten erscheinen nach bisherigem Wissensstand das Wiederherstellen der BRCA Proteinfunktion durch sekundäre BRCA-Mutationen, somatische Mutationen von tumor protein 53 binding protein 1 (TP53BP1) sowie erhöhter Medikamentenmetabolismus, welcher durch MDR1 vermittelt wird [34,53]. Im Gegensatz dazu scheinen auch andere epigenetische Alterationen, Expressionsveränderungen spezieller microRNAs oder Transkriptionsfaktoren die Sensitivität auf PARP-Inhibitoren zu erhöhen [34]. Um zukünftig Responder auf eine Therapie mit PARP-Inhibitoren gezielter zu identifizieren, sind weitere Studien nötig. Die ARIEL2 Studie (NCT01891344; Start: September 2013) untersucht den Einsatz von Rucaparib bei Patientinnen mit rezidiviertem platin sensitiven high grade Ovarialkarzinom, Tubenkarzinom oder peritonealem Karzinom. Ergänzend wird hier eine molekulare Signatur der defizienten homologen Rekombination in Abhängigkeit der Response auf den PARP-Inhibitor erstellt. Im Rahmen der neoadjuvanten Studien der GBG ist aktuell die GeparOla-Studie in Planung, welche den neoadjuvanten Einsatz von Olaparib im Mammakarzinom untersuchen wird. Zusammenfassend erscheint die Rolle von PARP-1 im Rahmen der Tumorgenese auch für das Mammakarzinom ein interessanter Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie zu sein.

3.2 Genexpressionsuntersuchungen als diagnostische Ergänzung zur Vermeidung von Übertherapien

Der Goldstandard der Bestimmung der prognostisch relevanten Hormonrezeptoren (Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor) im FFPE-Gewebe ist noch immer die Immunhistologie. Ergänzt wird diese bei der Bestimmung des HER2-Status ggf. durch eine in

situ Hybridisierung [62,63]. Nur diese Methoden wurden bisher in prospektiven Studien zur Charakterisierung von Mammakarzinomen validiert. Aufgrund der beschriebenen Abweichungen zwischen verschiedenen Laboratorien in der immunhistochemischen Bestimmung der Hormonrezeptoren [64,49] sowie der semiquantitativen Auswertung erscheint eine zusätzliche Methode interessant. Wir konnten in unserer Arbeit (s. Kapitel 2.3) zeigen, dass die Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptors sowie des HER2-Status mittels einer neuen, semiquantitativen Xylol-freien Methode in bis zu 21 Jahre altem FFPE-Gewebe auf mRNA-Ebene möglich ist. Ferner fanden wir in unserer Kohorte eine gute Konkordanz mit der Immunhistochemie. Eine zusätzliche Validierung dieser Methode in prospektiven Studien ist jedoch nötig, da es z.B. für den Oncotype DX[®] von Dabbs et al. beschriebene Diskordanzen hinsichtlich des HER2-Status gibt [65].

Die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie richtet sich u. a. nach dem molekularen Subtyp. So ist eine adjuvante Chemotherapie bei HER2-positiven und triple negativen Mammakarzinomen nach aktuellen Leitlinien indiziert [5], wobei es für die Therapie bei luminalen Tumoren bisher keine einheitlichen Richtlinien gibt. Daher sind die Genexpressionstests zur weiteren Therapieentscheidung insbesondere für die luminalen Mammakarzinome relevant. Der erste kommerziell verfügbare Genexpressionstest war der 70-Gen-Test Mammaprint[®] (Agendia, Amsterdam, Niederlande), welcher 2002 erstmals beschrieben wurde [66,42]. Bereits 2 Jahre später wurden erste Ergebnisse zum Oncotype DX[®] Test veröffentlicht [41], in welchem 21 Gene untersucht werden. Der EndoPredict[®]-Test ist erstmals 2011 beschrieben worden [43] und seitdem für die Diagnostik verfügbar. Wir haben die dezentrale Bestimmung des EndoPredict[®]-Test für Östrogenrezeptor-positive, HER2-negative Mammakarzinome untersucht (s. Kapitel 2.4). In unserer Arbeit zeigte sich eine hohe Konkordanz der Ergebnisse des EndoPredict[®]-Test aus verschiedenen pathologischen Instituten mit den zentral bestimmten Referenzwerten. Wir haben in einer weiteren Untersuchung (siehe Kapitel 2.5) dargestellt, dass das Ergebnis des EndoPredict[®]-

