

Aus dem
Charité Centrum für Diagnostische und präventive Labormedizin
Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Dietel

Habilitationsschrift

**Prognostische und prädiktive Biomarker
in Mammakarzinomen und Tumoren des weiblichen Genitals**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Pathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

VON

Frau Dr. med. Ruza Arsenic

Eingereicht: Februar 2016

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

1. Gutacher/in: Herr Prof. Dr. Glen Kristiansen
2. Gutacher/in: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Serban-Dan Costa

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologische Daten, Therapie und Molekularpathologie der Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen, Borderlinetumoren des Ovars und Zervix- Karzinomen	1
1.1.1 Mammakarzinom	1
1.1.2 Ovarialkarzinom	3
1.1.3 Aktuell geltende Therapiekonzepte bei Ovarialkarzinomen	4
1.1.4 Borderline-Tumore des Ovars	5
1.1.5 Endozervixkarzinom	6
1.2 Molekulare Prognosefaktoren bei Mammakarzinomen	7
1.3 Molekulare Prognosefaktoren bei Ovarialkarzinomen	9
1.4 Molekulare Prognosefaktoren bei Borderlinetumoren des Ovars	11
1.5 Molekulare Prognosefaktoren bei Zervix-Karzinomen	12
2 Zielstellung	14
3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	15
3.1 Prognosefaktoren für das Mammakarzinom	15
3.2 Prognosefaktoren für das Ovarialkarzinom	26
3.2.1 Cyclin-A1-Expression in Ovarialkarzinomen	26
3.2.2 ERCC1-Expression in Ovarialkarzinomen.....	40
3.3 ERCC1-Expression als Prognosefaktor in Endozervixkarzinomen.....	50
3.4 Fascin 1-Expression in Borderline-Tumoren des Ovars	59
4 Diskussion.....	69
4.1 Bestimmung von prognostischen Markern zur Abschätzung der Prognose und zur Validierung einer molekularen Tumorthherapie bei Brustkrebspatientinnen	70
4.1.1 PIK3CA als Prognosefaktor	70
4.1.2 Therapeutische Möglichkeiten.....	71

Inhalt

4.2	Bestimmung von prognostischen Markern zur Abschätzung der Prognose und zur Validierung einer molekularen Tumorthherapie in Tumoren des weiblichen Genitals	72
4.2.1	Cyclin A1 als Prognosefaktor bei Ovarialkarzinomen	72
4.2.2	ERCC1 als Prognosefaktor in Ovarial und Endozervixkarzinomen.....	74
4.2.3	Fascin 1 als Prognosefaktor in Borderlinetumoren des Ovars.....	75
	Zusammenfassung	77
	Danksagung	79
	Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Literaturverzeichnis	811

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
ARID1A	AT-rich interaction domain-containing protein
BOT	Borderline Ovarian Tumor
BRCA1/2	Breast cancer gen-1/ -2
BRAF	V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
CD95	Fas-receptor (Fas-R; CD95)
CISH	Chromogenic in situ hybridization
DFS	Disease free survival
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Östrogenrezeptor
ERBB2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementation Group 1-Protein
FAS-L	Fas-ligand
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOXM1	Forkhead Box M-1
Her-2	Human epidermal growth factor receptor 2
HGSC	High grade seröses Adenokarzinom

Abkürzungsverzeichnis

HPV	Humane Papillomaviren
HR	Hormonrezeptoren
HGF	Hepatocyte growth factor
IL-6/8/12	Interleukin
IAPs	Inhibitors of apoptosis proteins
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LGSC	Low grade seröses Adenokarzinom
NGS	Next Generation Sequencing
NER	Nucleotide excision repair
OS	Overall survival
PARP	Poly (ADP-ribose)-Polymerase 1
PDK1	Phosphatidylinositol trisphosphate-dependent kinase 1
PFS	Progression free survival
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PR	Progesteronrezeptor
PGP	Permeability glycoprotein
PCNA	Proliferation Cell Nuclear Antigen
qRT-PCR	Real-time quantitative PCR
pCR	pathological complete response

Abkürzungsverzeichnis

RB1	Retinoblastoma 1
RNA	Ribonukleinsäure
RRM1	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit
S6K	S6-kinase
SCCA	Squamous cell carcinoma antigen
SGK	Serum/glucocorticoid regulated kinase 1
TNBC	Tripel negatives Mammakarzinom
TNF- α	Tumor necrosis factor
TOR	Rheb-Target-of-rapamycin
TRAIL	Factor-related apoptosis inducing ligand
TTP	Time to progression
TUBB3	Tubulin beta-3 chain
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World health organization

1 **Einleitung**

1.1 **Epidemiologische Daten, Therapie und Molekularpathologie der Mammakarzinomen, Ovariakarzinomen, Borderlinetumoren des Ovars und Zervix-Karzinomen**

1.1.1 **Mammakarzinom**

Das Mammakarzinom stellt in den industrialisierten Ländern die häufigste bösartige Tumorerkrankung und die zweithäufigste Todesursache bei Frauen dar [1]. Dank Fortschritten in Früherkennung und Therapie hat sich die Prognose des Mammakarzinoms in den letzten Jahren verbessert [2]. Standardisierte Richtlinien für Diagnostik, Therapie und Nachsorge werden in der S3-Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft zusammengefasst [3].

Die häufigsten histologischen Subtypen der Mammakarzinome sind das duktales (etwa 70 %) und das lobuläre (etwa 15 %) Mammakarzinom, andere Typen wie z.B. das papilläre, muzinöse, oder metaplastische Mammakarzinom kommen nur selten vor [4].

Auf dem Gebiet der molekularen Charakterisierung der Mammakarzinome wurden in den letzten Jahren viele Fortschritte erzielt, unter anderem mit der Durchführung von Genexpressionsanalysen, die zeigten, dass es in der Gruppe der Mammakarzinome fünf molekulare Subtypen gibt: luminale, Her2-enriched, basal-like, normal-like und Claudin-low Subtyp [5, 6]. In der Routinediagnostik werden die drei wichtigsten Subtypen durch die Immunhistochemie definiert, HR+; Her-2+ und sog. „tripel negative“ Tumoren (TNBC: ER-; PR-; -Her-2-). Diese immunhistochemisch definierten Subtypen bilden die Grundlage für die therapeutischen Entscheidungen. Die TNBC-Gruppe umfasst sehr aggressive Tumoren, für

Einleitung

welche es zurzeit keine spezifische Therapie gibt [7]. Bei den übrigen Entitäten konnten bereits spezifische Therapien entwickelt werden: So werden z. B. die Hormonrezeptor-positiven Tumore mit Östrogenrezeptor-Modulatoren wie Tamoxifen behandelt. Weiterhin können die Her-2-positiven Tumore mit Her-2-inhibierenden Substanzen, z. B. Trastuzumab, behandelt werden. Die so therapierten Patientinnen haben in der Regel auch eine deutlich bessere Prognose. Bei einem Teil der Patientinnen, ca. 15%, besteht eine Trastuzumab-Resistenz [8]. Die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden ist die charakteristische Eigenschaft der Trastuzumab-resistenten Zellen. In diversen Studien wurde gezeigt, dass eine PIK3CA-Signalweg-Aktivierung den Zellen die Resistenz gegenüber Trastuzumab verleiht [9-11]. Es konnte gezeigt werden, dass der PIK3CA-Signalweg die wichtigste Rolle in einer sog. „breast cancer stem cell-like maintenance“ spielt [12] und damit den Tumoren Resistenz gegenüber einer Therapie mit Trastuzumab vermittelt [13]. Eine wichtige Eigenschaft der sog. „cancer stem-cell like cells“ ist die Fähigkeit, den Apoptose-induzierenden Signalen die durch Chemotherapie [14, 15] und Radiotherapie [16] vermittelt werden, zu widerstehen. Auch bezüglich der TNBC-Gruppe konnten mit der Durchführung der Genexpressionsanalysen neue Erkenntnisse gewonnen werden. So haben entsprechende Analysen gezeigt, dass die TNBC-Gruppe in sieben Subtypen unterteilt werden kann: basal-like 1 (BL1); basal-like 2 (BL2); „immunomodulatory (IM)“; „mesenchymal (M)“; „mesenchymal stem-like (MSL)“; „luminal androgen receptor (LAR)“; und „unstable (UNS)“ [17]. Die interessante Erkenntnis war, dass die sog. „mesenchymal-like“ und „mesenchymal stem cell-like“ Subtypen eine Überaktivierung der Zellsignalwege wie z. B. PIK3CA zeigten. Das Wachstum der Tumorzellen, die einem der angegebenen Subtypen angehörten, konnte mit dem PIK3CA-Inhibitor BEZ235 supprimiert werden [17]. Die Standardtherapie für die TNBC-Gruppe ist die Chemotherapie. PIK3CA-Mutationen sind mit einer Resistenz gegenüber der Chemotherapie assoziiert, wahrscheinlich durch eine Förderung des Zellüberlebens. Präklinische Studien konnten bereits zeigen, dass PIK3CA-Inhibitoren die Effizienz der DNA-schädigenden

Einleitung

Medikamente erhöhen [18-21]. Klinische Studien, die solche Kombinationen bei Patientinnen mit TNBC testen sollen, sind aktuell im Gange [22]. Diese Erkenntnis ist ein wichtiger Beitrag und bietet die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie auch in dieser sonst sehr aggressiven Tumorgruppe, die bislang ohne effiziente Therapiemöglichkeiten war.

1.1.2 Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist die siebthäufigste maligne Erkrankung der Frau und die achthäufigste Todesursache infolge einer Krebserkrankung [23], mit dem high grade serösem Karzinom (HGSC) als häufigste Histologie [24]. Wegen der fehlenden klinischen Frühsymptome präsentiert sich die Mehrheit der Patientinnen in einem fortgeschrittenen klinischen Stadium. Bislang wurden keine zuverlässigen Screeningmethoden für die Früherkennung dieser oft fatal verlaufenden Erkrankung entwickelt. Traditionelle prognostische Faktoren sind Alter der Patientinnen, FIGO-Stadium, Lymphknotenstatus, Tumorgade, histologischer Tumortyp und Residualtumor [25-28]. Die vier häufigsten histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms sind: serös, endometrioid, muzinös und klarzellig. Auf molekularer Ebene zeigen die HGSC eine hohe p53-Mutationsrate und in etwa 22 % der Fälle, eine Mutation in BRCA1/2 sowie eine Deregulation von Signaltransduktionswegen wie Phosphoinositol-3-Kinase (PIK-3), Forkhead Box M-1 (FOX M1), Retinoblastoma 1 (RB1), und Notch [29]. Die LGSC dagegen zeigen oft Mutationen in BRAF- und KRAS-Genen auf [30], wobei die endometrioiden und klarzelligen Ovarialkarzinome Mutationen in AT-rich interaction domain-containing protein (ARID1A)-Genen aufweisen [31]. Die muzinösen Ovarialkarzinome sind häufig KRAS-mutiert und weisen in etwa 30 % der Fälle eine human epidermal growth factor receptor (Her-2)-Mutation auf [32-34]. Diese vier histologischen Subtypen sind auch mit unterschiedlichem biologischem Verhalten und differentem Ansprechen auf die Chemotherapie assoziiert [35].

1.1.3 Aktuell geltende Therapiekonzepte bei Ovarialkarzinomen

Der aktuelle therapeutische Standard ist die chirurgische Therapie gefolgt von systemischer Chemotherapie. Adjuvante Chemotherapie basiert auf Carboplatin in Kombination mit Taxanen [36]. Auch wenn das Ansprechen auf die systemische Therapie zu Beginn hoch ist, erfahren die meisten Patientinnen mit initial fortgeschrittenem Tumorleiden oder bereits vorhandenen Metastasen bei der Diagnosestellung ein Rezidiv, entwickeln eine Platinresistenz und versterben an ihrer Erkrankung [37]. Die Therapie wurde in der letzten Zeit mit der zusätzlichen Gabe von neuen Therapeutika wie z. B. Bevacizumab und PARP-Inhibitoren verbessert, dennoch besteht noch immer Bedarf an der Entwicklung weiterer Therapien, die ein längeres Therapieansprechen ohne begleitende Behandlungs-Toxizität sichern würden. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass die epithelialen Ovarialkarzinome in mehr als 50 % der Fälle immunogene Tumore mit einer spontanen Immunantwort darstellen [38-43]. Diese Erkenntnis könnte in der Zukunft eine weitere therapeutische Option anbieten, nämlich die Möglichkeit der Etablierung der Immuntherapie in dieser Tumorgruppe.

1.1.4 Borderline-Tumore des Ovars

Borderline-Tumoren des Ovars (BOT) machen etwa 10-15 % aller Ovarialtumoren aus, mit serösen BOT als die häufigste Histologie [44]. Diese Tumore stellen eine Zwischenform zwischen Adenom und Karzinom dar. Das wichtigste histologische Merkmal, das sie von Karzinomen unterscheidet, ist die fehlende Stromainvasion. Im Unterschied zu Adenomen zeigen diese Tumore eine erhöhte mitotische Aktivität und eine zytologische Atypie [45]. Borderlinetumore sind häufig mit serösen Zystadenomen oder Adenofibromen assoziiert und haben insgesamt eine gute Prognose [46]. Der Literatur folgend zeigen etwa 7 % der Fälle eine Progression zu low grade serösen Karzinomen [47]. Gewisse klinisch-pathologische Eigenschaften wie z.B. mikropapilläres Wachstum [48-50], Mikroinvasion [51] und fortgeschrittenes Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose [52] weisen auf einen aggressiveren Verlauf hin; allerdings können auch die Fälle ohne diese histopathologischen Eigenschaften mit Rezidiv oder Progression zu einem low grade serösen Karzinom assoziiert sein. [53-55]. Die molekularen Studien haben gezeigt, dass KRAS- und BRAF-Mutationen oft in diesen Tumoren zu finden sind [30, 56]. Zuletzt wurde auch eine 12-bp Insertion-Mutation in ERBB2 in einer Gruppe der Borderline-Tumore beschrieben, die über keine BRAF- oder KRAS-Mutation verfügten [57].

