

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Radiologie
Klinik für Strahlentherapie
Direktor: Prof. Dr. med. Claus Rödel

**Association of Polo-Like Kinase 3 and PhosphoT273 Caspase 8
Levels with Disease-Related Outcomes Among Cervical
Squamous Cell Carcinoma Patients Treated with Chemoradiation
and Brachytherapy**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Maximilian Fleischmann

aus Darmstadt

Frankfurt am Main, 2019

Dekan:	Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Referent/in:	PD Dr. Dr. Nikolaos Tselis
Korreferent/in:	Prof. Dr. Sven Becker
ggf. 2. Korreferent/in:	
Tag der mündlichen Prüfung:	06. März 2020

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung in deutscher Sprache	6
Zusammenfassung in englischer Sprache	8
Abkürzungsverzeichnis	10
Übergreifende Zusammenfassung	12
Synopsis des theoretischen Hintergrunds	12
Epidemiologie	12
Ätiologie und HPV	13
Therapie des Zervixkarzinoms	14
Polo-like Kinase 3 und phosphoT273 Caspase 8	16
Fragestellung	17
Darstellung der Publikation	17
Ergebnisse	18
Histopathologische Charakteristika	18
Überleben und onkologisches Outcome	18
Weiterführende Untersuchungen	19
Zusammenfassung der Ergebnisse	19
Diskussion der Ergebnisse	20
Stärken und Einschränkungen dieser Arbeit	22
Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikation(en)	23
Publikation	24
Abstract	25
Introduction	26
Materials and Methods	28
Results	31
Discussion	37
Darstellung des eigenen Anteils	42
Literaturverzeichnis	43
Anhang	51
FIGO-Klassifikation des Zervixkarzinoms	51
Methodik	53

Lebenslauf	57
Schriftliche Erklärung	60

ZUSAMMENFASSUNG IN DEUTSCHER SPRACHE

Durch Implementierung eines effizienten Früherkennungsprogramms ist die Inzidenz des Zervixkarzinoms in Industrienationen seit 2005 auf konstant niedrigem Niveau. Ungeachtet dessen ist das Zervixkarzinom mit deutlich höheren Inzidenzraten und weniger als 50% Gesamtüberleben in den nicht industrialisierten Staaten die vierthäufigste Tumorentität der Frau weltweit.

Zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen Zervixkarzinoms (FIGO Stadium IIb bis IVa bzw. Ib2/IIa2 mit mehreren histologischen Risikofaktoren) besteht nach aktueller Leitlinie (Stand 2014) und internationalem Konsens Indikation zur platinhaltigen Radiochemotherapie (RCT), subsequent gefolgt von einer (High Dose-Rate) Brachytherapie (HDR-BT). Unter diesen Umständen beträgt die lokale Kontrolle für Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem Tumor zwischen 74% und 85%.

Dennoch stagnieren Gesamtüberleben und das spezifische Überleben bezogen auf verschiedene klinische Endpunkte, sodass die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien und Therapieoptionen, insbesondere zur Behandlung rezidivierter und metastasierter Erkrankungsstadien, angezeigt ist. Darüber hinaus spielen im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten molekulare Marker sowohl als prädiktive als auch als therapeutische Targets bei der Behandlung des Zervixkarzinoms eine bislang untergeordnete Rolle, während molekularzielgerichtete Therapien in der modernen Krebstherapie einen immer größeren Stellenwert einnehmen.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, neue Biomarker für das Zervixkarzinom und dessen Ansprechen auf simultane Radiochemotherapie und anschließende Brachytherapie zu identifizieren.

Zu diesem Zweck untersuchten wir in einem Patientenkollektiv von 74 Patientinnen mit histologisch gesichertem Zervixkarzinom (FIGO Ib - IVb) prätherapeutisch gewonnenes Biopsiegewebe. Mittels immunohistochemischer Methoden wurde die Expression von Polo-like Kinase 3 (PLK3) und phosphoT273 Caspase-8 erfasst und quantifiziert. Die Ergebnisse wurden anschließend mit klinischen bzw. histo-

pathologischen Charakteristika, einschließlich der p16^{INK4a} Expression und den klinischen Endpunkten lokales progressionsfreies- und Fernmetastasen-freies Überleben bzw. dem tumorspezifischem und dem Gesamtüberleben nach kurativ intendierter Therapie korreliert.

Hierbei konnte zunächst eine signifikante Korrelation zwischen der PLK3 und pT273 Caspase-8 Expression beobachtet werden ($p = 0.009$). Darüber hinaus war PLK3 signifikant mit dem N-Status ($p = 0.046$), dem M-Status (0.026) und dem FIGO-Stadium ($p = 0.001$) assoziiert, wohingegen die pT273 Caspase8-Expression signifikant mit der Tumorgröße (T-Stadium) korreliert war. Bezogen auf univariate Überlebenszeitanalysen war eine erhöhte PLK3-Expression signifikant mit einer geringeren Rate an Fernmetastasen (DMFS $p = 0.009$) sowie einem signifikant verlängertem tumorspezifischem und Gesamtüberleben assoziiert (CSS $p = 0.001$, OS $p = 0.003$). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für die pT273-Caspase 8 Expression mit einer verringerten Metastasierungsrate ($p=0.021$) und verbessertem tumorspezifischem ($p<0,001$) sowie Gesamtüberleben ($p=<0.001$) gezeigt werden. In den multivariaten Analysen verblieb die pT273-Caspase 8-Expression mit einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben ($p=0.001$).