Testes bereits im ersten Jahr nach Etablierung in unserem Institut bei 37% der Patientinnen zu einer Therapieveränderung führte. Ähnliche Ergebnisse zum Einfluss auf Therapieentscheidungen durch den Oncotype DX[®] wurden unter anderem von Biroschak et al. [67] beschrieben, wo eine Veränderung der Therapieempfehlung nach Kenntnis des Recurrence Score in 36% und 18% der Fälle beschrieben wurde.

Ein Großteil der bisher veröffentlichten Genexpressionsarbeiten sind retrospektive Analysen von teils prospektiv gesammeltem Studienmaterial [68]. Die TAILORx-Studie (NCT00310180) untersucht erstmals prospektiv den Einsatz eines Genexpressionstests bei Patientinnen mit Hormonrezeptor-positivem, HER2-negativem Mammakarzinom. Kürzlich wurden erste Ergebnisse dieser Studie veröffentlicht [69], welche bei Patientinnen mit geringem molekularem Risiko (low risk) des Oncotype DX[®] unter alleiniger endokriner Therapie innerhalb von 5 Jahren ein sehr geringes Rezidivrisiko zeigten.

Als ein weiterer Kritikpunkt gilt die fehlende Vergleichbarkeit der Genexpressionstests untereinander [68]. So ergab ein Vergleich zwischen dem Oncotype DX[®] und dem EndoPredict[®]-Test nur eine moderate Korrelation [70]. Einschränkend muss man hier jedoch berücksichtigen, dass die Ergebnisse des Oncotype DX[®] in 3 Risikoklassen (low risk, intermediate risk, high risk), die Ergebnisse des EndoPredict[®]-Tests in 2 Risikoklassen (low risk, high risk) resultieren. Des Weiteren implementiert der EndoPredict[®]-Test als Genexpressionstest der zweiten Generation zusätzlich die Tumorgöße sowie den Nodalstatus, was eine zusätzliche Charakterisierung ermöglicht.

Für den EndoPredict[®] Test und für PAM50/Prosigna[®] wurde in jeweils zwei Studien (EndoPredict[®]: ABCSG-6 und ABCSG-8; PAM50/Prosigna[®]: ABCSG-8 und ATAC) die Prädiktion der Spätmetastasierung gezeigt [71-73]. Dadurch ergibt sich eine zusätzliche Indikation, welche zur Identifikation der Patientinnen führt, die von einer verlängerten endokrinen Therapie profitieren könnten.

4. Zusammenfassung

Die Therapie des Mammakarzinoms basiert in den letzten Jahren zunehmend auf den molekularen Subtypen (luminal, HER2-positiv, triple negativ). Trotz der multimodalen Therapiemöglichkeiten des Mammakarzinoms gibt es noch immer Patientinnen, welche auf die medikamentöse Therapie aus unterschiedlichen Ursachen einen Progress der Erkrankung entwickeln. Der Bedarf für neue, möglichst zielgerichtete Therapien besteht somit noch immer, insbesondere für die Subgruppe der triple negativen, evtl. zusätzlich BRCA-mutierten Mammakarzinome, welche durch einen besonders aggressiven Verlauf charakterisiert sind. Insbesondere bei luminalen Tumoren sollte man durch eine adäquate Risikostratifizierung eine Übertherapie vermeiden, um Patientinnen eine unnötige Chemotherapie zu ersparen.