Die therapeutischen Optionen bei diesen Tumoren sind limitiert. Zumeist kommen platinhaltige Chemotherapien und/oder Hormontherapien zum Einsatz, häufig jedoch mit mäßigem Erfolg [58-60].

1.1.5 Endozervixkarzinom

Das Endozervixkarzinom gilt international als die vierhäufigste maligne Krebserkrankung der Frau [21], die vor allem im fortgeschrittenen Stadium mit hohen Mortalitätsraten vergesellschaftet ist. So beträgt die Letalität beim invasiven Zervixkarzinom 60 % [61] während die stadienübergreifende 5-Jahres-Überlebensrate auf 69 % geschätzt wird [62]. In Deutschland stellt das Zervix-Karzinom die elfthäufigste diagnostizierte Krebsart und die zwölft häufigste Ursache für krebsbedingte Todesfälle dar [63, 64]. Zu unspezifischem Schmerzempfinden kommt es häufig erst bei beginnender Metastasierung, andere Symptome (z.B. Ausfluss, Blutungen) finden sich jedoch häufig schon im frühen Stadium. Häufig liegt der Erkrankung eine Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) zugrunde. Ätiologisch ist die Krebsentstehung mit einer Infektion mit high-risk humanen Papillomaviren (HPV-Typen 16, 18, 45, 31, 33, 58, 52, 35, 59, 56, 6, 51, 68, 39, 82, 73, 66 und 70) verbunden, wobei 3 % der Patientinnen mit persistierender HPV-Infektion an einem Zervix-Karzinom erkranken [65]. Bei bestehender HPV-Infektion und gleichzeitiger Einnahme von oralen Kontrazeptiva wird eine Erhöhung des relativen Risikos diskutiert [66]. Histologisch zeigen sich am häufigsten squamöse oder nicht-squamöse Plattenepithelkarzinome (80 %), gefolgt von Adenokarzinomen (10-20 %). Andere Entitäten (adenosquamöse, neuroendokrine, serös-papilläre Karzinome) sind selten [67, 68]. Für die Entstehung einer Dysplasie ist die deregulierte Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7 in epithelialen Stammzellen erforderlich. Die Expression des HPV-E7-Onkoproteins bewirkt dabei eine massive Überexpression des zellulären p16^{INK4a}-Proteins [69, 70]. Als wesentliche morphologische Prognosefaktoren gelten FIGO- bzw. Tumorstadium, das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, die Resektionsränder und die Tumorgröße [71-74]. Unter Umständen kommt auch der Lymphgefäßinfiltration eine prognostische Bedeutung zu [75, 76]. Grundsätzlich weisen neuroendokrin differenzierte Karzinome eine schlechtere Prognose auf [77]. Die prognostische Relevanz der Unterscheidung zwischen Adeno- und

Einleitung

Plattenepithelkarzinomen ist hingegen gering [78]. Therapeutisch kommen in Abhängigkeit von Kurz- und Langzeitfolgen der verschiedenen Therapiemöglichkeiten, dem Allgemeinzustand mit Risikofaktoren, der Lebenssituation der Patientin, dem Tumorstadium, dem Menopausenstatus und dem Vorliegen eines Kinderwunsches eine primäre Operation und eine Radiochemotherapie in Betracht [79]. Eine Kombination von beiden Verfahren findet v.a. bei höhergradigem Tumorstadium statt, bzw., wenn das primäre Therapieziel nicht erreicht wurde. Aufgrund der erhöhten Komorbidität bei der Kombination mehrerer Therapien wird empfohlen, möglichst nur ein primäres Therapieverfahren einzusetzen [79]. Operative Verfahren finden in Deutschland hauptsächlich in den Frühstadien (IA bis IIA) bzw. beim lokal begrenzten Zervixkarzinom Anwendung, bei höheren Stadien wird die Radiochemotherapie angewendet [79-81]. Chemotherapeutisch kommt zumeist Cisplatin zum Einsatz [82, 83].

1.2 Molekulare Prognosefaktoren bei Mammakarzinomen

Zur Abschätzung der Prognose und Planung der Therapie maligner Tumoren werden konventionell-histologische, immunhistochemische und molekulare Prognosemarker herangezogen. In der klinischen Praxis wird die Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors Her-2/neu vor Therapieeinleitung immunhistochemisch bzw. mittels FISH oder CISH untersucht [84, 85].

Im Kontext einer gezielten Therapie gewinnt die Untersuchung auf Mutationen in den am häufigsten betroffenen Genen, wie z. B. PIK3CA, in Mammakarzinomen immer mehr an Bedeutung [86]. Zusätzlich zu diesen haben in den letzten Jahren auch die Genexpressionstests bei der Prognoseeinschätzung an Bedeutung gewonnen [87-90]. Zu den bekanntesten Tests gehören: Oncotype DX® (Genomic Health; Redwood City, CA, United States of America),

Einleitung

EndoPredict®- Test (Sividon Diagnostics; Köln, Deutschland) und Pam50/Prosigna® (Nanostrings Technologies; Seattle, WA, United States of America) [87]. Grundlage aller drei Tests ist die Bestimmung der Genexpression bestimmter Gene im FFPE-Gewebe, wobei sowohl Anzahl als auch Auswahl der Gene partiell differieren [87].

Aktuell wird beim TNBC die Rolle diverser Biomarker diskutiert, die z. T. auch nur in dieser Tumorgruppe exprimiert werden. Zum Beispiel konnte eine EGFR-Expression in 40-50 % der Mammakarzinome und in bis zu 80 % der TNBC nachgewiesen werden. EGFR ist einer von vier Rezeptoren (EGFR (ErbB-1), HER-2/neu (ErbB-2), HER-3 (ErbB-3) und HER-4 (ErbB-4)) der ErbB-Familie – diese Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Tumorzellproliferation [91, 92]. Der EGFR-Signalweg ist für die Zellproliferation, Angiogenese, Metastasierung und Apoptoseinhibition von Bedeutung [93]. In mehreren Studien konnte eine EGFR-Expression als prognostischer Marker in der TNBC Gruppe der Mammakarzinome nachgewiesen werden [94, 95].

Ein weiterer prognostischer Marker in dieser Tumorgruppe ist VEGF. Die Angiogenese ist wichtig für das Tumorwachstum und wird durch VEGF vermittelt. In mehreren Studien konnte eine hohe VEGF-Expression im DCIS und invasivem Mammakarzinom gezeigt werden – auch eine Assoziation mit der Prognose konnte festgestellt werden [96, 97]. In der TNBC-Tumorgruppe war eine hohe VEGF-Expression statistisch signifikant mit kürzerem DFS und OS assoziiert. Weiterhin bestand eine Korrelation mit der Tumorgröße und dem Tumorgrad [98-100].

Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt bei vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle: Es reguliert den Zellzyklus, das Zellwachstum, die Proliferation sowie die Apoptose [101]. Mutationen in diesem Gen können zur Karzinogenese führen. In 18-25% Mammakarzinomen lässt sich eine Mutation in *TP53* finden [102]. Weiterhin konnte in Mammakarzinomen eine prognostische Rolle für p53 nachgewiesen werden. Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine

Einleitung

persistierende p53-Aktivierung mit einer aggressiven Tumorform und kürzerem DFS und OS in TNBC-Patientinnen assoziiert ist [103-106]. Darüber hinaus führt eine p53-Überexpression zu einer niedrigeren Chemosensitivität, was diesem Protein auch eine prädiktive Rolle verleiht [107, 108].

Ein weiterer prognostischer und prädiktiver Marker im Mammakarzinom ist ki67. Ki67 ist ein Marker der zellulären Proliferation und führte in mehreren Studien zu einer besseren Vorhersage des Therapieansprechens und Prognose in der Gruppe der Patientinnen, die eine neoadjuvante Therapie erhalten haben [109-111].

1.3 Molekulare Prognosefaktoren bei Ovarialkarzinomen

Die isolierte Anwendung der klassischen histopathologischen Kriterien ist wenig aussagekräftig, wenn es um das Beurteilen der Ansprechbarkeit auf die Chemotherapie in dieser Tumorgruppe geht. Wegen des weiterhin schlechten Verlaufs und der schlechten Prognose der Patientinnen mit Ovarialkarzinom besteht ein dringender Bedarf an der Identifikation neuer molekularer Parameter, die es erlauben würden, die Prognose sowie das Ansprechen auf die Therapie besser vorherzusagen. Die bekanntesten molekularen Prognosefaktoren in high grade serösen Adenokarzinomen des Ovars sind BRCA1/2-Mutationen. BRCA1 und BRCA2 sind essenzielle Komponenten der Reparatur doppelsträngiger DNA mittels homologer Rekombination (HR). Ein Verlust der BRCA-Funktion resultiert in DNA-Reparatur mittels alternativer, nicht konservativer und fehleranfälligerer Mechanismen (z. B. nicht homologe Rekombination), welche zu einer genomischen Instabilität und somit zur Karzinogenese führen können [112]. Etwa 10 % der Frauen mit einem invasiven epithelialen Ovarialkarzinom sind Träger von BRCA1- oder BRCA2-loss-of-function-Mutationen oder -Deletionen. Lange Zeit

Einleitung

herrschte Uneinigkeit bezüglich der prognostischen Bedeutung dieser Mutationen. In einer umfassenden Studie haben internationale Wissenschaftler und das Cancer Genome Atlas Research Network 26 Studien über das invasive epitheliale Ovarialkarzinom untersucht und evaluiert [113]. Interessanterweise wurde festgestellt, dass die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei Patientinnen ohne BRCA-Mutation 36 % betrug, wohingegen BRCA1-Mutationsträgerinnen eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 44 % und BRCA2-Mutationsträgerinnen von 52 % zeigten. Auch in der aktuellen Studie von Dong et al. (2016) konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit einer sog „BRCA1/2 mutational signatur“ eine bessere Prognose haben [114]. Dies ist z. T. auf das jüngere Patientenalter, optimale Debulking oder eine erhöhte Sensitivität bei platinhaltigen Chemotherapeutika zurückzuführen [115, 116].

In einer weiteren Studie wurde eine begrenzte prognostische Bedeutung der Matrix-Metalloproteasen (MMP) MMP-2 und MMP-14 beschrieben [117]. MMPs sind zinkabhängige Proteasen, welche in normalen physiologischen Prozessen, wie z. B. Gewebemodellierung, Reproduktion aber auch in diversen Karzinomen eine Rolle spielen [118].

Eine neuere Studie [119] zeigt, dass die molekularen Subtypen des HGOS mit einer unterschiedlichen Prognose assoziiert sind. Die Klassifizierung der molekularen Subtypen: „Immunoreactive“, „Differentiated“, „Proliferative“ und „Mesenchymal“ basiert dabei auf Gesamt-Genom-mRNA-Expressionsanalysen [29].

Weiterhin werden viele Proteine als prognostische oder prädiktive Marker im Ovarialkarzinom diskutiert. Dazu gehören z. B. Onkogene und Tumorsuppressoren: p53, WT1 (Wilms Tumor); Proliferationsmarker: Ki67, PCNA, Topoisomerasen; Zellzyklus-Regulatoren: Zykline; Zyklin-Inhibitoren: p21, p27, p57 und p16; Apoptosefaktoren: TRAIL und die Rezeptoren, Mitglieder der Bcl-2-Familie, Caspasen; Apoptose-Inhibitoren: IAPs; Reparaturenzyme: PARP, ERCC1; Angiogenesemarker und Tyrosine-Kinase-Rezeptoren (TKR) [120].

1.4 Molekulare Prognosefaktoren bei Borderlinetumoren des Ovars

Trotz einiger durchgeführter Studien auf dem Gebiet der molekularen Charakterisierung der Borderline-Tumoren des Ovars, fehlen noch immer klare Kriterien, die es erlauben würden, die Fälle mit unterschiedlicher Prognose zu identifizieren oder das Ansprechen auf die Therapie vorhersagen zu können [121-123]. Einer der untersuchten Marker in dieser Tumorengruppe ist CEACAM6, welcher in muzinösen Borderline-Tumoren und invasiv-muzinösen Karzinomen exprimiert wird. Ein prognostischer oder prädiktiver Wert der CEACAM6-Expression in den Borderline-Tumoren konnte aber nicht bewiesen werden [124].

Eine andere Studie analysierte die Expression der Proliferationsmarker Ki-67/MIB-1, Phosphohistone H3 (PHH3) und Survivin in den benignen-, Borderline-Tumoren und Karzinomen des Ovars. Die Expression aller drei Marker war in den Karzinomen höher als in benignen- oder Borderline-Tumoren des Ovars. Auch wenn eine höhere PHH3-Expression in Ovarialkarzinomen als in Borderline-Tumoren zu finden war, konnte kein prognostischer Wert nachgewiesen werden [125].

Ein weiteres Protein, welches in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert wird, ist Survivin – ein Apoptose-hemmendes Protein der IAP-Familie, welches überwiegend in der G2/M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird. Auch wenn eine höhere Survivin-Expression in Borderline-Ovarialtumoren und -Karzinomen nachgewiesen werden konnte [126], sind die Resultate bezüglich des prognostischen Werts sehr umstritten [127-130].

CD24 ist ebenfalls ein Protein mit tumorbiologischer Bedeutung. In einer Studie wurde die Expression von CD24 in Borderline-Tumoren und invasiven Ovarialkarzinomen untersucht. Trotz einer Expression in beiden Gruppen konnte ein prognostischer Wert nur in invasiven

Einleitung

Ovarialkarzinomen festgestellt werden. Dabei ging eine zytoplasmatische Expression von CD24 mit einer niedrigen Gesamtüberlebenszeit einher [131].