Zusammenfassend belegen diese Daten erstmals eine signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten prä-therapeutischen PLK3 und pT273 Caspase 8-Expression und einem zu favorisierenden klinischen Verlauf nach mit Radiochemotherapie behandeltem Zervixkarzinom.

ZUSAMMENFASSUNG IN ENGLISCHER SPRACHE

Due to the implementation of an efficient screening program, the incidence rate of uterine cervical cancer decreased and thus remains on a constantly low level in western countries since 2005. In contrast, cancer of the uterine cervix is still the fourth most frequently occurring malignancy in women worldwide and 85% of deaths from cervical cancer occur in low- or middle-income countries.

Definitive chemoradiotherapy (CRT) subsequently followed by high-dose-rate (HDR) brachytherapy (BT) is the state-of-the-art treatment for locally advanced cervical cancer (\geq FIGO IIb). Under these circumstances, local control for such patients with locally-advanced disease ranges between 74 and 85%.

Nevertheless, the survival rate is stagnating in the recent years and effective strategies especially for locally recurrent or metastatic disease are still missing, while tumour biology and cancer immunology are considered to play an increasingly important role towards in modern anti-cancer therapies.

In the present study we aimed to investigate the impact of PIK3 expression and levels of caspase-8 phosphorylated on residue T273 in response to radical chemoradiotherapy.

Against this background, immunohistochemistry for polo-like kinase 3 and pT273 caspase-8 was performed to detect and quantify protein expression. Next, results were correlated with clinical-pathological characteristics, p16^{INK4a} expression and follow-up data of the patients to assess their predictive and prognostic value. Primary endpoints were local progress-free and distant metastasis-free survival (LPFS, DMFS) as well as cancer-specific and overall survival (CSS, OS).

PLK3 expression levels were associated with pT273 Caspase 8 levels ($p = 0.009$), as well as N stage ($p = 0.046$), M stage ($p = 0.026$), and FIGO stage ($p = 0.001$). By the same token, pT273 Caspase 8 levels were associated with T stage ($p = 0.031$). Increased PLK3 levels corresponded to a lower risk of distant relapse ($p = 0.009$), improved CSS ($p = 0.001$), and OS ($p = 0.003$). Phospho T273 Caspase 8 similarly corresponded to decreased risk of distant failure ($p = 0.021$), and increased CSS ($p < 0.001$) and OS ($p < 0.001$) and remained a significant predictor for OS on

multivariate analysis. TCGA data confirmed the association of low PLK3 expression with resistance to radiotherapy and BT ($p < 0.05$), as well as increased propensity for metastasis ($p = 0.019$). Finally, a combined PLK3 and pT273 Caspase 8 score predicted for decreased distant relapse ($p = 0.005$), and both improved CSS ($p < 0.001$) and OS ($p < 0.001$); this combined score independently predicted distant failure ($p = 0.041$) and CSS ($p = 0.003$) on multivariate analyses.

In summary, these data support the notion that increased pre-treatment tumor levels of PLK3 and pT273 caspase 8 predict for superior clinical response among cervical cancer patients treated with definitive CRT plus BT.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATM	Ataxia Teleangiectasia Mutated
CASP8	Caspase 8 Gen
Cdc25	Cell division cycle 25, Cyclin-abhängige Phosphatase
CD95	Cluster of Differentiation 95, Fas-Rezeptor, APO-1
CD8	Cluster of Differentiation 8
Chk2	Checkpoint-Kinase 2, Serin/Threoninkinase
CSS	Cancer-specific survival
CtbP	C-terminal binding Protein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DISC	Death-inducing signaling complex
DMFS	Distant metastasis-free survival
DNA	Engl. DNS, Desoxyribonukleinsäure
EBRT	External Beam Radiation Therapy
E6, E7	„Early“-Gene des HPV-Genoms
EQD2	Biologische Äquivalenzdosis
FADD	Fas-associated Death Domain-containing protein
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded tissue
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d' Obstétrique
GOG	Gynecologic Oncology Group
(HDR-)BRT	High-Dose Rate Brachytherapy
HIER	Heat-induced Epitope Retrieval
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPV	Humanes Papillomavirus
Ki67	Ki = Kiel, Proliferationsmarker
LPFS	Local progress-free survival
MMEJ	Mikrohomology-mediated End Joining
mRNA	messenger R(ibo)N(uclein)A(cid)

OS	Overall survival
pRb	Retinoblastom-Protein
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1
PLK	Polo-like Kinase
p53	Protein 53
p107	Protein 107
p130	Protein 130
RNA	Ribonucleinacid, Ribonukleinsäure
RSEM	RNA-Seq Expectation-Maximization
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
RCT	Radiochemotherapie
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMMR	Totale mesometriale Resektion des Uterus
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
5-FU	5-Fluoruracil