Wir haben für das Mammakarzinom in der hier vorliegenden Habilitationsschrift prädiktive und prognostische Marker sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene untersucht. Eine starke Expression der PARP-1 war signifikant mit einem aggressiveren Tumortyp assoziiert und war in unserem Kollektiv prädiktiv für das Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie. Eine starke PARP-Expression stellte sich als negativer prognostischer Faktor bezogen auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben dar. Ferner war die PARP-Expression bei Patientinnen mit BRCA-Mutation im Vergleich zu Patientinnen mit sporadischen Tumoren stärker, was die Hypothese der synthetischen Letalität der PARP-Inhibitoren unterstützt. Diese Ergebnisse sind die Basis für weitere Studien mit PARP-Inhibitoren im Mammakarzinom, u. a. für die geplante neoadjuvante GeparOla- Studie.

Für eine quantitative Bestimmung der im Mammakarzinom prognostisch und prädiktiv relevanten Hormonrezeptoren (Östrogen- und Progesteronrezeptor) sowie von HER2 führten wir ergänzende Untersuchungen auf mRNA-Ebene mittels einer neuen, Xylol-freien roboterbasierten Methode durch. Hier konnten wir zeigen, dass die Bestimmung der Hormonrezeptoren und von HER2 auf mRNA-Ebene auch noch in 21 Jahre altem FFPE-

Gewebe möglich ist sowie eine gute Konkordanz mit den immunhistochemischen Ergebnissen zeigt. Als Ergänzung zu den immunhistochemischen Untersuchungen haben Genexpressionstests zur Risikobewertung insbesondere bei den luminalen Tumoren in den letzten Jahren in der klinischen Praxis an Bedeutung gewonnen. Mit Hilfe der Genexpressionstests können durch Verzicht auf eine adjuvante Chemotherapie Übertherapien vermieden, andererseits jedoch auch besonders aggressive Tumore identifiziert und ergänzend therapiert werden. Wir konnten die hohe Konkordanz zwischen der dezentralen und zentralen Bestimmung der für den EndoPredict[®]-Test relevanten Genexpressionen zeigen. Alle an unserer Studie teilnehmenden verschiedenen pathologischen Institute ordneten die Proben der korrekten Risikogruppe zu. Ergänzend haben wir die Auswirkungen des EndoPredict[®]-Tests auf die Therapieentscheidung untersucht. Das Ergebnis dieses Genexpressionstests war in unserer Arbeit mit einem deutlichen Einfluss auf die Therapieentscheidung assoziiert.

Zusammenfassend haben wir durch die immunhistochemischen Untersuchungen der PARP-1 die Grundlage für neue Therapieansätze mit diesem Enzym erweitert. Weiterhin konnten wir mit Hilfe eines standardisierten Genexpressionstests die Auswirkungen dieser neuen Methode auf die Therapieentscheidung durch die bessere Risikostratifizierung aufzeigen.

Literaturverzeichnis

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015) Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 65 (1):5-29.
2. Krebs in Deutschland 2009/2010. (2013) Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf;jsessionid=F714FA90A210C4535324C571E56FDF15.2_cid390?__blob=publicationFile.
3. Lee EH, Park SK, Park B, Kim SW, Lee MH, Ahn SH, Son BH, Yoo KY, Kang D, Group KR, Korean Breast Cancer S (2010) Effect of BRCA1/2 mutation on short-term and long-term breast cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 122 (1):11-25.
4. Howell A, Anderson AS, Clarke RB, Duffy SW, Evans DG, Garcia-Closas M, Gescher AJ, Key TJ, Saxton JM, Harvie MN (2014) Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res* 16 (5):446.
5. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, Senn HJ, Panel M (2015) Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 26 (8):1533-1546.
6. Turner NC, Jones AL (2008) Management of breast cancer--Part I. *BMJ* 337:107-110.
7. Turner NC, Jones AL (2008) Management of breast cancer--Part II. *BMJ* 337:164-169.
8. Huang B, Warner M, Gustafsson JA (2014) Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. *Mol Cell Endocrinol* 14 (00371-2):pii: S0303-7207.

9. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, Mandelblatt JS, Yakovlev AY, Habbema JD, Feuer EJ, Cancer I, Surveillance Modeling Network C (2005) Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med* 353 (17):1784-1792.
10. Payne SJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA (2008) Predictive markers in breast cancer - the present. *Histopathology* 52 (1):82-90.
11. Blok EJ, Derks MG, van der Hoeven JJ, van de Velde CJ, Kroep JR (2015) Extended adjuvant endocrine therapy in hormone-receptor positive early breast cancer: current and future evidence. *Cancer Treat Rev* 41 (3):271-276.
12. Baselga J, Swain SM (2009) Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature reviews Cancer* 9 (7):463-475.
13. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 (4785):177-182.
14. Tolaney S (2014) New HER2-positive targeting agents in clinical practice. *Current oncology reports* 16 (1):359.
15. Aktuelle Empfehlungen zur Prävention, Diagnostik und Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome State of the Art 2013 (2013), Vol 6. Zuckschwerdt Verlag.
16. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (2012), Vol 3. Leitlinienprogramm Onkologie. Zuckschwerdt Verlag.
17. Lakhani SR EI, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ (2012) World Health Organization Classification of tumors of the breast. IARC Prsee, Lyon.
18. Perou CM, Sorlie 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, Lonning PE,

Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406 (6797):747-752.

19. Pathologie. (2015) Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO). http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/maerz2015/de/2015D_04_Pathologie.pdf.

20. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation* 121 (7):2750-2767.

21. Carey LA (2010) Through a glass darkly: advances in understanding breast cancer biology, 2000-2010. *Clinical breast cancer* 10 (3):188-195.

22. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours (2012). *Nature* 490 (7418):61-70.

23. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Graf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S, Group M, Langerod A, Green A, Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowitz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Borresen-Dale AL, Brenton JD, Tavare S, Caldas C, Aparicio S (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486 (7403):346-352.

24. Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, Brown M, Schiff R (2015) ESR1 mutations-a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 12 (10):573-583.

25. Lavaud P, Andre F (2014) Strategies to overcome trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancers: focus on new data from clinical trials. *BMC medicine* 12:132.

26. Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, Pietenpol JA (2015) Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer* 121 (1):8-16.

27. Tomao F, Papa A, Zaccarelli E, Rossi L, Caruso D, Minozzi M, Vici P, Frati L, Tomao S (2015) Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *OncoTargets and therapy* 8:177-193.
28. Gagne JP, Isabelle M, Lo KS, Bourassa S, Hendzel MJ, Dawson VL, Dawson TM, Poirier GG (2008) Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic acids research* 36 (22):6959-6976.
29. Audebert M, Salles B, Calsou P (2004) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *The Journal of biological chemistry* 279 (53):55117-55126.
30. Chang P, Jacobson MK, Mitchison TJ (2004) Poly(ADP-ribose) is required for spindle assembly and structure. *Nature* 432 (7017):645-649.
31. Bai P (2015) Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Molecular cell* 58 (6):947-958.
32. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott C, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Macpherson E, Watkins C, Carmichael J, Matulonis U (2012) Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med* 366 (15):1382-1392.
33. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott CL, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Fielding A, Spencer S, Dougherty B, Orr M, Hodgson D, Barrett JC, Matulonis U (2014) Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 15 (8):852-861.
34. Scott CL, Swisher EM, Kaufmann SH (2015) Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors: recent advances and future development. *J Clin Oncol* 33 (12):1397-1406.
35. Bourdeanu L, Luu T (2014) Targeted Therapies in Breast Cancer: Implications for Advanced Oncology Practice. *Journal of the advanced practitioner in oncology* 5 (4):246-260.