1.5 Molekulare Prognosefaktoren bei Zervix-Karzinomen

Auch bei Zervix-Karzinomen fehlen bisher molekulare Parameter, mittels derer zuverlässige prognostische Aussagen in Abhängigkeit der Therapie ermöglicht werden.

Trotz dem Nachweis, dass die Krebsentstehung mit einer Infektion mit high-risk humanen Papillomaviren verbunden ist, ist die prognostische Bedeutung einer HPV Infektion noch immer umstritten. In der Studie von Lau et al [132] wurde eine potenzielle prognostische bzw. prädiktive Bedeutung einer HPV Infektion untersucht. In der univariaten Analyse war eine HPV 16 Infektion mit schlechterem DFS und das non-HPV 16 alpha-9 Spezies mit einem besseren DFS assoziiert, ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. In der multivariaten Analyse konnte dem HPV Status kein prognostischer Wert nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Studie von Bareto et al. [133]. Interessanterweise zeigte eine weitere Studie, welche gleichzeitig das HPV Status und das Serum-Niveau der HGF untersuchte, das HGF Niveau im Serum der Patientinnen einen prognostischen Wert hat, wobei für HPV Status wiederum kein prognostischer Wert nachgewiesen werden konnte [134].

Des Weiteren wird für die Marker TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, TRAIL, CD95, FAS-L oder VEGF eine mögliche prognostische Bedeutung in dieser Tumorgruppe diskutiert [135-140]. So zeigte die Studie von Kotowitz et al, dass das Niveau der im Serum bestimmter Marker (TNF, SCCA und IL-6) bei Patientinnen mit Rezidiv statistisch signifikant höher war als bei diesen ohne Rezidiv [135].

2 Zielstellung

Das Ziel der Studien, welcher der vorliegenden Habilitationsschrift zugrunde liegen, war es, bestimmte molekulare Marker auf ihre Nützlichkeit als Prognostik- oder Prädikativfaktoren für die Behandlung von Mamma-, Ovarial- und Endozervixkarzinomen sowie Borderlinetumoren des Ovars hin zu untersuchen. In den Studien wurden dabei die folgenden potenziellen Prognose- bzw. prädiktiven Marker untersucht: Zum einen die Rolle des PIK3CA-Mutationsstatus in Mammakarzinomen, weiterhin die Cyclin-A1-Expression in Ovarialkarzinomen auf Protein- und RNA-Ebene, drittens die ERCC1-Expression in Ovarial- und Endozervixkarzinomen, sowie viertens die Fascin 1-Expression in Borderlinetumoren des Ovars. Insgesamt wurden 5 Studien durchgeführt, die sich mit den folgenden Aspekten auseinandersetzten:

1. In der ersten Studie wurde der Mutationsstatus des PIK3CA-Genes (eines der am häufigsten mutierten Gene in Mammakarzinomen) untersucht und mit den klinisch-pathologischen Daten und dem Überleben korreliert.
2. In zwei weiteren Studien wurden die prognostischen und prädiktiven Faktoren in Ovarialkarzinomen untersucht (Cyclin-A1-Expression in Ovarialkarzinomen immunhistochemisch und Cyclin A1 z. T. auch auf mRNA-Ebene und ERCC1-Expression).
3. Eine Studie beschreibt die Analyse und mögliche prognostische Rolle der ERCC1-Expression im Endozervixkarzinom.
4. Eine weitere Studie behandelte die Fascin1-Expression in Borderline-Tumoren des Ovars als potenziellen prognostischen Marker.

3 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.1 Prognosefaktoren für das Mammakarzinom

Literatur: Ruza Arsenic, Denise Treue, Annika Lehmann, Michael Hummel, Manfred Dietel, Carsten Denkert und Jan Budczies. Comparison of targeted next generation sequencing and Sanger sequencing for the detection of PIK3CA mutation in breast cancer subtypes. BMC Clin Pathol. 2015 Nov 18; 15:20. eCollection 2015.

BMC Clin Pathol. 2015 Nov 18;15:20.

<http://dx.doi.org/10.1186/s12907-015-0020-6>.

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit der Bestimmung des PIK3CA-Mutationsstatus in Mammakarzinomen befasst. PIK3CA steht für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha und stellt das Gen dar, das p110 alpha kodiert. Es ist auf dem Chromosom 3q26.3 lokalisiert. PIK3CA ist eines der am häufigsten mutierten Gene in Mammakarzinomen und findet sich nach den Angaben des TCGA in etwa 36 % der Fälle [141, 142]. Das Gen besteht aus 20 Exonen, welche insgesamt 1068 Aminosäuren kodieren. Neben Mammakarzinomen ist PIK3CA in vielen anderen Karzinomen mutiert, vor allem in Prostata, Kolon und Endometrium [143]. In diesen Karzinomen sind 80 % der Mutationen in den sog. „hotspots“ zu finden. Zwei dieser hotspots sind in der „helical domain“ von p110alpha und der dritte ist in der „kinase domain“ zu finden. Diese Hotspotmutationen verursachen eine Hyperfunktion in p110alpha und eine Überregulation der Lipid-Kinase-Aktivität im mutierten Protein [144-146]. Ferner kann eine Hyperaktivierung des PIK3CA-Signalweges auch durch die Amplifikation des PIK3CA-Gens verursacht werden [147, 148]. Weiterhin kann die Aktivierung auch durch den Verlust von PTEN, dem PIK3CA-Antagonisten, bedingt sein [149-156]. Zusätzlich führt eine Hyperfunktion in übergeordneten Kontrollelementen wie z. B.

15

Zusammenfassung der Ergebnisse

EGFR zu verstärkter Aktivierung des PIK3CA-Signalweges in diversen Karzinomen [157-161].

Das Häufigkeitsauftreten der Mutationen: In unserem Patientenkollektiv, bestehend aus 186 Fällen, fanden wir eine Mutationsrate von etwa 35 %, indem wir die Hotspots in den Exons 9 und 20 sowie drei zusätzliche Exons (1, 5 und 13) mittels NGS sequenziert haben. Die Mutationshotspots fanden sich in den Kodons 542, 545 (Helikal-Domäne) und 1047 (Kinase-Domäne). In zwei untersuchten Fällen konnten jeweils zwei Mutationen detektiert werden. Hierbei fanden wir einen statistisch signifikanten Unterschied in der Mutationsrate zwischen HR+ und HR- sowie Her-2+ und Her-2-Patientinnen. Die Mutationsrate des PIK3CA-Gens war bei vorliegendem HR+ oder Her2+ statistisch signifikant höher als in HR- und in Her-2-negativen Fällen ($p = 0.002$). Weiterhin bestand ein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf den Tumorgrad (G1; $p < 0.001$) und Lymphknotenbefall ($p = 0.042$). Die meisten mutierten Fälle waren gut differenziert und zeigten Lymphknotenmetastasen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass PIK3CA eine pathogenetische Rolle in der Entwicklung von Mammakarzinomen spielt und die Mutationen in einem frühen Stadium der Tumorphathogenese entstehen [162]. In Bezug auf das Gesamtüberleben konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen mutierten und nicht mutierten Fällen beobachtet werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

3.2 Prognosefaktoren für das Ovarialkarzinom

3.2.1 Cyclin-A1-Expression in Ovarialkarzinomen

Literatur: Ruza Arsenic, Elena Ilona Braicu, Anne Letsch, Manfred Dietel, Jalid Sehouli, Ulrich Keilholz, Sebastian Oxenreither. Cancer-testis antigen Cyclin A1 is broadly expressed in ovarian cancer and is associated with prolonged time to tumor progression after platinum-based therapy. BMC Cancer. 2015 Oct 24; 15(1):784. doi: 10.1186/s12885-015-1824-6.

BMC Cancer. 2015 Oct 24;15:784

<http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1824-6>.

Cyclin A1 ist ein essenzielles Protein für die Gametogenese in Testis. In akuter myeloischer Leukämie spielt Cyclin A1 die Rolle eines Leukämie-assoziierten Antigens und es konnte hier in einer früheren Studie eine erhöhte Expression nachgewiesen werden [163]. Eine Überexpression von Cyclin A1 wurde auch in den soliden Tumoren wie z. B. Keimzelltumoren sowie Endometriumkarzinomen beschrieben [164]. Diese Resultate sind insofern wichtig, weil sie unter der Voraussetzung, dass die restlichen Kriterien (intrazelluläre Lokalisation, hohe Anzahl an Epitopen, Expression in den meisten Tumorzellen) erfüllt sind, die Grundlage einer sog. T-Zell-Therapie bilden könnten.

Eine gezielte T-Zell-Therapie besteht aus einer Impfung oder einem adoptiven Transfer von T-Zellen mit einer spezifischen Reaktivität gegen definierte tumorassoziierte Antigene (TAA) und ist eine sinnvolle Erweiterung der bereits etablierten Therapiestrategien. Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Tumorleiden, die initial chirurgisch und danach mit systemischer Chemotherapie behandelt worden sind, stellen exzellente Kandidatinnen für eine T-Zell-Therapie dar. Die minimale Tumorlast und eine Tumorimmunogenität, die nach Gabe von Paclitaxel verstärkt werden kann, sind die Hauptgründe dafür [165, 166]. Ein essenzieller

Zusammenfassung der Ergebnisse

Schritt in der Entwicklung der T-Zell-Therapie ist aber die Auswahl des geeigneten Antigens [167, 168].

In unserer Studie haben wir eine Cyclin-A1-Expression in unterschiedlichen nicht hämatologischen Tumoren zunächst mithilfe der GEO NCBI Daten (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) untersucht. Diese initiale in-silico-Analyse zeigte bei allen analysierten Datensets nur in den Ovarialkarzinomen eine hohe Expression. Das war der Grund dafür, Cyclin A1 als potenzielles T-Zell-Zielantigen in dieser Tumorgruppe zu untersuchen.

Wir haben als weiteren Schritt eine immunhistochemische Expression von Cyclin A1 in 72 high grade serösen Adenokarzinomen des Ovars untersucht. Es fand sich eine wenigstens moderate Expression in den meisten untersuchten Ovarialkarzinomen, genau in 43 von 62 (69%) G3-Tumoren und in einem von zehn (10%) G2-Tumoren. Um die immunhistochemischen Resultate zu verifizieren, wurde RNA aus den Tumoren isoliert und eine qRT-PCR durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Immunhistochemie und mRNA-Expression ($p = 0.042$). In Bezug auf das Überleben bestand eine Assoziation zwischen längerem TTP und Cyclin-A1-Expression in der univariaten Analyse.

Um eine potenzielle Verzerrung der Resultate durch die unterschiedlich effektive Zytoreduktion auszuschließen, haben wir eine weitere Analyse durchgeführt und nur die Patientinnen mit einem residualen Tumor eingeschlossen. In dieser Patientinnengruppe war der Unterschied in TTP noch höher, was darauf hindeutet, dass Cyclin-A1-Expression prädiktiv für ein Ansprechen auf die Standard-First-Line-Chemotherapie ist. Um diese Beobachtung weiter zu bekräftigen, haben wir den online verfügbaren Kaplan-Meier-Plotter [169] benutzt, um die Daten von sechs unterschiedlichen Studien sowie aus dem Cancer Genome Atlas (TCGA) (TCGA, Version 2011) zu analysieren. Es wurden insgesamt 264 Fälle mit serösem epithelalem Karzinom Stadium II-IV, suboptimaler Debulking und Platin-Therapie analysiert.

Auch hier war eine hohe Cyclin-A1-Expression mit längerem TTP assoziiert.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

3.2.2 ERCC1-Expression in Ovarialkarzinomen

Literatur: Mustafa Zelal Muallem, Ioana Braicu, Mani Nassir, Rolf Richter, Jalid Sehouli, Ruza Arsenic. ERCC1 Expression as a Predictor of Resistance to Platinum-based Chemotherapie in Primary Ovarian Cancer. *Anticancer Research* 34:393-400 (2014).

Anticancer Res. 2014 Jan;34(1):393-9.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403493>

Die Platin-basierte Therapie ist die Therapie der Wahl in der Behandlung von Ovarialkarzinomen [170]. Viele Patientinnen erleiden jedoch ein platinresistentes Rezidiv [171]. Von einer Platin-Resistenz wird dabei immer dann gesprochen, wenn es während einer platin-basierten Chemotherapie zu einer Progression kommt, oder sich innerhalb von 6 Monaten nach abgeschlossener Therapie ein Rezidiv bildet.

Präklinische und klinische Studien legen eine potenzielle Rolle von ERCC1 als molekularen Prädiktor im Rahmen einer Platin-basierten Therapie nahe [172-174].

Bekannt ist, dass das ERCC1-Protein eine essentielle Rolle in der DNA-Reparatur u.a. im Rahmen einer Platintherapie bei Ovarialkarzinomen spielt [175]. ERCC1 ist das einzige Enzym, das für die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und Reparatur der Vernetzungen zwischen und innerhalb der DNA Stränge benötigt wird und in der Lage ist, alle Arten der durch Platin verursachten DNA-Schädigungen zu beseitigen [176].