ÜBERGREIFENDE ZUSAMMENFASSUNG

SYNOPSIS DES THEORETISCHEN HINTERGRUNDS

Epidemiologie

Während die Inzidenz des Zervixkarzinoms in der Bundesrepublik Deutschland in den letzten 30 Jahren deutlich abgenommen hat und inzwischen auf konstant niedrigem Niveau verbleibt, stagniert die Mortalität und insbesondere die Morbidität. So erkrankten 2014 etwa 4540 Frauen an einem Zervixkarzinom. 1506 Frauen starben, wobei das relative 5-Jahres-Überleben für alle Stadien 69% betrug. Während das mittlere Erkrankungsalter auf aktuell 53 Jahre gesunken ist, bleibt die Inzidenz höherer Tumorstadien (> FIGO IIb) seit mehreren Jahren in etwa gleich. [1] Diese Entwicklung resultiert aus der Implementierung effektiver Maßnahmen der Sekundärprävention im Sinne eines 1971 eingeführten Screening Programms, basierend auf einem zytologischen Abstrich der Zervix und anschließender Färbung sowie histologischer Begutachtung (dem sogenannten Pap-Test nach George Papanicolaou) [45]. Nichtsdestotrotz sind die Möglichkeiten zur Behandlung rekurrenter/rezidivierter oder metastasierter Erkrankungsstadien äußerst limitiert und die Prognose weiterhin schlecht, sodass hier die Entwicklung neuer Strategien angezeigt ist.

Global betrachtet ist die epidemiologische Entwicklung äußerst heterogen. Etwa 90% aller Neuerkrankungen treten in Staaten mit niedrigen und mittleren Einkommen auf, in denen es weder organisierte Screening Programme gibt noch HPV-Impfungen für große Teile der Bevölkerung zugänglich sind. Daraus resultiert, dass 85% der weltweit etwa 300.000 Todesfälle auf Länder mit niedrigem sozioökonomischem Status entfallen. Die Sterblichkeit ist dort damit ungefähr 18-mal höher als in den westlichen Industrienationen. [2, 3]

Ätiologie und HPV

Nahezu allen malignen Veränderungen der Cervix uteri liegt eine Infektion mit dem Humanen Papillomavirus (HPV) zugrunde. Hierfür sind die Epithelverhältnisse der Portio vaginalis cervicis prädisponierend: Während die Portio („Ektocervix“) wie auch die Vagina mit mehrschichtigem unverhorntem Plattenepithel bedeckt ist, ist die Endocervix mit Schleim-bildendem, einreihigem und hochprismatischem Zylinderepithel bedeckt, welches zyklusabhängig ektropionieren und damit auf der Oberfläche der Portio erscheinen kann. Im Bereich dieser Transformationszone (*squamocolumnar junction*) kommt es bevorzugt zur Entstehung von zervikalen Dysplasien, wobei das invasive Zervixkarzinom zumeist aus den ektozervikalen Anteilen der Cervix uteri entsteht. [46] Demnach handelt es sich bei etwa 80% der Zervixkarzinome um Plattenepithelkarzinome, gefolgt vom Adenokarzinom (ca. 20%), welches sich vom Zylinderepithel des Zervikalkanals ableitet. Weitere weniger häufige histopathologische Subtypen sind Mischformen wie das adenosquamöse Karzinom, neuroendokrine Tumore, sowie klarzellige oder serös-papilläre Karzinome. [1]

Kommt es zu einer Infektion mit einem der Hochrisiko-HPV-Serotypen (meistens 16 oder 18, seltener 45, 31, 33, 52, 58 und 35), so persistiert diese in etwa 10% der Fälle.[47] Als Kofaktoren für die Entwicklung einer persistierenden HPV-Infektion gelten Tabakrauchen, die Langzeiteinnahme oraler Kontrazeptiva, Promiskuität sowie schlechte Genitalhygiene und Koinfektionen mit Herpes simplex oder Chlamydien sowie Immunsuppression zum Beispiel in Folge einer HIV-Infektion. [48] Das Persistieren der HPV-Infektion führt dann zur Integration und Transkription des Virusgenoms, gefolgt von der Expression viraler Proteine. Die maligne Transformation wird hierbei primär durch die viralen Onkoproteine E6 und E7 verursacht, die an die tumorrelevanten Proteine p53 bzw. pRb, p107 sowie p130 binden und deren Signalwege blockieren. Als Folge kommt es zu einer Dysregulation des Zellzyklus, genomischer Instabilität und schließlich zur Karzinogenese. [49, 50]

Die Inaktivierung von pRb induziert eine Überexpression von p16 (*cycline dependent kinase inhibitor 2A*), welches einen validen Surrogatmarker in der immunhistochemischen Detektion von HPV-Infektion in ano-genitalen Läsionen sowie Kopf-Hals Tumoren darstellt, sowie in Kombination mit Ki-67 zur Identifikation höhergradiger zervikaler Dysplasien dient.[51]