36. Loibl S, von Minckwitz G, Schneeweiss A, Paepke S, Lehmann A, Rezai M, Zahm DM, Sinn P, Khandan F, Eidtmann H, Dohnal K, Heinrichs C, Huober J, Pfitzner B, Fasching PA, Andre F, Lindner JL, Sotiriou C, Dykgers A, Guo S, Gade S, Nekljudova V, Loi S, Untch M, Denkert C (2014) PIK3CA mutations are associated with lower rates of pathologic complete response to anti-human epidermal growth factor receptor 2 (her2) therapy in primary HER2-overexpressing breast cancer. *J Clin Oncol* 32 (29):3212-3220.
37. Andre F, Bachelot T, Commo F, Campone M, Arnedos M, Dieras V, Lacroix-Triki M, Lacroix L, Cohen P, Gentien D, Adelaide J, Dalenc F, Goncalves A, Levy C, Ferrero JM, Bonnetterre J, Lefeuvre C, Jimenez M, Filleron T, Bonnefoi H (2014) Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol* 15 (3):267-274.
38. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366 (26):2455-2465.
39. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, Viens P, Caldas C, Birnbaum D, Bertucci F (2015) Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget* 6 (7):5449-5464.
40. Denkert C, Pfitzner BM, Heppner BI, Dietel M (2015) Molecular pathology for breast cancer: Importance of the gene expression profile. *Der Pathologe* 36 (2):145-153.
41. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N (2004) A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 351 (27):2817-2826.

42. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415 (6871):530-536.
43. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Singer CF, Dietze O, Greil R, Jelen A, Sevela 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 (2011) A New Molecular Predictor of Distant Recurrence in ER-Positive, HER2-Negative Breast Cancer Adds Independent Information to Conventional Clinical Risk Factors. *Clinical Cancer Research* 17 (18):6012-6020.
44. Müller BM, Brase JC, Haufe F, Weber KE, Budzies J, Petry C, Prinzler J, Kronenwett R, Dietel M, Denkert C (2012) Comparison of the RNA-based EndoPredict multigene test between core biopsies and corresponding surgical breast cancer sections. *J Clin Pathol* 65 (7):660-662.
45. von Minckwitz G, Muller BM, Loibl S, Budzies 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 (2011) Cytoplasmic poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 29 (16):2150-2157.
46. Klauke ML, Hoogerbrugge N, Budzies J, Bult P, Prinzler J, Radke C, van Krieken JH, Dietel M, Denkert C, Muller BM (2012) Higher cytoplasmic and nuclear poly(ADP-ribose) polymerase expression in familial than in sporadic breast cancer. *Virchows Arch* 461 (4):425-431.
47. Müller BM, Kronenwett R, Hennig G, Euting H, Weber K, Bohmann K, Weichert W, Altmann G, Roth C, Winzer KJ, Kristiansen G, Petry C, Dietel M, Denkert C (2011) Quantitative determination of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 mRNA in

formalin-fixed paraffin-embedded tissue--a new option for predictive biomarker assessment in breast cancer. *Diagn Mol Pathol* 20 (1):1-10.

48. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1999) Estrogen Receptor Status by Immunohistochemistry Is Superior to the Ligand-Binding Assay for Predicting Response to Adjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 17 (5):1474-81.

49. Rüdiger TMD, Hofler HMD, Kreipe HHMD, Nizze HMD, Pfeifer UMD, Stein HMD, Dallenbach FEMD, Fischer HPMD, Mengel MMD, von Wasielewski RMD, Muller-Hermelink HKMD (2002) Quality Assurance in Immunohistochemistry: Results of an Interlaboratory Trial Involving 172 Pathologists. *American Journal of Surgical Pathology* 26 (7):873-882.

50. Price K, Goldhirsch A, the International Breast Cancer Study G (2005) Clinical trial update: International Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Research* 7 (6):252 - 254.

51. Denkert C, Kronenwett R, Schlake W, Bohmann K, Penzel R, Weber KE, Hofler H, Lehmann U, Schirmacher P, Specht K, Rudas M, Kreipe HH, Schraml P, Schlake G, Bago-Horvath Z, Tiecke F, Varga Z, Moch H, Schmidt M, Prinzler J, Kerjaschki D, Sinn BV, Muller BM, Filipits M, Petry C, Dietel M (2012) Decentral gene expression analysis for ER+/Her2- breast cancer: results of a proficiency testing program for the EndoPredict assay. *Virchows Arch* 460 (3):251-259.