In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte ERCC1-Expression bei Patienten mit Lungen-, Kolon-, Pankreas-, Magen- und Harnblasenkarzinom mit kürzerem Überleben assoziiert ist, während sich eine niedrige ERCC1-Expression umgekehrt zumeist positiv auf das Gesamtüberleben der Patienten auswirkt [177-181]. Für Patientinnen mit Ovarialkarzinomen fehlen jedoch bisher entsprechende Untersuchungen. Falls steigende ERCC1-Scores auch bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom die Wahrscheinlichkeit einer Resistenz gegen Platin-basierte

Zusammenfassung der Ergebnisse

Chemotherapie erhöhen, sollten für die betroffenen Patientinnen im Sinne der Förderung einer individualisierten, patientenbezogenen Krebstherapie frühzeitig Therapiealternativen festgelegt bzw. die Bestimmung des ERCC1-Scores routinemäßig implementiert werden. Ein nicht-vorliegender Zusammenhang zwischen ERCC1-Expression und Überlebenszeit resp. Resistenz-Risiko würde beim Ovarial-Karzinom (im Gegensatz zu anderen Krebserkrankungen) auf eine geringe prädiktive Bedeutung des Moleküls hindeuten.

In unserer Studie haben wir eine Assoziation zwischen ERCC1-Expression und einer potenziellen Platin-Resistenz bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Rahmen einer first-line Chemotherapie untersucht. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, festzuhalten, ob sich zwischen dem Vorliegen einer ERCC1-Expression und der Resistenz gegen Platin-basierte Chemotherapeutika, welche DNA-Schädigungen bewirken können, statistische Zusammenhänge identifizieren lassen.

Das Gesamtkollektiv setzte sich aus n=98 Patientinnen zusammen, von denen bei n=68 Patientinnen eine platin-basierte Therapie bei vorliegender Tumorregression durchgeführt wurde (Responder), während bei n=30 Patientinnen eine Platin-Resistenz vorliegend war, also eine Progression trotz platin-basierter Chemotherapie (Non-Responder). Mittels immunohistochemischer Analyse wurde in beiden Patientinnengruppen der ERCC1-Status bestimmt. In beiden Gruppen wurden die Patientinnen entsprechend dem ermittelten H-Score entweder als niedrig, mittel oder hoch ERCC1-expressiv klassifiziert. In statistischer Hinsicht wurde anschließend untersucht, ob zwischen dem Grad der ERCC1-Expression und der Tumorreaktion auf die Standardchemotherapie bestehend aus Carboplatin und Paclitaxel Zusammenhänge bestehen (primärer Endpunkt), bzw. wie sich das progressionsfreie Überleben bzw. die Gesamtüberlebenszeit in beiden Teilkollektiven gestaltete (sekundäre Endpunkte).

Zusammenfassung der Ergebnisse

Insgesamt fanden sich in der Responder-Gruppe mehr Patientinnen mit hohem H-Score (26,5 % vs. 13,3 % in der Non-Responder-Gruppe), während der Anteil der Patientinnen mit niedriger ERCC1-Expression im Teilkollektiv mit Platin-Resistenz größer war (40 % vs. 27,9 %).

In beiden Gruppen war die Gesamtüberlebenszeit abhängig vom H-Score der ERCC1-Expression: In der Responder-Gruppe fand sich die höchste Überlebenszeit bei Patientinnen mit mittlerem H-Score (76 Monate), während sich bei niedrigem H-Score die geringste Überlebenszeit abzeichnete (59 Monate). Bei den Patientinnen des Non-Responder-Kollektivs zeigte sich die höchste Überlebenszeit (28 Monate) bei mittlerem H-Score und die geringste Überlebenszeit bei hohem H-Score (15 Monate). Bei der progressionsfreien Überlebenszeit zeigten sich in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen Patientinnen mit niedrigem, mittlerem und hohem H-Score.

Die Gesamtüberlebenszeit war in der Responder-Gruppe signifikant höher als in der Non-Responder-Gruppe (65 Monate vs. 21 Monate, $p < 0.001$). Auch die progressionsfreie Überlebenszeit war in der Responder-Gruppe deutlich höher (31 Monate vs. 9 Monate).

Festgehalten werden konnte daher, dass im vorliegenden Kollektiv kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem H-Score der ERCC1-Expression und der Reaktion auf die platin-basierte Chemotherapie bestand, bei hohem H-Score also nicht unbedingt von einer höheren Resistenz-Wahrscheinlichkeit ausgegangen werden kann. Auch beim progressionsfreien Überleben zeigten sich keine Unterschiede, während in der Non-Responder-Gruppe der Grad der ERCC1-Expression prädiktiv für eine schlechtere Gesamtüberlebenszeit war. Beim Ovarialkarzinom lässt sich (zumindest im untersuchten Kollektiv) kein höheres Resistenz-Risiko bei steigendem H-Score nachweisen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

3.3 ERCC1-Expression als Prognosefaktor in Endozervixkarzinomen

Literatur: Mustafa Zelal Muallem, Simone Marnitz, Rolf Richter, Christhardt Köhler, Jalid Sehouli, Ruza Arsenic. ERCC1 Expression As a Predictive Marker of Cervical Cancer Treated with Cisplatin-based Chemoradiation. *Anticancer Research*. 2014; 34: 401-406.

Anticancer Res. 2014 Jan;34(1):401-6.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403494>

Plattenepithelkarzinome stellen die häufigsten Karzinome der Endozervix als Subform des Zervix-Karzinoms dar. Wie auch bei anderen Tumorentitäten, haben Patientinnen mit lokal fortgeschrittenen Karzinomen ein hohes Rezidivrisiko und eine schlechte Prognose [182]. Eine Cisplatin-basierte Chemotherapie ist die Therapie der Wahl bei den Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem Endozervixkarzinom. Die zytotoxische Aktivität der Platin-haltigen Chemotherapie basiert auf Bildung der DNA Addukte, welche die Vernetzungen innerhalb und zwischen der DNA Stränge produzieren [183]. ERCC1 ist das Enzym, das eine essentielle Rolle in der Reparatur dieser durch Chemotherapie entstandenen Schäden spielt. Eine Korrelation zwischen einer hohen ERCC1-Expression und einer Cisplatin-Resistenz sowie schlechten Überlebensraten wurde bereits für verschiedene Tumortypen beschrieben, wie z.B. bei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen [184, 185], während sich selbige Zusammenhänge (wie im letzten Kapitel aufgezeigt) für das Ovarialkarzinom nicht nachweisen ließen.

In der vorliegenden Studie wurde eine mögliche Korrelation zwischen der Expression des ERCC1-Proteins und Gebärmutterhalskrebs untersucht. Dabei sollte analysiert werden, inwiefern sich eine ERCC1-Expression als prädiktiver Marker beim Zervixkarzinom verhält, dh., ob bei Patientinnen, die hohe ERCC1-Expressionswerte aufweisen, bei kombinierter Radio- und Chemotherapie mit dem Wirkstoff Cisplatin, eine schlechtere (oder günstigere?)

Zusammenfassung der Ergebnisse

Prognose erwartet werden kann und inwiefern der Grad der ERCC1-Expression mit dem Platin-Resistenz-Risiko korreliert.

Das ERCC1-Enzym spielt eine geschwindigkeitslimitierende Rolle im Rahmen der Nukleotidexzisionsreparatur, dh., bei hoher ERCC1 Expression verlangsamt sich also die Identifizierung und Eliminierung von Cisplatin-induzierten DNA-Addukten [186].

In verschiedenen Studien wurde ferner nachgewiesen, dass bei Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses statistische Korrelationen zwischen dem Anstieg der ERCC1-Expression und einer Cisplatin-Resistenz, sowie damit verbunden mit schlechteren Überlebensraten bestehen [184, 185, 187].

In der durchgeführten retrospektiven Longitudinal-Studie wurde analysiert, ob statistische Zusammenhänge zwischen der ERCC1-Protein-Expression (die sich als semi-quantitativer H-Score bezogen auf die Farbintensität und dem Prozentsatz der positiv gefärbten Tumorzellen präsentierte), dem progressionsfreien Überleben (PFS), sowie dem Gesamtüberleben (OS) bestehen. Insgesamt wurden n=112 Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem Gebärmutterhalskrebs in die Studie miteinbezogen, die mit Cisplatin-basierter Radiochemotherapie mit oder ohne gleichzeitiger Hysterektomie behandelt wurden. Bei allen Patientinnen wurde immunohistochemisch der H-Score zur Darstellung des Grads der ERCC1-Expression erhoben.

Ziel der Studie war es, das progressionsfreie-Überleben und die Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit vom H-Score zu ermitteln (primärer Endpunkt). Entsprechende follow-up-Untersuchungen fanden entsprechend den Vorgaben der Therapie-Leitlinien halbjährlich innerhalb der ersten 2 Jahre nach erfolgter Radiochemotherapie und danach einmal pro Jahr statt.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei 90 Prozent der Zervixkarzinom-Patientinnen des Kollektivs fand sich ein Adenokarzinom, während bei 10 Prozent diagnostisch ein fortgeschrittenes Plattenepithelkarzinom vorliegend war. Hintergrund dieser ungleichen Verteilung ist die Versorgung des deutlich seltener auftretenden Adeno-Zervixkarzinoms meistens in universitären Zentren wie die Charité in Berlin, in welcher die Studie durchgeführt wurde.

Entsprechend dem H-Score zur Darstellung des Grads der ERCC1-Expression konnten die Patientinnen in drei Gruppen aufgeteilt werden: 36 % der Patientinnen (n=40) verfügten über einen niedrigen H-Score (0-1), bei 20 % (n=22) war ein mittlerer H-Score vorliegend (1,5-2,5), während sich bei 45 % (n=50) ein hoher H-Score (3) fand. Bezüglich Alter, Tumorstatus- und Grad, sowie klinischer und pathologischer Kennzeichen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Subgruppen.

Ersichtlich war, dass in vorliegendem Kollektiv ein steigender H-Score mit einer besseren Prognose korrelierte, sich die ERCC1-Expression also positiv auf das Gesamtüberleben und die progressionsfreie Überlebenszeit auswirkte. So betrug die 2-Jahres-Überlebensrate bei den Zervix-Karzinom-Patientinnen mit niedrigem H-Score 68,8 %, bei den Patientinnen mit mittlerem H-Score 71,7 % und in der Gruppe mit hohem H-Score 90,7 %. Der Anteil der Patientinnen mit 2-jähriger progressionsfreien Überlebenszeit betrug in der Gruppe mit niedrigem H-Score 49,7 %, sank dann auf 33,5 % ab (mittlerer H-Score), um bei den Patientinnen mit hohem H-Score auf 72,7 % anzusteigen, wobei die gruppenspezifischen Unterschiede sowohl beim Gesamtüberleben als auch bei der progressionsfreien Überlebenszeit jeweils statistisch signifikant waren.

Während sich bei Tumorerkrankungen, die nicht das weibliche Genital betrafen (Lungen-, Kolon-, Pankreas-, Magen- und Harnblasenkarzinom), eine hohe ERCC1-Expression also negativ auf Prognose auswirkte und sich beim Ovarialkarzinom nur geringe Effekte zeigten, ist

Zusammenfassung der Ergebnisse

ein hoher ERCC1-H-Score beim Zervix-Karzinom offenbar mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit und einer höheren progressionsfreien Überlebenszeit assoziiert.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

3.4 Fascin 1-Expression in Borderline-Tumoren des Ovars

Literatur: Ahmed El-Balat, Ruza Arsenic, Nicole Sanger, Thomas Karn, Sven Becker, Uwe Holtrich, Knut Engels. Fascin-1 expression as stratification marker in borderline epithelial tumours of the ovary. *BMJ J Clin Pathol.* 2016; 69: 142-148.

J Clin Pathol. 2016 Feb;69(2):142-8.

<http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203224>.

Als Borderline-Tumoren des Ovars werden diejenigen Tumore bezeichnet, die sich weder der benignen noch der malignen Kategorie zuordnen lassen. Die Therapie dieser Tumorgruppe ist noch umstritten, insbesondere bei serösen Borderline-Tumoren des Ovars, die gleichzeitig auch die häufigste Gruppe dieser Tumorkategorie darstellt [188]. Auch wenn die Prognose für Patientinnen mit ovarialen Borderline-Tumoren häufig günstig ist, erleiden einige Patientinnen Rezidive und versterben an ihrem Tumorleiden [189, 190]. Folglich ist die Identifikation der Rezidiv-assoziierten Risikofaktoren und der Tumor-assoziierten Ursachen für die Morbidität essentiell [189, 191, 192]. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine actin-bundling-protein-fascin-1 (FSCN1)-Expression in diversen Karzinomen mit Invasion und Metastasierung assoziiert ist [193-198].

Ziel der Studie war es, die Fascin 1-Expression bei Patientinnen mit Borderline-Tumoren des Ovars in Hinsicht auf eine potenzielle prognostische Rolle hin zu untersuchen. Insgesamt wurden n=140 Patientinnen mit ovarialen Borderline-Tumoren in die Studie eingeschlossen, bei denen immunohistochemisch das Vorliegen einer Fascin 1-Expression ermittelt wurde.

60 % der Patientinnen (n=84) konnten dem serösen Tumortyp zugeordnet werden, während bei 32,1 % (n=45) ein muzinöser Borderline-Tumor des Ovars vorliegend war. Der endometrioider Typ sowie BOT-Mischtypen spielten im vorliegenden Kollektiv mit 1,4 % (n=2) bzw. 6,4 %

Zusammenfassung der Ergebnisse

(n=9) nur eine geringe Rolle. Eine Fascin-1-Expression fand sich insgesamt in 52,1 % der eingeschlossenen Patientinnen (n=72). Bei 14,3 % (n=20) fand sich sogar eine starke Expression. Mikropapilläre Muster fanden sich partiell bei 17,9 % der Patientinnen (n=25) und in ausgeprägter Form bei 5 % (n=7).