Vergleicht man das Ansprechen HPV-negativer Tumore mit HPV-positiven Tumoren auf Radiochemotherapie, zeigen Tumore, denen eine HPV-Infektion zugrunde liegt, ein verbessertes klinisches Ansprechen und zu favorisierenden Verlauf. Das Ansprechen auf Radiochemotherapie wird dabei von vielen Faktoren beeinflusst, jedoch vermutet man, dass virale Onkoproteine wie E6 und E7 die Reparaturkapazität von DNA-Schäden kompromittieren, sodass es zu einer erhöhten intrinsischen Strahlensensibilität HPV-positiver Tumorzellen kommt.[52]

Therapie des Zervixkarzinoms

Zur Behandlung des Zervixkarzinoms kann grob zwischen zwei zentralen Therapieoptionen unterschieden werden: Besteht ein lokal begrenztes Zervixkarzinom (FIGO IA1 – IIB) ohne den Nachweis von Lymphknotenmetastasen oder dem Vorhandensein von Risikofaktoren, so ist eine Operation die bevorzugte Therapiemodalität.[54] Der Umfang dieser kurativ intendierten Eingriffe reicht von einer fertilitätserhaltenden Konisation bis hin zur radikalen Hysterektomie bzw. totalen mesometrialen Resektion (TMMR) inklusive einer ausgedehnten Lymphadenektomie. Liegt jedoch ein lokal fortgeschrittenes Zervixkarzinom (FIGO \geq IIB) vor, besteht Indikation zur primären Radiochemotherapie subsequent gefolgt von einer High dose-rate Brachytherapie (HDR-BT). In der Regel erfolgt hierzu eine konkomitante Applikation von Cisplatin, wobei der simultane Einsatz ionisierender Strahlung und zytostatischer Substanzen zu einem synergistischen Effekt beider Modalitäten führt.[52] Gegebenenfalls kann bei bestimmten Risikokonstellationen eine Kombination mit 5-Fluoruracil oder anderen Zytostatika erfolgen (RTOG 90-01).[55] Integraler Bestandteil eines kurativ intendierten Therapiekonzepts ist die HDR-BT, die nach abgeschlossener RCT erfolgt. Hybridtechniken aus intracavitärer und interstitieller Brachytherapie ermöglichen es hier eine besonders hohe Rate an

lokaler Kontrolle zu generieren.[56] Während im anglo-amerikanischen Raum die primäre Radiochemotherapie bereits ab Stadium IB2 präferiert wird, ist die simultane und alleinige RCT nach aktueller deutscher Leitlinie erst ab Stadium IIB Standardtherapie. Die Therapie des Lokalrezidivs richtet sich indes nach der primären Therapiemodalität: Erfolgte zunächst eine operative Therapie, so besteht jetzt die Möglichkeit einer Radio(chemo)therapie, wohingegen nach primärer Radiochemotherapie die Operation sowie in einigen Fällen die Re-Irradiation diskutiert werden kann.[57] Als medikamentöse Systemtherapie sind zumeist verschiedene Cisplatin-Kombinationen in Anwendung, wobei die Kombination von Cisplatin mit Paclitaxel, Vinorelbin, Gemcitabine oder Topotecan keine signifikante Überlegenheit einer einzelnen Substanz zeigen konnte (GOG204).[58] Währenddessen erbrachte eine Kombination von Cisplatin, Paclitaxel und dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab einen signifikanten Überlebensvorteil bei erhöhter Toxizitätsrate. (GOG 240).[59] Nichtsdestotrotz bleibt die Prognose für Frauen mit rezidivierender oder metastasierter Erkrankung schlecht, während für Studien zum Einsatz neuer Substanzen wie beispielsweise Immuncheckpoint-Inhibitoren (GOG 3016/ENGOT-cx9, KEYNOTE-158) noch keine abschließenden Ergebnisse vorliegen.[60] Rationale für den Einsatz von Immuntherapien ist die prinzipiell als hoch eingestufte Immunogenität HPV-assoziierten Malignomen.[61] Schließlich bestehen weitere Ansätze wie therapeutisches Impfen (NCT02853604) und der Einsatz von adaptiver Zell-Therapie (ACT) mittels autologer T-Zellen (NCT03108495).

Polo-like Kinase 3 und phosphoT273 Caspase 8

In menschlichen Zellen konnten bislang fünf Polo-like Kinasen (PLK) identifiziert werden (PLK1, PLK2/Snk, PLK3/Fnk/Prk, PLK4/Sak und PLK5). Polo-like Kinasen sind über eine hochkonservierte Serin/Threonin-Domäne an ihrem N-terminalen Ende und eine einzigartige C-terminale Polo-Box-Domäne, die die Substratbindung, enzymatische Aktivität und Lokalisation der Kinase in der Zelle kontrolliert, charakterisiert. [11] Durch eine Vielfalt an Substraten, wie Chk2, Cdc25