52. Müller BM, Keil E, Lehmann A, Winzer KJ, Richter-Ehrenstein C, Prinzler J, Bangemann N, Reles A, Stadie S, Schoenegg W, Eucker J, Schmidt M, Lippek F, Johrens K, Pahl S, Sinn BV, Budczies J, Dietel M, Denkert C (2013) The EndoPredict Gene-Expression Assay in Clinical Practice - Performance and Impact on Clinical Decisions. *PLoS One* 8 (6):e68252.

53. Sonnenblick A, de Azambuja E, Azim HA, Jr., Piccart M (2015) An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol* 12 (1):27-41.

54. Bao Z, Cao C, Geng X, Tian B, Wu Y, Zhang C, Chen Z, Li W, Shen H, Ying S (2015) Effectiveness and safety of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer therapy: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*.
55. Benafif S, Hall M (2015) An update on PARP inhibitors for the treatment of cancer. *OncoTargets and therapy* 8:519-528.
56. Helleday T (2011) The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Molecular oncology* 5 (4):387-393.
57. Domagala P, Huzarski T, Lubinski J, Gugala K, Domagala W (2011) PARP-1 expression in breast cancer including BRCA1-associated, triple negative and basal-like tumors: possible implications for PARP-1 inhibitor therapy. *Breast Cancer Res Treat* 127 (3):861-869.
58. Godoy H, Mhaweche-Fauceglia P, Beck A, Miller A, Lele S, Odunsi K (2011) Expression of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase and p53 in epithelial ovarian cancer and their role in prognosis and disease outcome. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 30 (2):139-144.
59. Salemi M, Galia A, Fraggetta F, La Corte C, Pepe P, La Vignera S, Improta G, Bosco P, Calogero AE (2013) Poly (ADP-ribose) polymerase 1 protein expression in normal and neoplastic prostatic tissue. *European journal of histochemistry* 57 (2):e13.
60. Ossovskaya V, Koo IC, Kaldjian EP, Alvares C, Sherman BM (2010) Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. *Genes & cancer* 1 (8):812-821.
61. Woodhouse BC, Dianov GL (2008) Poly ADP-ribose polymerase-1: An international molecule of mystery. *DNA Repair* 7 (7):1077-1086.
62. 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 (2010) 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* 28 (16):2784-2795.

63. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 25 (1):118-145.

64. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD (2000) Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol* 53 (2):125-130.

65. Dabbs DJ, Klein ME, Mohsin SK, Tubbs RR, Shuai Y, Bhargava R (2011) High false-negative rate of HER2 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of the Oncotype DX test: an independent quality assurance study. *J Clin Oncol* 29 (32):4279-4285.

66. van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R (2002) A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 347 (25):1999-2009.

67. Biroschak JR, Schwartz GF, Palazzo JP, Toll AD, Brill KL, Jaslow RJ, Lee SY (2013) Impact of Oncotype DX on treatment decisions in ER-positive, node-negative breast cancer with histologic correlation. *Breast J* 19 (3):269-275.

68. Sinn P, Aulmann S, Wirtz R, Schott S, Marme F, Varga Z, Lebeau A, Kreipe H, Schneeweiss A (2013) Multigene Assays for Classification, Prognosis, and Prediction in

Breast Cancer: a Critical Review on the Background and Clinical Utility. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 73 (9):932-940.

69. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, Geyer CE, Jr., Dees EC, Perez EA, Olson JA, Zujewski J, Lively T, Badve SS, Saphner TJ, Wagner LI, Whelan TJ, Ellis MJ, Paik S, Wood WC, Ravdin P, Keane MM, Gomez Moreno HL, Reddy PS, Goggins TF, Mayer IA, Brufsky AM, Toppmeyer DL, Kaklamani VG, Atkins JN, Berenberg JL, Sledge GW (2015) Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Nov 19;373(21):2005-14.