Die Resultate unserer Studie zeigten eine hochsignifikante Assoziation zwischen einer Fascin 1-Expression und dem sog. „mikropapillärem“ Wachstumsmuster ($p < 0.001$). Weiterhin war die Fascin 1-Expression statistisch signifikant mit dem Vorhandensein von invasiven peritonealen Implantaten assoziiert ($p = 0.022$). Im Einzelnen war ersichtlich, dass sich eine Fascin-1-Expression vor allem beim serösen Tumortyp fand (Fascin-1-positiv: 75 %, n=63), während beim muzinösen Typ die Expression deutlich tiefer war (Fascin-1-positiv: 11,1 %, n=5). Ebenfalls fand sich eine Fascin-1-Expression signifikant häufiger in den Tumoren mit mikropapillärem Muster, sowie bei Patientinnen, bei denen sich invasive Implantate im Peritoneum nachweisen ließen, sich der Tumor also bis zum Bauchfell ausgebreitet hatte. Zwischen dem FIGO-Stadium und der Fascin-1-Expression fanden sich hingegen keine signifikanten Zusammenhänge, ein fortschreitender Krankheitsverlauf war in vorliegendem Kollektiv nicht mit einer Erhöhung des Fascin-1-Status assoziiert. Bei FIGO-Stufe IA betrug der Anteil der Patientinnen mit nachweisbarer Fascin-1-Expression 54,8 % (n=23), bei Stufe II 85,7 % (n=6), bei Stufe III 57,1 % (n=4) und bei Stufe IV 100 % (n=1), der Anteil der Fascin-1-exprimierenden-Tumoren stieg bei fortschreitender Erkrankung also zunächst an, um dann wieder abzusinken. Da nur eine Patientin Stufe IV zugeordnet werden konnte, war deren Zuteilung Fascin-1-positiven Gruppe statistisch nutzlos.

Festzuhalten bleibt, dass bei BOT-Patientinnen mit serösem Tumortyp, mikropapillärem Muster und invasiven peritonealen Implantaten signifikant häufiger Fascin-1-Expression zu erwarten ist, die Rückschlüsse auf den Tumorstatus aber nur begrenzt möglich sind.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassung der Ergebnisse

4 Diskussion

Die Bestimmung von prognostischen und prädiktiven Markern im Tumorgewebe stellt heutzutage in der Ära der sog. personalisierten Medizin einen wichtigen Bestandteil der Tumorpathologie dar. Entsprechende Untersuchungen bieten Ansatzpunkte für eine Prognoseeinschätzung und das Festlegen der bestmöglichen Therapie. Außerdem sind sie auch aus gesundheitsökonomischer Sicht von Relevanz, da sie Sorge dafür tragen können, dass nur diejenigen Patientinnen entsprechend therapeutisch versorgt werden, bei denen sich ein gesundheitlicher Benefit ergibt, wodurch sich kostenintensive Fehl- und Überbehandlungsaspekte vermeiden lassen.

In den hier dargestellten Studien haben wir uns mit der Untersuchung der prognostischen und prädiktiven Marker in Mammakarzinomen und anderen Tumoren des weiblichen Genitals befasst. So ließ sich z.B. in unserem Patientenkollektiv der Mammakarzinome eine hohe PIKCA-Mutationsrate von etwa 35 % feststellen. Als potenzielle prognostische und prädiktive Marker in Ovarialkarzinomen wurde die Cyclin-A1-Expression untersucht und mit klinisch-pathologischen Daten korreliert. Wir fanden eine wenigstens mäßiggradige Expression in den meisten untersuchten Fällen und konnten zusätzlich Cyclin A1 als prädiktiven Marker für eine längere TTP nach der First-Line-Chemotherapie identifizieren. Die Auswirkungen einer ERCC1-Expression haben wir immunhistochemisch in fortgeschrittenen Ovarial- und Endozervixkarzinomen untersucht. Hierbei ergaben sich wechselseitige Ergebnisse. In der Borderline-Gruppe der Ovarialtumoren wurde schließlich die Fascin1-Expression in Hinsicht auf eine potentielle prognostische Rolle untersucht.

Aus allen Untersuchungen ergeben sich Schlussfolgerungen für die Abschätzung der Prognose und die Validierung von molekularen Tumorthérapien in der Versorgung von Patientinnen mit Mammakarzinom oder fortgeschrittenen Tumoren des weiblichen Genitals. Die im Rahmen der

vorliegenden Habilitationsschrift durchgeführten Untersuchungen und statistischen Analysen ermöglichen in prognostischer Hinsicht jedoch nur die Aufstellung von Hypothesen zugunsten der Fokussierung bestimmter biochemischer Marker. Limitierend wirkte in einigen Studien die geringe Patientenzahl, weswegen nach Klassifizierung der Patientinnen entsprechend ihrem Tumorgrad nicht mehr durchgängig statistisch valide Aussagen getätigt werden konnten. Das Ziel der in dieser Arbeit zugrunde gelegten Studien ist es daher auch, weitere Studien mit größeren Kollektiven unter Berücksichtigung weiterer Faktoren anzustoßen, um zwecks Optimierung der Therapie die hier gefundenen Zusammenhänge zu bestätigen.

4.1 Bestimmung von prognostischen Markern zur Abschätzung der Prognose und zur Validierung einer molekularen Tumortherapie bei Brustkrebspatientinnen

4.1.1 PIK3CA als Prognosefaktor

Gemäß den vorliegenden Ergebnissen und denjenigen anderer Arbeitsgruppen weisen etwa 35 % aller Mammakarzinome eine Mutation im PIK3CA-Gen auf. Auch der Cancer Genom Atlas [141, 142] (TCGA) berichtet von einer PIK3CA-Mutationsrate von etwa 36 % in Mammakarzinomen. Den prognostischen Wert betreffend sind die Resultate sehr umstritten. Einige Studien beschreiben ein längeres Überleben, während andere von einer reduzierten Überlebensrate und gesamtem Überleben berichten [199-201]. In unserer Studie konnten wir keine statistisch signifikante Assoziation zwischen Gesamtüberleben und PIK3CA-Mutationen feststellen, was darauf hindeutet, dass der PIK3CA-Mutationsstatus alleine keinen prognostischen Wert hat. Allerdings berichten mehrere Studien von einer reduzierten Wirksamkeit der Anti-Her-2- und Polychemotherapie bei Patientinnen mit PIK3CA-Mutationen [202, 203]. Folglich könnte mit einer kombinierten Anwendung von Anti-Her-2-

und PIK3CA-Antagonisten die Therapie dieser Patientinnen verbessert werden. Zahlreiche PIK-3-Antagonisten sind zurzeit in den präklinischen und klinischen Studien und Her-2-positive/PIK3-mutante Tumoren sind die Hauptziele. Des Weiteren wurden in der Gruppe der TNBC-Mammakarzinome mittels Genexpressionsanalysen auch die Subtypen identifiziert, die von einer Inhibition des PIK3CA-Weges profitieren könnten. Diese Tumorgruppe hat eine sehr schlechte Prognose und keine spezifische Therapie. Diese Erkenntnis ist sehr bedeutend, weil sie wenigstens für einige Subtypen in der Gruppe eine spezifische Therapie anbieten würde und dadurch auch die Prognose der Patientinnen verbessert werden könnte.

4.1.2 Therapeutische Möglichkeiten

Aus den dargestellten Ergebnissen ergibt sich die Frage, ob Patientinnen mit Her-2-positivem Mammakarzinom und PIK3CA-Mutationen von einer zusätzlichen Blockade des PIK3CA-Signalweges profitieren würden. Auch die Gruppe der TNBC, für welche es zurzeit keine effektive Therapie gibt, wäre ein potenzielles Ziel für diese zielgerichtete Therapie des Mammakarzinoms.

Für die Durchführung klinischer Studien mit PIK3CA-Antagonisten wäre es daher sinnvoll, den PIK3CA-Mutationsstatus im Tumorgewebe zu bestimmen und mit dem Ansprechen auf die Therapie zu korrelieren. Hier ist eine standardisierte Methode zur Bestimmung des PIK3CA-Mutationsstatus unerlässlich. Die Resultate unserer Studie zeigten, dass die Sensitivität der Next-Generation-Sequenzierung hoch und daher als Standardmethode zu empfehlen ist. NGS ist vor allem in folgenden Konstellationen sinnvoll:

1. bei Fällen mit wenig Tumorgewebe;
2. für die Detektion von subklonalen Mutationen;
3. für eine simultane Mutationsdetektion in mehreren Exonen.

4.2 Bestimmung von prognostischen Markern zur Abschätzung der Prognose und zur Validierung einer molekularen Tumorthherapie in Tumoren des weiblichen Genitals

4.2.1 Cyclin A1 als Prognosefaktor bei Ovarialkarzinomen

Eine Cyclin A 1-Expression auf Proteinebene fand sich in der Mehrheit der untersuchten Ovarialkarzinom-Fälle in unserem Patientenkollektiv. Die physiologische Rolle von Cyclin A1 in gesundem und malignem Gewebe wurde nachhinein nur partiell verstanden. So war bisher unklar, ob eine Cyclin A1-Expression tumorspezifisch auftritt, oder eher von dem Differenzierungsgrad der Tumoren und der Gewebeherkunft abhängig ist. Bekannt ist, dass die Cyclin-A1-Expression den G1/S-Übergang beschleunigt und mit verstärkter Proliferation und Invasivität von Mamma-, Urothel-, Prostata- und Schilddrüsenkarzinomen einhergeht [204-208]. Einige Studien konnten zeigen, dass Cyclin A1 den proapoptotischen Effekt des Tumorgens p53 verstärkt [209]. Auch wenn die Daten bezüglich der Ovarialkarzinome sehr limitiert sind, könnte dieser Mechanismus damit eine wichtige Rolle in der Pathogenese derselben spielen. Offenbar findet sich Cyclin A1 in malignen Ovarialkarzinomen in hoch exprimierter Form, für die wiederum p53-Mutationen und chromosomale Instabilitäten charakteristisch sind [206, 210]. Als erste Forschergruppe überhaupt haben wir die Cyclin-A1-Expression als mögliches therapeutisches bzw. immuntherapeutisches Ziel in primären Ovarialkarzinomen untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass eine Expression auch für Ovarialkarzinome kennzeichnend ist, was den bisherigen Forschungsstand insofern erweitert, da entsprechendes bisher nur in Mamma-, Urothel-, Prostata- und Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen war.

Ferner konnte in vitro gezeigt werden, dass Cyclin A1 immunogen ist, was zT. erklären könnte, warum Ovarialkarzinome bei einer T-Zell-Infiltration eine bessere Prognose zeigen [43, 211]. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass der klinische Verlauf der

Diskussion

Ovarialkarzinome offenbar durch initiale Tumorreduktion mittels Chirurgie und systemischer Therapie charakterisiert ist, begleitet von einem Intervall ohne zytostatische Therapie und mit minimalem Tumorrest. Damit präsentiert sich beim Ovarialkarzinom ein klinisches Setting, welches prädestiniert für die Anwendung einer Immunotherapie erscheint. Außerdem scheint die initiale Exposition auf Paclitaxel die Präsentation der TAA-Epitope zu erhöhen.

Das nordamerikanische National Cancer Institut initiierte eine Studie, die zum Ziel hatte, die idealen Tumorantigene zu charakterisieren. Eine der wichtigsten Eigenschaften eines Tumorgens ist dessen fehlende Expression im gesunden Gewebe mit Ausnahme der Hoden, die für die immunprivilegiertesten Organe gehalten werden. Diese selektive Expression konnte bereits für Cyclin A1 in einer früheren Studie nachgewiesen werden [163]. Weitere Charakteristika, welche für Cyclin A1 erfüllt sind, sind die intrazelluläre Lokalisation, eine hohe Anzahl an Epitopen sowie die Expression in hoher Zahl in den meisten Tumorzellen der Patienten. Die Resultate unserer Studie konnten die Expression in den meisten untersuchten Tumorzellen bestätigen. Folglich könnte Cyclin A1 in Bezug auf dieses Kriterium als mögliches immuntherapeutisches Ziel im klinischen Setting diskutiert werden. Allerdings sollten weitere Studien folgen, um die restlichen Kriterien zu prüfen, bevor eine therapeutische Anwendung möglich wäre. Die hier erhobenen Daten lassen aber die Hypothese zu, dass bei hoher Cyclin A1-Expression bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom eine T-Zell-Immunotherapie dringend in Betracht gezogen werden sollte.

Zusätzlich konnten wir in unserer Studie Cyclin A1 als prädiktiven Marker für eine längere progressionsfreie Überlebenszeit *nach* der First-Line-Chemotherapie identifizieren. Dieser Effekt war unabhängig von Tumorgrad, FIGO-Stadium, Alter der Patientinnen, peritonealer Karzinomatose und war stärker ausgeprägt bei Patientinnen mit suboptimaler Debulking. Der längere TTP könnte demzufolge die Ansprechbarkeit auf die Chemotherapie reflektieren.

4.2.2 ERCC1 als Prognosefaktor in Ovarial und Endozervixkarzinomen

ERCC1 ist das Enzym, das eine essentielle Rolle in der sog. "nucleotide excision repair pathway" spielt. Es konnte bereits in zahlreichen Studien bei Plattenepithelkarzinomen gezeigt werden, dass eine ERCC1-Überexpression mit reduzierter Chemosensitivität und ungünstiger Prognose assoziiert ist [183, 212, 213].