Phosphatasen und p53 steuern PLKs entscheidende Ereignisse der Zellzyklusprogression, des Eintritts in die Mitose und der DNA-Reparatur. In malignen Zellen kommt es zu einer Dysregulation der PLK-Aktivität, die zu einer erhöhten Proliferationsrate, Minderung der Apoptose und der Fähigkeit zur Gewebeinvasion führt.[8, 9, 10, 12, 13, 14] Die Funktion von Polo-like Kinase 3 (PLK3) ist bislang weniger gut verstanden; prädiktiver Wert und therapeutischer Nutzen werden kontrovers diskutiert. Während eine Überexpression mit einem verkürzten Überleben in Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinomen assoziiert ist [16, 17, 18], zeigte eine erhöhte PLK3-Expression einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf von Patienten mit hepatozellulären Karzinomen und Bronchialkarzinomen, als auch HPV-assoziierten Malignomen wie Kopf-Hals-Tumoren und Analkarzinomen. [19, 20, 21, 22]

In Folge von zytotoxischem oder genotoxischem Stress, DNA-Schäden oder ionisierender Strahlung kommt es zu einer Aktivierung von PLK3 durch die Ataxia telangiectasia mutated (ATM) Kinase. Dies führt wiederum zu einer Phosphorylierung von p53 und Checkpoint Kinase 2 (CHK2) und damit direkt zu Zellzyklus-Arrest und Apoptose. Zwischen PLK3 und p53 besteht indes ein reziproker Feedbackmechanismus: p53 bindet an die Promotorregion des PLK3-Gens und induziert dessen Genexpression. PLK3 vermag p53 zu phosphorylieren – und damit zu aktivieren. Es kommt zu einem positiven Feedback-Loop und einer Amplifizierung der Signalkaskade in Folge von zellulärem Stress. [23, 35]

Darüber hinaus hat PLK3 durch die Phosphorylierung des C-terminalen Bindungsproteins (CtbP) direkten Einfluss auf das *Microhomology-mediated end-joining* (MMEJ) und damit auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. [35, 24] Zusätzlich konnte vor kurzem gezeigt werden, dass PLK3 nach CD95(Apo1/fas)-Rezeptor Stimulation durch Phosphorylierung von Caspase 8 an T(hreonin)273 ebenso Einfluss auf das extrinsische, pro-apoptotische *Signalling* ausübt und dieses fördert.[26] Bindet ein kompetenter Ligand (CD95L/Fas-L) an einen entsprechenden Rezeptor, kommt es zur Oligomerisierung und damit zur Aktivierung der cytosolischen *death domain*. Gemeinsam mit FADD (fas-assoziierte *death domain*) und Caspase 8 formiert sich der sog. DISC (*death-inducing signalling*

complex. PLK3 interagiert hierbei sowohl mit dem CD95-Rezeptor, FADD als auch Caspase 8, sodass deren *knock-out* eine Aktivierung von PLK3 verhindert.[26] Klinisch konnte dies mittels einer Kohorte Analkarzinompatienten validiert werden: Eine geringe PLK3-Expression korrelierte hierbei signifikant mit einer geringen Phosphorylierungsrate von Caspase 8 an der Aminosäure Threonin 273 und war mit einem signifikant schlechteren Überleben assoziiert.[22]

Caspase 8 initiiert darüber hinaus nicht nur als integraler Bestandteil des DISC die extrinsische Apoptose, sondern ist vielmehr an weiteren Prozessen wie der Nekroptose, der zellulären Migration und Adhäsion sowie der inflammatorischen Reaktion beteiligt. Maligne Attribute in Tumorzellen könnten damit sowohl gefördert als auch supprimiert werden. [38, 53]

FRAGESTELLUNG

Für Polo-like Kinase 3 und dem damit assoziiertem pT273 Caspase 8-Signal konnte ein positiver prädiktiver Wert in Hinblick auf das Therapieansprechen nach konkomitanter Radiochemotherapie bei HPV-assoziierten Malignomen gezeigt werden. Für das Zervixkarzinom besteht evidenter Mangel an prädiktiven und therapeutisch-nutzbaren, molekularen Markern, sodass in dieser Arbeit die Frage beantwortet werden soll, ob PLK3 und pT273 Caspase 8 valide Marker für das Ansprechen auf Radiochemotherapie beim Zervixkarzinom sind.

DARSTELLUNG DER PUBLIKATION

Zur Beantwortung der Fragestellung wurde prä-therapeutisch gewonnenes Biopsiegewebe mittels immunhistochemischer Methoden untersucht und die Ergebnisse mit einem umfangreichen histopathologischen und klinischen Dataset korreliert. Eine genaue Darstellung der Methodik findet sich im Anhang.

ERGEBNISSE

Histopathologische Charakteristika

In den prätherapeutischen Biopsien konnte zunächst eine signifikante ($p=0.009$) Korrelation zwischen der PLK3 und der pT273-Caspase 8-Expression ermittelt werden. Hierbei zeigte sich bei 54 Patientinnen (73%) eine hohe PLK3-Expression; bei 33 Patientinnen (44.6%) konnte eine hohe pT273 Caspase 8-Expression detektiert werden (Tabelle 1, Abbildung 1). Zudem war die PLK3-Expression signifikant mit dem N und M Stadium ($p=0.046$ und $p=0.026$) sowie dem FIGO Stadium (0.001) assoziiert, während die pT273-Caspase 8-Expression eine Korrelation mit dem T-Stadium ($p= 0.031$) aufwies (Tabelle 2).