70. Varga Z, Sinn P, Fritzsche F, von Hochstetter A, Noske A, Schraml P, Tausch C, Trojan A, Moch H (2013) Comparison of EndoPredict and Oncotype DX test results in hormone receptor positive invasive breast cancer. *PLoS One* 8 (3):e58483.

71. Dubsy P, Brase JC, 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, Fisch K, Kronenwett R, Gnant M, Filipits M, Austrian B, Colorectal Cancer Study G (2013) The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2-breast cancer patients. *Br J Cancer* 109 (12):2959-2964.

72. Filipits M, Nielsen TO, Rudas M, Greil R, Stoger H, Jakesz R, Bago-Horvath Z, Dietze O, Regitnig P, Gruber-Rossipal C, Muller-Holzner E, Singer CF, Mlineritsch B, Dubsy P, Bauernhofer T, Hubalek M, Knauer M, Trapl H, Fesl C, Schaper C, Ferree S, Liu S, Cowens JW, Gnant M, Austrian B, Colorectal Cancer Study G (2014) The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer. *Clin Cancer Res* 20 (5):1298-1305.

73. Sestak I, Cuzick J, Dowsett M, Lopez-Knowles E, Filipits M, Dubsy P, Cowens JW, Ferree S, Schaper C, Fesl C, Gnant M (2015) Prediction of late distant recurrence after 5 years of endocrine treatment: a combined analysis of patients from the Austrian breast and

colorectal cancer study group 8 and arimidex, tamoxifen alone or in combination randomized trials using the PAM50 risk of recurrence score. *J Clin Oncol* 33 (8):916-922.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Manfred Dietel, Direktor des Instituts für Pathologie der Charité, für meine berufliche Ausbildung und umfassende Unterstützung meiner Forschungsarbeiten, insbesondere der Einrichtung von Freiräumen für die Forschung.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Carsten Denkert, der mich bereits seit meiner Doktorarbeit fördert, mein Forschungsinteresse geweckt hat und auf verschiedenen Ebenen unterstützt. Sein kontinuierlicher Glaube an den Erfolg wissenschaftlicher Projekte sowie sein beständiges Forschungsinteresse haben die translationale Forschung real und praxisnah gemacht.

Ein weiterer Dank gilt PD Dr. Ralf Kronenwett, der mich zu zahlreichen anregenden wissenschaftlichen Diskussionen angeregt und gemeinsame Projekte kontinuierlich unterstützt hat. Insbesondere möchte ich mich bei ihm für seinen Optimismus und seine Ausdauer im Rahmen der Publikation unseres ersten gemeinsamen Papers bedanken ("Someday, every paper will be published!").

Danken möchte ich Dr. Stefan Pahl, der auch inmitten unzähliger Fallabnahmen immer für anregende Diskussionen offen war.

Ein besonderer Dank gilt Judith Lindner, die durch ihre Liebe zur Exaktheit zahlreiche Auswertungen, insbesondere durch unermüdliche Überarbeitung der Tabellen, gerettet hat.

Ergänzend möchte ich mich bei meinem Mitsstreiter Dr. Sven Hartwig für seine Hartnäckigkeit und die kontinuierlichen Ermutigungen bedanken.

Ich möchte weiterhin meiner Turm-Mitbewohnerin Dr. Barbara Ingold-Heppner für ihre beständigen Anregungen und Lebenshilfe in verschiedenen Akutsituationen danken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meiner Schwester, die dank ihrer Korrekturen einen großen Einblick in die Mammakarzinomforschung bekommen hat. Weiterhin danke ich meinen Eltern, dass sie mich mit ihrem Optimismus immer in neuen Aktivitäten unterstützt haben. Ich danke meinem Ehemann Tilman, dass er mit seiner ruhigen Art auch turbulente Situationen besänftigt und mich in allem bedingungslos unterstützt.

Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass

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

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Datum

Unterschrift