Auch wenn zahlreiche Studien einen Einfluss von ERCC1-Expression auf die Prognose zeigen, ist bisher ungeklärt, ob ein Zusammenhang zwischen dem Grad der ERCC1-Expression und der Wahrscheinlichkeit einer positiven therapeutischen Antwort bei zusätzlich verabreichter platinhaltiger Chemotherapie besteht. Bei Lungen-, Kolon-, Pankreas-, Magen- und Harnblasenkarzinomen wirkt sich eine erhöhte ERCC1-Expression zumeist negativ auf die Überlebenszeit und positiv auf die Wahrscheinlichkeit einer Platin-Resistenz aus [131-135], hohe ERCC1-Scores sind also mit kürzeren Überlebenszeiten assoziiert. Wir konnten nachweisen, dass die bisherigen Ergebnisse nicht auf alle Tumorarten generalisiert werden können, da sich beim Ovarial- und beim Endozervixkarzinom abweichende statistische Zusammenhänge ergaben:

So ließ sich beim Ovarialkarzinom (anders als z.B. bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom) kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem H-Score der ERCC1-Expression und der Reaktion auf die platin-basierte Chemotherapie bzw. der progressionsfreien Überlebenszeit nachweisen. Dies bedeutet möglicherweise, dass sich auch Ovarialkarzinom-Patientinnen mit hohem H-Score für die Anwendung einer platin-basierten Chemotherapie eignen, da hier nicht unbedingt ein erhöhtes Risiko für eine Platin-Resistenz zu erwarten ist.

Gegensätzliche Ergebnisse fanden sich beim Endozervixkarzinom: Hier war ein steigender H-Score mit einer besseren Prognose korreliert, die ERCC1-Expression wirkte sich also positiv auf das Gesamtüberleben und die progressionsfreie Überlebenszeit aus. Zusammenhänge zwischen der ERCC1-Expression und einer sich entwickelnden Platin-Resistenz bestanden

Diskussion

nicht. Daraus kann abgeleitet werden, dass bei Zervixkarzinom-Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium und hoher ERCC1-Expression *per se* ein günstigeres Profil zu bestehen scheint und die Prognose durch Anwendung einer Platin-basierten Chemotherapie noch weiter verbessert werden kann.

Als zentrale Erkenntnis kann festgehalten werden, dass der ERCC1-Expression eine positive prognostische Wirkung insbesondere beim Endozervixkarzinom zukommt. Von Relevanz ist, dass sich damit der Wirkmechanismus dieses Moleküls in Tumoren des weiblichen Genitals offenbar von jener in anderen Tumoren unterscheidet. Inwiefern hormonelle Einflüsse dabei von Bedeutung sind, ist unklar und sollte in weitergehenden Studien analysiert werden. Weiterhin verweisen die Ergebnisse unserer Studien auf die Notwendigkeit, Wirkungsweise und Histopathologie auch anderer Biomarker, bei denen in anderen Tumorarten therapierelevante Erkenntnisse generiert wurden, explizit bei Tumoren des weiblichen Genitals zu analysieren, um die zielgruppenspezifische Therapie zu verbessern, bzw. einzelne Subgruppen zu analysieren, die verschiedener Formen einer gezielten Therapie bedürfen.

4.2.3 Fascin 1 als Prognosefaktor in Borderlinetumoren des Ovars

Fascin 1 ist ein Protein, das entsprechend der Ergebnisse mehrerer Studien in diversen Karzinomen mit Invasion und Metastasierung assoziiert ist. Die Resultate unserer Studie konnten zeigen, dass Fascin 1 auch in den Borderlinetumoren des Ovars mit mikropapillärem Wachstumsmuster exprimiert ist und eine starke Assoziation mit dem Vorhandensein von invasiven Implantaten zeigt. Diese beide histopathologischen Charakteristika sind mit einem erhöhtem Rezidivrisiko assoziiert, weswegen eine immunohistochemische Bestimmung einer Fascin 1-Expression ein Mittel sein könnte, die Fälle mit einem höherem Rezidivrisiko bereits im Moment der Diagnosestellung zu identifizieren. Daraus resultierend könnten bei den betroffenen Patientinnen frühzeitig entsprechende therapeutische Maßnahmen ergriffen

Diskussion

werden, mit dem Ziel, die progressionsfreie Überlebenszeit und die Gesamtüberlebenszeit zu erhöhen. Von Relevanz ist, dass Fascin 1 als dafür nutzbar zu machender Prognosefaktor jedoch nur in serösen BOT verwendbar ist, da beim muzinösen Typ kaum entsprechende Beobachtungen ersichtlich waren.

Zusammenfassung

Molekulare Pathologie bzw. molekulare Prognosefaktoren sind heutzutage bei der Prognoseabschätzung sowie Therapieplanung maligner Tumoren ein wichtiger Bestandteil geworden. In den vorliegenden Studien haben wir PIK3CA-Genmutationen als potenziellen Prognosefaktor in Mammakarzinomen untersucht. Wir konnten zeigen, dass PIK3CA in etwa 35 % der Mammakarzinome mutiert ist. Weiterhin konnte eine Mutation in PIK3CA-Gen statistisch signifikant öfter in HR+, Her-2-negativen Mammakarzinomen festgestellt werden. Dieses Ergebnis bildet die Grundlage für eine gezielte Therapie in PIK3CA-mutierten Mammakarzinomen.

In den übrigen Studien wurden potentielle Prognose- und prädiktive Faktoren in den Tumoren des weiblichen Genitals analysiert (Ovarialkarzinome, Endozervixkarzinome, Borderlinetumore des Ovars). Für Cyclin A1 konnte nachgewiesen werden, dass sich selbiges in den meisten serösen Karzinomen des Ovars in exprimierter Form nachweisen lässt und hier mit einem längeren TTP assoziiert ist. Diese Erkenntnis deutet darauf hin, dass Cyclin A1 neben einer potenziellen therapeutischen Funktion auch eine prognostische Rolle in Ovarialkarzinomen haben könnte. Bezüglich der ERCC1-Expression zeigten sich sowohl beim Ovarial- als auch beim Endozervixkarzinom andere Ergebnisse, als bei anderen Tumoren (z.B. Lungen- oder Pankreaskarzinom), bei denen eine hohe ERCC1-Expression mit einem schlechteren Ansprechen auf eine Platin-basierte Chemotherapie und einer geringeren Überlebenszeit assoziiert war. Beim Ovarialkarzinom ließen sich nur sehr geringe negative Zusammenhänge nachweisen, weswegen hier bei hoher ERCC1-Expression nicht unbedingt von einem höheren Platin-Resistenz-Risiko ausgegangen werden kann. Beim Endozervixkarzinom war eine hohe ERCC1-Expression mit einer positiven Prognose assoziiert. Ferner kommt offenbar auch der Fascin 1-Expression eine prognostische Wirkung

Zusammenfassung

in serösen Borderline-Tumoren des Ovars zu. Dies ermöglicht das Rezidivrisiko bereits bei Diagnosestellung einzuschätzen.

Zusammengefasst bieten die dargestellten Ergebnisse die Grundlage für eine weitere Erforschung der untersuchten Gene und Proteine als potenzielle prognostische und prädiktive Biomarker sowie therapeutische Ziele in den Mamma-, sowie Tumoren des genitalen Traktes mit dem Endziel einer personalisierten Therapie.

Schlagerworte: Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Endozervixkarzinom, Borderlinetumoren des Ovars, Molekulare Prognosefaktoren

Danksagung

Danksagung

An erster Stelle möchte ich den Herren Prof. Dr. Jan-Olaf Gebbers und PD Dr. Michael Kurrer danken, die mich für die Pathologie als Fach und für die wissenschaftliche Perspektive desselben begeistert haben.

Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. h. c. Manfred Dietel, der diese Habilitation stets unterstützend begleitet hat.

Meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die Zusammenarbeit und die zahlreichen konstruktive Anregungen, insbesondere Prof. Dr. Sers und Prof. Dr. Denkert.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Pathologie der Charité danke ich für die Zeit, die ich in die wissenschaftlichen Projekte investieren durfte.

Und natürlich geht ein besonderer Dank an meine Familie.

Erklärung

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

Literaturverzeichnis

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 5-29.
2. DeSantis, C., et al., *Breast cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(1): p. 52-62.
3. (Hrsg.), D.K.e.V.D.u.D.G.f.G.u.G.D., *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. Zuckschwerdt Verlag GmbH., 2012.
4. Lakhani, S.R., Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver, M.J., *WHO Classification of Tumours, Volume 4*. **4**.
5. Carey, L.A., *Through a Glass Darkly: Advances in Understanding Breast Cancer Biology, 2000-2010*. Clinical Breast Cancer, 2010. **10**(3): p. 188-195.
6. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
7. Hudis, C.A. and L. Gianni, *Triple-negative breast cancer: an unmet medical need*. Oncologist, 2011. **16 Suppl 1**: p. 1-11.
8. Bedard, P.L., F. Cardoso, and M.J. Piccart-Gebhart, *Stemming resistance to HER-2 targeted therapy*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009. **14**(1): p. 55-66.
9. Berns, K., et al., *A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer*. Cancer Cell, 2007. **12**(4): p. 395-402.
10. Nagata, Y., et al., *PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients*. Cancer Cell, 2004. **6**(2): p. 117-27.
11. Saal, L.H., et al., *PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma*. Cancer Res, 2005. **65**(7): p. 2554-9.
12. Zhou, J.B., et al., *Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance (vol 104, pg 16158, 2007)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(49): p. 19655-19655.
13. Korkaya, H., et al., *HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion*. Oncogene, 2008. **27**(47): p. 6120-30.
14. Li, X., et al., *Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(9): p. 672-9.
15. Yu, F., et al., *let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1109-23.
16. Phillips, T.M., W.H. McBride, and F. Pajonk, *The response of CD24(-/low)/CD44(+) breast cancer-initiating cells to radiation*. Journal of the National Cancer Institute, 2006. **98**(24): p. 1777-1785.
17. Lehmann, B.D., et al., *Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies*. J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2750-67.
18. Hu, L., et al., *Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models*. Cancer Res, 2002. **62**(4): p. 1087-92.
19. Ng, S.S.W., et al., *Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells*. Cancer Res, 2000. **60**(19): p. 5451-5.
20. Wallin, J.J., et al., *Nuclear phospho-Akt increase predicts synergy of PI3K inhibition and doxorubicin in breast and ovarian cancer*. Sci Transl Med, 2010. **2**(48): p. 48ra66.
21. Westhoff, M.A., et al., *The pyridinylfuranopyrimidine inhibitor, PI-103, chemosensitizes glioblastoma cells for apoptosis by inhibiting DNA repair*. Oncogene, 2009. **28**(40): p. 3586-96.
22. Massihnia, D., et al., *Triple negative breast cancer: shedding light onto the role of pi3k/akt/mTOR pathway*. Oncotarget, 2016.
23. 2012, G., *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. 2012.

24. Prat, J., *Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features*. *Virchows Arch*, 2012. **460**(3): p. 237-49.
25. Mutch, D.G., *Surgical management of ovarian cancer*. *Seminars in Oncology*, 2002. **29**(1): p. 3-8.
26. Shimizu, Y., et al., *Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up*. *Cancer*, 1998. **82**(5): p. 893-901.
27. Swenerton, K.D., et al., *Ovarian carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors*. *Obstet Gynecol*, 1985. **65**(2): p. 264-70.
28. Wimberger, P., et al., *Prognostic factors for complete debulking in advanced ovarian cancer and its impact on survival. An exploratory analysis of a prospectively randomized phase III study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group (AGO-OVAR)*. *Gynecol Oncol*, 2007. **106**(1): p. 69-74.
29. Cancer Genome Atlas Research, N., *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*. *Nature*, 2011. **474**(7353): p. 609-15.
30. Singer, G., et al., *Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(6): p. 484-6.
31. Wiegand, K.C., et al., *ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(16): p. 1532-43.
32. Cuatrecasas, M., et al., *K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases*. *Cancer*, 1997. **79**(8): p. 1581-6.
33. McAlpine, J., et al., *HER2 Overexpression and amplification is present in a subset of ovarian mucinous carcinomas and can be targeted with trastuzumab therapy*. *Gynecologic Oncology*, 2010. **116**(3): p. 593-594.
34. Yan, B., et al., *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): p. 1097-101.
35. Gomez-Raposo, C., et al., *Molecular characterization of ovarian cancer by gene-expression profiling*. *Gynecol Oncol*, 2010. **118**(1): p. 88-92.
36. Faggad, A., et al., *Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in invasive ovarian carcinoma: implication for prognosis*. *Histopathology*, 2009. **54**(6): p. 657-66.
37. Luvero, D., A. Milani, and J.A. Ledermann, *Treatment options in recurrent ovarian cancer: latest evidence and clinical potential*. *Ther Adv Med Oncol*, 2014. **6**(5): p. 229-39.
38. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. *Nat Med*, 2004. **10**(9): p. 942-9.
39. Dadmarz, R.D., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes from human ovarian cancer patients recognize autologous tumor in an MHC class II-restricted fashion*. *Cancer J Sci Am*, 1996. **2**(5): p. 263-72.
40. Hayashi, K., et al., *Clonal expansion of T cells that are specific for autologous ovarian tumor among tumor-infiltrating T cells in humans1*. *Gynecologic Oncology*, 1999. **74**(1): p. 86-92.
41. Sato, E., et al., *Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(51): p. 18538-43.
42. Wu, X., et al., *The immunologic aspects in advanced ovarian cancer patients treated with paclitaxel and carboplatin chemotherapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. **59**(2): p. 279-91.
43. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(3): p. 203-13.
44. Ewald-Riegler, N., et al., *Borderline Tumors of the Ovary: Clinical Course and Prognostic Factors*. *Onkologie*, 2012. **35**(1-2): p. 28-33.
45. Prat, J., *Serous borderline tumors of the ovary*. *Adv Clin Path*, 1997. **1**(2): p. 97-102.