Überleben/Onkologisches Outcome

Im Beobachtungszeitraum kam es bei 19 Patientinnen zu einem progredienten Krankheitsverlauf. In 15 Fällen traten Fernmetastasen auf, respektive kam es zu lokalem Progress (in 8 Fällen). Lokaler Progress war hierbei signifikant mit T-Stadium ($p=0.001$) und N-Status ($p < 0.001$) assoziiert, während weder PLK3 noch pT273 Caspase 8 Einfluss auf die lokale Kontrolle hatten (Tabelle 3). Patientinnen mit einer erhöhten PIK3-Expression zeigten in den univariaten Analysen ein signifikant verbessertes, Metastasen-freies Überleben ($p=0.009$) sowie ein signifikant gesteigertes tumorspezifisches ($p=0.001$) und Gesamtüberleben ($p=0.003$, Abbildung 2). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für die pT273-Caspase 8-Expression mit einer verringerten Metastasierungsrate ($p=0.021$) und verbessertem tumorspezifischen ($p < 0,001$) sowie Gesamtüberleben ($p < 0.001$) gezeigt werden (Abbildung 3). In den multivariaten Analysen verblieb die pT273-Caspase 8-Expression mit einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben ($p=0.001$). Weitere Faktoren mit signifikantem Einfluss auf das tumorspezifische Überleben waren T- und FIGO-Stadium ($p=0.006$, $p=0.017$, Tabelle 3). Insgesamt verstarben im Beobachtungszeitraum (Median: 32 Monate; Spannweite: 5 – 174) 36

Patientinnen; davon 16 am Zervixkarzinom und 16 an interkurrenten Erkrankungen. Ferner konnten drei therapieassoziierte Todesfälle verzeichnet werden.

Mittels Kombinationsvariable aus PLK3-Expression und pT273 Caspase 8-Signal konnte überdies gezeigt werden, dass beide Marker in hoher Expression signifikant mit einer geringeren Metastasierungsrate ($p=0.005$), sowie einem erhöhten tumorspezifischen ($p < 0.001$) und Gesamtüberleben ($p < 0.001$) assoziiert waren (Abbildung 5). In der multivariaten Analyse verblieb pT273 Caspase 8 als signifikanter Marker für das tumorspezifische Überleben ($p < 0.001$, Tabelle 3).

Weiterführende Untersuchungen

Abschließend erfolgte die Validierung der Ergebnisse mithilfe eines TCGA Datasets. Für PLK3 konnte eine signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten Metastasierungsrate und niedriger PLK3-Genexpression ermittelt werden. Außerdem konnte eine signifikante Assoziation zwischen niedriger PLK3-Expression und Strahlenresistenz beobachtet werden. Caspase 8 mRNA-Expression hatte keinerlei Einfluss auf die hier genannten Faktoren.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die hier vorliegenden Daten belegen erstmals eine signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten prätherapeutischen Expression von PIK3 und pT273-Caspase 8 mit einem verbesserten klinischen Verlauf nach konkomitanter Radiochemotherapie und anschließender Brachytherapie bei Patientinnen mit lokal-fortgeschrittenem Zervixkarzinom.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Aktuell spielen bei der Behandlung des Zervixkarzinoms molekulare Marker kaum eine Rolle, während im Gegensatz dazu, Tumorbiologie und molekulare Marker in anderen Tumorentitäten eine immer zentralere Rolle einnehmen.[52, 6] Insbesondere in rezidivierten und metastasierten Erkrankungsstadien ist die Prognose des Zervixkarzinoms nach wie vor schlecht und weltweit versterben pro Jahr über 250.000 Frauen an den Folgen des Zervixkarzinoms. [2, 3, 54]

Prognosefaktoren, die prädiktiven Einfluss auf den onkologischen Verlauf der Erkrankung (*Outcome*) haben, sind vor allem Parameter, die sich auf Tumorgröße und Ausbreitung der Erkrankung beziehen sowie Verfügbarkeit und Qualität der Brachytherapie.[33, 34] Für die in letzter Zeit auf molekularer Ebene in den Fokus gerückten immunologischen Marker wie *programmed death ligand 1* (PD-L1) und die Anwesenheit von CD8-positiven T-Lymphozyten im Tumormikromilieu konnte zunächst keine Assoziation zum Ansprechen auf Radiochemotherapie gezeigt werden.[62] Dies ist in Einklang mit nicht veröffentlichten Ergebnissen im Rahmen dieser Arbeit, in denen ebenfalls kein Einfluss CD8-positiver Lymphozyten gezeigt werden konnte. Nichtsdestotrotz konnte in einer relativ großen Anzahl Zervixkarzinome PD-L1-Expression nachgewiesen werden, was den Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren nahelegt. Erste Studienergebnisse führten inzwischen zu einer Zulassung der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) für den Einsatz von Pembrolizumab bei Patientinnen mit fortgeschrittenem, PD-L1-positivem Zervixkarzinom.[60]