46. Ho, C.L., et al., *Mutations of BRAF and KRAS precede the development of ovarian serous borderline tumors*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 6915-8.
47. Longacre, T.A., et al., *Ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors): outcome-based study of 276 patients with long-term (> or =5-year) follow-up*. *Am J Surg Pathol*, 2005. **29**(6): p. 707-23.
48. Burks, R.T., M.E. Sherman, and R.J. Kurman, *Micropapillary serous carcinoma of the ovary. A distinctive low-grade carcinoma related to serous borderline tumors*. *Am J Surg Pathol*, 1996. **20**(11): p. 1319-30.
49. Eichhorn, J.H., et al., *Ovarian serous borderline tumors with micropapillary and cribriform patterns - A study of 40 cases and comparison with 44 cases without these patterns*. *American Journal of Surgical Pathology*, 1999. **23**(4): p. 397-409.
50. Prat, J. and M. De Nictolis, *Serous borderline tumors of the ovary: a long-term follow-up study of 137 cases, including 18 with a micropapillary pattern and 20 with microinvasion*. *Am J Surg Pathol*, 2002. **26**(9): p. 1111-28.
51. McKenney, J.K., B.L. Balzer, and T.A. Longacre, *Patterns of stromal invasion in ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors): a reevaluation of the concept of stromal microinvasion*. *Am J Surg Pathol*, 2006. **30**(10): p. 1209-21.
52. Silva, E.G., et al., *The recurrence and the overall survival rates of ovarian serous borderline neoplasms with noninvasive implants is time dependent*. *American Journal of Surgical Pathology*, 2006. **30**(11): p. 1367-1371.
53. Deavers, M.T., et al., *Micropapillary and cribriform patterns in ovarian serous tumors of low malignant potential: a study of 99 advanced stage cases*. *Am J Surg Pathol*, 2002. **26**(9): p. 1129-41.
54. Djordjevic, B. and A. Malpica, *Ovarian serous tumors of low malignant potential with nodal low-grade serous carcinoma*. *Am J Surg Pathol*, 2012. **36**(7): p. 955-63.
55. Longacre, T.A., R.L. Kempson, and M.R. Hendrickson, *Serous tumours of low malignant potential (serous borderline tumours): moving toward detente*. *Histopathology*, 2005. **47**(3): p. 315-8.
56. Ueda, M., E. Toji, and S. Noda, *Germ line and somatic mutations of BRAF V599E in ovarian carcinoma*. *Int J Gynecol Cancer*, 2007. **17**(4): p. 794-7.
57. Anglesio, M.S., et al., *Mutation of ERBB2 provides a novel alternative mechanism for the ubiquitous activation of RAS-MAPK in ovarian serous low malignant potential tumors*. *Mol Cancer Res*, 2008. **6**(11): p. 1678-90.
58. Esfahani, K., et al., *Aromatase inhibition in relapsing low malignant potential serous tumours of the ovary*. *BMJ Case Rep*, 2014. **2014**.
59. Gershenson, D.M., et al., *Hormonal therapy for recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum*. *Gynecol Oncol*, 2012. **125**(3): p. 661-6.
60. Vasconcelos, I., et al., *A meta-analysis on the impact of platinum-based adjuvant treatment on the outcome of borderline ovarian tumors with invasive implants*. *Oncologist*, 2015. **20**(2): p. 151-8.
61. Streich, M., *Das Zervixkarzinom: praxisrelevante Aspekte. Prävention, Diagnostik, Therapie*. *Der Gynäkologe*, 2005. **6**: p. 23–25.
62. (RKI), R.K.I., *Zentrum für Krebsregisterdaten. Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom)*. URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Gebaermutterhalskrebs/gebaermutterhalskrebs_node.html.
63. Beckmann, M., *Therapiefortschritte beim primären Zervixkarzinom*. *Dt Arztebl* 2005. . **102**(14): p. A979-A986. .
64. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. *Eur J Cancer*, 2013. **49**(6): p. 1374-403.
65. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2011. **103**(5): p. 368-83.

66. Franceschi, S., *The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer*. Recent Results Cancer Res, 2005. **166**: p. 277-97.
67. Bray, F., et al., *Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(9): p. 2191-9.
68. Vinh-Hung, V., et al., *Prognostic value of histopathology and trends in cervical cancer: a SEER population study*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 164.
69. Ibeanu, O.A., *Molecular pathogenesis of cervical cancer*. Cancer Biology & Therapy, 2011. **11**(3): p. 295-306.
70. Trunk, M.J., Wentzensen, N., M. von Knebel Doeberitz, , *Molekulare Pathogenese des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen*. Pathologe, 2005. **26**: p. 283-90.
71. Ayhan, A., et al., *A comparison of prognoses of FIGO stage IB adenocarcinoma and squamous cell carcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2004. **14**(2): p. 279-85.
72. Baalbergen, A., et al., *Prognostic factors in adenocarcinoma of the uterine cervix*. Gynecol Oncol, 2004. **92**(1): p. 262-7.
73. Ho, C.M., et al., *Multivariate analysis of the prognostic factors and outcomes in early cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy*. Gynecol Oncol, 2004. **93**(2): p. 458-64.
74. Singh, N. and S. Arif, *Histopathologic parameters of prognosis in cervical cancer--a review*. Int J Gynecol Cancer, 2004. **14**(5): p. 741-50.
75. Bean, S.M., D.F. Kurtycz, and T.J. Colgan, *Recent developments in defining microinvasive and early invasive carcinoma of the uterine cervix*. J Low Genit Tract Dis, 2011. **15**(2): p. 146-57.
76. Cairns, M., J. Tidy, and M.E. Cruickshank, *Management of microinvasive cervical cancer: a British Society for Colposcopy and Cervical Pathology audit*. J Low Genit Tract Dis, 2012. **16**(4): p. 403-8.
77. Alfsen, G.C., et al., *Histologic subtype has minor importance for overall survival in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix - A population-based study of prognostic factors in 505 patients with nonsquamous cell carcinomas of the cervix*. Cancer, 2001. **92**(9): p. 2471-2483.
78. Mabuchi, S., et al., *Impact of histological subtype on survival of patients with surgically-treated stage IA2-IIA cervical cancer: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma*. Gynecol Oncol, 2012. **127**(1): p. 114-20.
79. AWMF, *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom*. 2014.
80. GBA, *AQUA Qualitätsreport 2012*. 2013.
81. NCCN, *NCCN Guideline 2.2013 Cervical Cancer*. 2013.
82. Kim, H.S., et al., *Efficacy of neoadjuvant chemotherapy in patients with FIGO stage IB1 to IIA cervical cancer: an international collaborative meta-analysis*. Eur J Surg Oncol, 2013. **39**(2): p. 115-24.
83. Rydzewska, L., et al., *Neoadjuvant chemotherapy plus surgery versus surgery for cervical cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. **12**: p. CD007406.
84. Benohr, P., et al., *Her-2/neu expression in breast cancer--A comparison of different diagnostic methods*. Anticancer Res, 2005. **25**(3B): p. 1895-900.
85. Ciampa, A., et al., *HER-2 status in breast cancer - Correlation of gene amplification by FISH with immunohistochemistry expression using advanced cellular imaging system*. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2006. **14**(2): p. 132-137.
86. Mukohara, T., *PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications*. Breast Cancer (Dove Med Press), 2015. **7**: p. 111-23.
87. Denkert, C., et al., *[Molecular pathology for breast cancer: Importance of the gene expression profile]*. Pathologe, 2015. **36**(2): p. 145-53.
88. Filipits, M., et al., *A New Molecular Predictor of Distant Recurrence in ER-Positive, HER2-Negative Breast Cancer Adds Independent Information to Conventional Clinical Risk Factors*. Clinical Cancer Research, 2011. **17**(18): p. 6012-6020.
89. Paik, S., et al., *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(27): p. 2817-26.

90. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 530-6.
91. Noonberg, S.B. and C.C. Benz, *Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents*. Drugs, 2000. **59**(4): p. 753-67.
92. Wells, A., *EGF receptor*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(6): p. 637-43.
93. Siziopikou, K.P. and M. Cobteigh, *The basal subtype of breast carcinomas may represent the group of breast tumors that could benefit from EGFR-targeted therapies*. Breast, 2007. **16**(1): p. 104-107.
94. Liu, D., et al., *EGFR expression correlates with decreased disease-free survival in triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray*. Med Oncol, 2012. **29**(2): p. 401-5.
95. Viale, G., et al., *Invasive ductal carcinoma of the breast with the "triple-negative" phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **116**(2): p. 317-28.
96. Ali EM, S.M., Mohsen MA, *Elevated serum and tissue VEGF associated with poor outcome in breast cancer patients*. AJM, 2011. **47**: p. 217–224.
97. Chanana P, P.A., Yadav BS, KaurJ , Singla S, DimriK , Trehan R, Krishan P., *Significance of serum vascular endothelial growth factor and cancer antigen 15.3 in patients with triple negative breast cancer*. JRP, 2014. **13**: p. 60–67.
98. El-Arab, L.R., M. Swellam, and M.M. El Mahdy, *Metronomic chemotherapy in metastatic breast cancer: impact on VEGF*. J Egypt Natl Canc Inst, 2012. **24**(1): p. 15-22.
99. Linderholm, B.K., et al., *Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer*. Annals of Oncology, 2009. **20**(10): p. 1639-1646.
100. Taha, F.M., et al., *Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor in Egyptian females with metastatic triple negative breast cancer*. Clin Biochem, 2009. **42**(13-14): p. 1420-6.
101. Kern, S.E., et al., *Identification of P53 as a Sequence-Specific DNA-Binding Protein*. Science, 1991. **252**(5013): p. 1708-1711.
102. Alsner, J., et al., *Heterogeneity in the clinical phenotype of TP53 mutations in breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(10): p. 3923-31.
103. Dookeran, K.A., et al., *p53 as a Marker of Prognosis in African-American Women with Breast Cancer*. Annals of Surgical Oncology, 2010. **17**(5): p. 1398-1405.
104. Linjawi, A., et al., *Prognostic significance of p53, bcl-2, and Bax expression in early breast cancer*. J Am Coll Surg, 2004. **198**(1): p. 83-90.
105. Miller, L.D., et al., *An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(38): p. 13550-5.
106. Yamashita, H., et al., *Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer*. Breast Cancer Research, 2004. **6**(1): p. R24-R30.
107. Hasebe, T., et al., *p53 expression in tumor-stromal fibroblasts is closely associated with the nodal metastasis and outcome of patients with invasive ductal carcinoma who received neoadjuvant therapy*. Human Pathology, 2010. **41**(2): p. 262-270.
108. Kandioler-Eckersberger, D., et al., *TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(1): p. 50-6.
109. Fasching, P.A., et al., *Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 486.
110. Selz, J., et al., *Prognostic value of molecular subtypes, ki67 expression and impact of postmastectomy radiation therapy in breast cancer patients with negative lymph nodes after mastectomy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012. **84**(5): p. 1123-32.

111. Tanei, T., et al., *Prognostic significance of Ki67 index after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer*. Eur J Surg Oncol, 2011. **37**(2): p. 155-61.
112. Lord, C.J. and A. Ashworth, *BRCAness revisited*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(2): p. 110-20.
113. Bolton, K.L., et al., *Association Between BRCA1 and BRCA2 Mutations and Survival in Women With Invasive Epithelial Ovarian Cancer*. Jama-Journal of the American Medical Association, 2012. **307**(4): p. 382-390.
114. Dong, F., et al., *A BRCA1/2 mutational signature and survival in ovarian high grade serous carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2016.
115. Cass, I., et al., *Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(9): p. 2187-95.
116. Konstantinopoulos, P.A., et al., *Gene Expression Profile of BRCAness That Correlates With Responsiveness to Chemotherapy and With Outcome in Patients With Epithelial Ovarian Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(22): p. 3555-3561.
117. Vos, M.C., et al., *Limited independent prognostic value of MMP-14 and MMP-2 expression in ovarian cancer*. Diagn Pathol, 2016. **11**: p. 34.
118. Shuman Moss, L.A., S. Jensen-Taubman, and W.G. Stetler-Stevenson, *Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis*. Am J Pathol, 2012. **181**(6): p. 1895-9.
119. Konecny, G.E., et al., *Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade serous ovarian cancer*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(10).
120. Le Page, C., et al., *Predictive and prognostic protein biomarkers in epithelial ovarian cancer: recommendation for future studies*. Cancers (Basel), 2010. **2**(2): p. 913-54.
121. Suh-Burgmann, E., *Long-term outcomes following conservative surgery for borderline tumor of the ovary: a large population-based study*. Gynecol Oncol, 2006. **103**(3): p. 841-7.
122. Trillsch, F., et al., *Surgical staging and prognosis in serous borderline ovarian tumours (BOT): a subanalysis of the AGO ROBOT study*. Br J Cancer, 2015. **112**(4): p. 660-6.
123. Yokoyama, Y., et al., *Clinical outcome and risk factors for recurrence in borderline ovarian tumours*. Br J Cancer, 2006. **94**(11): p. 1586-91.
124. Litkouhi, B., et al., *Overexpression of CEACAM6 in borderline and invasive mucinous ovarian neoplasms*. Gynecol Oncol, 2008. **109**(2): p. 234-9.
125. Aune, G., et al., *The proliferation markers Ki-67/MIB-1, phosphohistone H3, and survivin may contribute in the identification of aggressive ovarian carcinomas*. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2011. **4**(5): p. 444-453.
126. No, J.H., et al., *Quantitative detection of serum survivin and its relationship with prognostic factors in ovarian cancer*. Gynecol Obstet Invest, 2011. **71**(2): p. 136-40.
127. Ferrandina, G., et al., *Survivin expression in ovarian cancer and its correlation with clinicopathological, surgical and apoptosis-related parameters*. Br J Cancer, 2005. **92**(2): p. 271-7.
128. Qian, X.Y., X.W. Xi, and L.X. Li, *Nuclear Survivin Is Associated With Malignant Potential in Epithelial Ovarian Carcinoma*. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2011. **19**(2): p. 126-132.
129. Sui, L., et al., *Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors*. Int J Oncol, 2002. **21**(2): p. 315-20.
130. Takai, N., et al., *Expression of survivin is associated with malignant potential in epithelial ovarian carcinoma*. International Journal of Molecular Medicine, 2002. **10**(2): p. 211-216.
131. Kristiansen, G., et al., *CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival*. American Journal of Pathology, 2002. **161**(4): p. 1215-1221.
132. Lau, Y.M., et al., *Prognostic implication of human papillomavirus types and species in cervical cancer patients undergoing primary treatment*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0122557.
133. Barreto, C.L., et al., *Detection of human Papillomavirus in biopsies of patients with cervical cancer, and its association with prognosis*. Arch Gynecol Obstet, 2013. **288**(3): p. 643-8.
134. Ye Zhang, et al., *Expression of growth-regulated oncogene -1, hepatocyte growth factor, platelet-derived growth factor -AA and soluble E-selectin and their association with high-risk*

- human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the uterine cervix*. Molecular Medicine Reports, 2014. **2**: p. 1013-1024.
135. Kotowicz, B., et al., *The assessment of the prognostic value of tumor markers and cytokines as SCCAg, CYFRA 21.1, IL-6, VEGF and sTNF receptors in patients with squamous cell cervical cancer, particularly with early stage of the disease*. Tumor Biology, 2016. **37**(1): p. 1271-1278.
136. Lerma, E., et al., *Prognostic significance of the Fas-receptor/Fas-ligand system in cervical squamous cell carcinoma*. Virchows Arch, 2008. **452**(1): p. 65-74.
137. Maduro, J.H., et al., *The prognostic value of TRAIL and its death receptors in cervical cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009. **75**(1): p. 203-11.
138. Prabhavathy, D., C.K. Subramanian, and D. Karunakaran, *Re-expression of HPV16 E2 in SiHa (human cervical cancer) cells potentiates NF-kappa B activation induced by TNF-alpha concurrently increasing senescence and survival*. Bioscience Reports, 2015. **35**.
139. Wu, S., et al., *Targeted blockade of interleukin-8 abrogates its promotion of cervical cancer growth and metastasis*. Mol Cell Biochem, 2013. **375**(1-2): p. 69-79.
140. Zijlmans, H.J., et al., *Role of IL-12p40 in cervical carcinoma*. Br J Cancer, 2012. **107**(12): p. 1956-62.
141. Forbes, S.A., et al., *COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D945-50.
142. Robbins, D.E., et al., *A self-updating road map of The Cancer Genome Atlas*. Bioinformatics, 2013. **29**(10): p. 1333-40.
143. Zhao, L. and P.K. Vogt, *Class I PI3K in oncogenic cellular transformation*. Oncogene, 2008. **27**(41): p. 5486-96.
144. Ikenoue, T., et al., *Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(11): p. 4562-7.
145. Kang, S., A.G. Bader, and P.K. Vogt, *Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 802-7.
146. Vanhaesebroeck, B., et al., *P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4330-5.
147. Firoozinia, M., et al., *PIK3CA gene amplification and PI3K p110alpha protein expression in breast carcinoma*. Int J Med Sci, 2014. **11**(6): p. 620-5.
148. Wu, G., et al., *Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer*. Breast Cancer Res, 2005. **7**(5): p. R609-16.
149. Cantley, L.C. and B.G. Neel, *New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase AKT pathway*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(8): p. 4240-4245.
150. Celebi, J.T., et al., *Identification of PTEN mutations in metastatic melanoma specimens*. J Med Genet, 2000. **37**(9): p. 653-7.
151. Maehama, T. and J.E. Dixon, *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13375-8.
152. Maehama, T., G.S. Taylor, and J.E. Dixon, *PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 247-79.
153. Mills, G.B., et al., *The role of genetic abnormalities of PTEN and the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in breast and ovarian tumorigenesis, prognosis, and therapy*. Semin Oncol, 2001. **28**(5 Suppl 16): p. 125-41.
154. Wang, S.I., et al., *Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme*. Cancer Res, 1997. **57**(19): p. 4183-6.
155. Wishart, M.J., et al., *PTEN and myotubularin phosphoinositide phosphatases: bringing bioinformatics to the lab bench*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 172-81.
156. Yokoyama, Y., et al., *Expression of PTEN and PTEN pseudogene in endometrial carcinoma*. Int J Mol Med, 2000. **6**(1): p. 47-50.

157. Amann, J., et al., *Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer*. *Cancer Res*, 2005. **65**(1): p. 226-35.
158. Cappuzzo, F., et al., *Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(15): p. 1133-41.
159. Jordan, N.J., et al., *Increased constitutive activity of PKB/Akt in tamoxifen resistant breast cancer MCF-7 cells*. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. **87**(2): p. 167-80.
160. Pao, W., et al., *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(36): p. 13306-13311.
161. Sordella, R., et al., *Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways*. *Science*, 2004. **305**(5687): p. 1163-1167.
162. Dunlap, J., et al., *Phosphatidylinositol-3-kinase and AKT1 mutations occur early in breast carcinoma*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2010. **120**(2): p. 409-418.
163. Ochsenreither, S., et al., *Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen*. *Blood*, 2012. **119**(23): p. 5492-501.
164. Muller-Tidow, C., et al., *Cyclin A1 is highly expressed in aggressive testicular germ cell tumors*. *Cancer Letters*, 2003. **190**(1): p. 89-95.
165. Kim, J.E., et al., *Paclitaxel-exposed ovarian cancer cells induce cancerspecific CD4+ T cells after doxorubicin exposure through regulation of MyD88 expression*. *Int J Oncol*, 2014. **44**(5): p. 1716-26.
166. Law, K.S., H.C. Chen, and S.K. Liao, *Non-cytotoxic and sublethal paclitaxel treatment potentiates the sensitivity of cultured ovarian tumor SKOV-3 cells to lysis by lymphokine-activated killer cells*. *Anticancer Res*, 2007. **27**(2): p. 841-50.
167. Berlin, C., et al., *Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy*. *Leukemia*, 2015. **29**(3): p. 647-59.
168. Goswami, M., et al., *Expression of putative targets of immunotherapy in acute myeloid leukemia and healthy tissues*. *Leukemia*, 2014. **28**(5): p. 1167-70.
169. Gyorfy, B., A. Lanczky, and Z. Szallasi, *Implementing an online tool for genome-wide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients*. *Endocrine-Related Cancer*, 2012. **19**(2): p. 197-208.
170. AWMF, *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der malignen Ovarialtumoren*. . 2013.
171. Pujade-Lauraine, E., et al., *Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(13): p. 1302-8.
172. Krivak, T.C., et al., *Relationship between ERCC1 polymorphisms, disease progression, and survival in the gynecologic oncology group phase III trial of intraperitoneal versus intravenous cisplatin and paclitaxel for stage III epithelial ovarian cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2008. **26**(21): p. 3598-3606.
173. Steffensen, K.D., M. Waldstrom, and A. Jakobsen, *The relationship of platinum resistance and ERCC1 protein expression in epithelial ovarian cancer*. *Int J Gynecol Cancer*, 2009. **19**(5): p. 820-5.
174. Yu, J.J., et al., *Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene*. *International Journal of Oncology*, 2000. **16**(3): p. 555-560.
175. Reed, E., *Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy*. *Cancer Treat Rev*, 1998. **24**(5): p. 331-44.
176. Rubatt, J.M., et al., *Pre-treatment tumor expression of ERCC1 in women with advanced stage epithelial ovarian cancer is not predictive of clinical outcomes: a Gynecologic Oncology Group study*. *Gynecol Oncol*, 2012. **125**(2): p. 421-6.
177. Akita, H., et al., *Significance of RRM1 and ERCC1 expression in resectable pancreatic adenocarcinoma*. *Oncogene*, 2009. **28**(32): p. 2903-2909.

178. Choueiri, M.B., et al., *ERCC1 and TS Expression as Prognostic and Predictive Biomarkers in Metastatic Colon Cancer*. Plos One, 2015. **10**(6).
179. Huang, Z.H., et al., *ERCC1 polymorphism, expression and clinical outcome of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(41): p. 6401-7.
180. Li, S., et al., *ERCC1 expression levels predict the outcome of platinum-based chemotherapies in advanced bladder cancer: a meta-analysis*. Anticancer Drugs, 2014. **25**(1): p. 106-14.
181. Lord, R.V., et al., *Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(7): p. 2286-91.
182. Pecorelli, S., *Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium*. Int J Gynaecol Obstet, 2009. **105**(2): p. 103-4.
183. Jun, H.J., et al., *ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation*. British Journal of Cancer, 2008. **99**(1): p. 167-172.
184. Handra-Luca, A., et al., *Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by Cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(13): p. 3855-9.
185. Joshi, M.B., et al., *High gene expression of TS1, GSTP1, and ERCC1 are risk factors for survival in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(6): p. 2215-21.
186. Li, Q.D., et al., *Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells*. Anticancer Research, 2000. **20**(2a): p. 645-652.
187. Park, J.S.e.a., *ERCC1 (excision repair crosscomplementation group 1) expression as a predictor for response of neoadjuvant chemotherapy for FIGO stage 2B uterine cervix cancer*. Gynecol Oncol, 2011. **120**: p. 275-279.
188. Shih Ie, M. and R.J. Kurman, *Molecular pathogenesis of ovarian borderline tumors: new insights and old challenges*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(20): p. 7273-9.
189. Morice, P., et al., *Borderline ovarian tumour: pathological diagnostic dilemma and risk factors for invasive or lethal recurrence*. Lancet Oncology, 2012. **13**(3): p. E103-E115.
190. Trillsch, F., et al., *Age-dependent differences in borderline ovarian tumours (BOT) regarding clinical characteristics and outcome: results from a sub-analysis of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) ROBOT study*. Ann Oncol, 2014. **25**(7): p. 1320-7.
191. du Bois, A., et al., *Borderline tumours of the ovary: A cohort study of the Arbeitsgemeinschaft Gynakologische Onkologie (AGO) Study Group*. Eur J Cancer, 2013. **49**(8): p. 1905-14.
192. Harter, P., et al., *Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) consensus review for ovarian tumors of low malignant potential (borderline ovarian tumors)*. Int J Gynecol Cancer, 2014. **24**(9 Suppl 3): p. S5-8.
193. Daponte, A., et al., *Prognostic significance of fascin expression in advanced poorly differentiated serous ovarian cancer*. Anticancer Res, 2008. **28**(3B): p. 1905-10.
194. Hanker, L.C., et al., *Prognostic impact of fascin-1 (FSCN1) in epithelial ovarian cancer*. Anticancer Res, 2013. **33**(2): p. 371-7.
195. Hu, W., et al., *Increased expression of fascin, motility associated protein, in cell cultures derived from ovarian cancer and in borderline and carcinomatous ovarian tumors*. Clinical & Experimental Metastasis, 2000. **18**(1): p. 83-88.
196. Jayo, A. and M. Parsons, *Fascin: a key regulator of cytoskeletal dynamics*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(10): p. 1614-7.
197. Li, A., et al., *The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion*. Curr Biol, 2010. **20**(4): p. 339-45.

198. Yoder, B.J., et al., *The expression of fascin, an actin-bundling motility protein, correlates with hormone receptor-negative breast cancer and a more aggressive clinical course.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(1): p. 186-92.
199. Baselga, J., et al., *Biomarker analyses in CLEOPATRA: a phase III, placebo-controlled study of pertuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive, first-line metastatic breast cancer.* J Clin Oncol, 2014. **32**(33): p. 3753-61.
200. Cizkova, M., et al., *PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER alpha, PR and ERBB2-based subgroups.* Breast Cancer Research, 2012. **14**(1).
201. Jensen, J.D., et al., *PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab.* Ann Oncol, 2012. **23**(8): p. 2034-42.
202. Chandarlapaty, S., et al., *Frequent mutational activation of the PI3K-AKT pathway in trastuzumab-resistant breast cancer.* Clin Cancer Res, 2012. **18**(24): p. 6784-91.
203. Cizkova, M., et al., *Outcome impact of PIK3CA mutations in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab.* Br J Cancer, 2013. **108**(9): p. 1807-9.
204. Ekberg, J. and J. Persson, *Post-translational modification of cyclin A1 is associated with staurosporine and TNF alpha induced apoptosis in leukemic cells.* Molecular and Cellular Biochemistry, 2009. **320**(1-2): p. 115-124.
205. Marlow, L.A., et al., *Foxo3a drives proliferation in anaplastic thyroid carcinoma through transcriptional regulation of cyclin A1: a paradigm shift that impacts current therapeutic strategies.* Journal of Cell Science, 2012. **125**(18): p. 4253-4263.
206. Milner, B.J., et al., *P53 Mutation Is a Common Genetic Event in Ovarian-Carcinoma.* Cancer Research, 1993. **53**(9): p. 2128-2132.
207. Restle, A., et al., *Dissecting the role of p53 phosphorylation in homologous recombination provides new clues for gain-of-function mutants.* Nucleic Acids Res, 2008. **36**(16): p. 5362-75.
208. Wegiel, B., et al., *Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival.* Int J Cancer, 2008. **122**(7): p. 1521-9.
209. Rivera, A., et al., *Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2006. **63**(12): p. 1425-1439.
210. Osborne, R.J. and V. Leech, *Polymerase Chain-Reaction Allelotyping of Human Ovarian-Cancer.* British Journal of Cancer, 1994. **69**(3): p. 429-438.
211. Hamanishi, J., et al., *Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3360-5.
212. Rezaee, M., L. Sanche, and D.J. Hunting, *Cisplatin Enhances the Formation of DNA Single- and Double-Strand Breaks by Hydrated Electrons and Hydroxyl Radicals.* Radiation Research, 2013. **179**(3): p. 323-331.
213. Zamble, D.B., et al., *Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease.* Biochemistry, 1996. **35**(31): p. 10004-13.