Daneben konnte ein positiver Effekt auf das Ansprechen nach RCT bei einer gesteigerten Expression an DNA-Reparaturproteinen wie ATM und PARP-1 gezeigt werden.[63] Resultierend aus der Dysregulation multipler Signalwege durch HPV, unterliegt das Zervixkarzinom einer großen genomischen Instabilität und ist geprägt von somatischen Mutationen, Amplifikationen und genetischem *Rearrangements*.[49]

Die mit zellulärem Stress assoziierte Expression von PLK3 [10] ist eng mit der Reaktion auf DNA-Schäden verknüpft und ist in hoher Expression mit einem

verbesserten Ansprechens auf RCT assoziiert. Dies könnte auf die Wirkung von PLK3 auf das Therapieansprechen hindeuten: Die erhaltene Funktionsfähigkeit der DNA-Reparaturproteine macht diese erst zu einem *Target* von Strahlen- und Chemotherapie. Eine hohe PLK3-Expression könnte demnach auf einen funktionsfähigen Detektions-, Reaktions- und Feedback-Mechanismus auf zellulären Stress und DNA-Schäden hindeuten. PLK3 fungiert dann als Schnittstelle zwischen DNA-Schäden, DNA-Reparatur und Zellzyklusprogression. Eine geringe Expression von PLK3 könnte somit mit einer erhöhten RCT-Resistenz und vermindertem Therapieansprechen einhergehen.

Im Rahmen des Cancer Genome Atlas Projects wurden zahlreiche Mutationen und Amplifikationen identifiziert, die die genomische Landschaft des Zervixkarzinoms genauer charakterisieren. CASP8 unterliegt insbesondere bei Plattenepithelkarzinomen einer signifikant hohen Rate an Mutationen.[64] Ein Verlust der pro-apoptotischen Funktion dieser apikalen Caspase wäre ein naheliegender Mechanismus dem immunogenen Zelltod zu entgehen und die extrinsisch-initiierte Apoptose zu umgehen. Nichtsdestotrotz konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ein verstärktes pT273 Caspase 8 Signal mit einem verlängerten Überleben bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem Zervixkarzinom assoziiert ist. Die Phosphorylierung an Threonin 273 erfolgt hierbei direkt durch PLK3, sodass hier eine Koinzidenz bestehen könnte und die prädiktive Rolle von pT273 Caspase auf der Phosphorylierung durch PLK3 beruht.

Die genaue Rolle von PLK3 und pT273 Caspase 8 innerhalb der komplexen Mechanismen auf das Ansprechen auf RCT kann durch diese Arbeit nicht geklärt werden. Jedoch konnten anhand der hier vorliegenden Ergebnisse neue Aspekte des Therapieansprechens des Zervixkarzinoms auf Radiochemotherapie dargestellt werden. PLK3 stellt hierbei einen prädiktiven Marker dar, der zuvor nicht in Zusammenhang mit dem Zervixkarzinom beschrieben worden ist.

Gleichwohl besteht weiterhin ein Desiderat neue Konzepte zur Behandlung des Zervixkarzinom zu entwickeln und diese auch weltweit zugänglich zu machen. Denn obwohl ein effektiver Impfstoff zur Verfügung steht, bleiben die Impfraten niedrig,

sodass die Eradikation des Zervixkarzinoms wird in den nächsten Dekaden nicht erreichbar sein wird.

Stärken und Einschränkungen dieser Arbeit

Die hier veröffentlichten Ergebnisse stehen in Einklang mit bisher veröffentlichten Analysen, die den prädiktiven Wert der hier untersuchten Marker innerhalb von HPV-assoziierten Malignomen untersucht haben. Darüber hinaus konnten die Ergebnisse für PLK3 mittels eines TCGA-Datasets validiert werden, was den hohen methodischen Wert und die Validität dieser Arbeit unterstreicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Bezug auf die untersuchten Marker und deren Wert für das Therapieansprechen des lokal fortgeschrittenen Zervixkarzinoms bislang einzigartig. Nichtsdestotrotz muss eine kritische Auseinandersetzung mit den hier vorliegenden Ergebnissen erfolgen. Zunächst einmal handelt es sich um eine retrospektive Analyse. *Confounders* und Bias können hierbei zu einer immanenten Verzerrung der Ergebnisse führen. Einschränkungen in der Reliabilität entstehen außerdem aus einem recht kleinen und heterogenen Patientenkollektiv – multizentrisch angelegte Untersuchungen bieten hier bessere Querschnittsbedingungen und höhere Fallzahlen. Darüber hinaus existieren zur Auswertung immunhistochemischer Färbungen keinerlei Normen und Standards, sodass Auswertung und Evaluation der erhobenen Daten weiterhin uneinheitlich ist.

Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikation(en)

1. Fleischmann M, Martin D, Peña-Llopis S, Oppermann J, von der Grün J, Diefenhardt M, Chatzikonstantinou G, Fokas E, Rödel C, Strebhardt K, Becker S, Rödel F and Tselis N (2019) Association of Polo-Like Kinase 3 and PhosphoT273 Caspase 8 Levels With Disease-Related Outcomes Among Cervical Squamous Cell Carcinoma Patients Treated With Chemoradiation and Brachytherapy. *Front. Oncol.* 9:742. doi: 10.3389/fonc.2019.00742

PUBLIKATION

Association of Polo-Like Kinase 3 and PhosphoT273 Caspase 8 Levels With Disease-Related Outcomes Among Cervical Squamous Cell Carcinoma Patients Treated With Chemoradiation and Brachytherapy

Max Fleischmann¹, Daniel Martin¹, Samuel Peña-Llopis^{2,3,4}, Julius Oppermann¹, Jens von der Grün¹, Markus Diefenhardt¹, Georgios Chatzikonstantinou¹, Emmanouil Fokas^{1,3,5,6}, Claus Rödel^{1,3,5,6}, Klaus Strebhardt^{3,6,7}, Sven Becker⁷, Franz Rödel^{1,3,5,6†} and Nikolaos Tselis^{1*†}

¹ Department of Radiotherapy and Oncology, Goethe-University, Frankfurt, Germany,

² Division of Solid Tumor Translational Oncology, West German Cancer Center, Essen University Hospital, Essen, Germany,

³ German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany,

⁴ German Cancer Consortium (DKTK) Partner Site, Essen/Düsseldorf, Germany,

⁵ Frankfurt Cancer Institute (FCI), University of Frankfurt, Frankfurt, Germany,

⁶ German Cancer Consortium (DKTK) Partner Site, Frankfurt/Mainz, Germany,

⁷ Department of Gynecology, Goethe-University, Frankfurt, Germany

Introduction: Definitive chemoradiation (CRT) followed by high-dose-rate (HDR) brachytherapy (BT) represents state-of-the-art treatment for locally-advanced cervical cancer. Despite use of this treatment paradigm, disease-related outcomes have stagnated in recent years, indicating the need for biomarker development and improved patient stratification. Here, we report the association of Polo-like kinase (PLK) 3 expression and Caspase 8 T273 phosphorylation levels with survival among patients with cervical squamous cell carcinoma (CSCC) treated with CRT plus BT.

Methods: We identified 74 patients with FIGO Stage Ib to IVb cervix squamous cell carcinoma. Baseline immunohistochemical scoring of PLK3 and pT273 Caspase 8 levels was performed on pre-treatment samples. Correlation was then assessed between marker expression and clinical endpoints, including cumulative incidences of local and distant failure, cancer-specific survival (CSS) and overall survival (OS). Data were then validated using The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset.

Results: PLK3 expression levels were associated with pT273 Caspase 8 levels ($p = 0.009$), as well as N stage ($p = 0.046$), M stage ($p = 0.026$), and FIGO stage ($p = 0.001$). By the same token, pT273 Caspase 8 levels were associated with T stage ($p = 0.031$). Increased PLK3 levels corresponded to a lower risk of distant relapse ($p = 0.009$), improved CSS ($p = 0.001$), and OS ($p = 0.003$). Phospho T273 Caspase 8 similarly corresponded to decreased risk of distant failure ($p = 0.021$), and increased CSS ($p < 0.001$) and OS ($p < 0.001$) and remained a significant predictor for OS on multivariate analysis. TCGA data confirmed the association of low PLK3 expression with resistance to radiotherapy and BT ($p < 0.05$), as well as increased propensity for metastasis ($p = 0.019$). Finally, a combined PLK3 and pT273 Caspase 8 score predicted for decreased distant relapse ($p = 0.005$), and both improved CSS ($p < 0.001$) and OS ($p < 0.001$); this combined score independently predicted distant failure ($p = 0.041$) and CSS ($p = 0.003$) on multivariate analyses.

Conclusion: Increased pre-treatment tumor levels of PLK3 and pT273 Caspase 8 correspond to improved disease-related outcomes among cervical cancer patients treated with CRT plus BT, representing a potential biomarker in this context.

INTRODUCTION

As a result of screening regimens in the developed world, the incidence of uterine cervical cancer has been relatively constant in recent years, with an estimated 4,540 cases and 1,506 deaths from cervical cancer in Germany in 2014 (1). However, the entity still comprises the fourth most frequently occurring malignancy in women worldwide (2, 3). Definitive CRT followed by HDR-BT is currently the standard-of-care therapy for patients with locally advanced disease, generally including those patients with at least International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage IIb lesions. In the modern era, local control for such patients with locally advanced disease ranges between 74 and 85% (4). Moreover, for all stages, the 3-year survival rate in developed countries is 68% (4) and <50 % in non-developed countries (5). Nevertheless, survival rates were stagnating in recent years and effective treatment strategies for locally recurrent or metastatic disease still remain elusive indicating the need for biomarker development and translational research (6).

Polo like kinase 3 (PLK3), identified and cloned by our group (7) is a member of PLK family that encompasses five mammalian enzymes (PLK1, PLK2/Snk, PLK3/Fnk/Prk, PLK4/Sak, and PLK5) which regulate multiple components of cell cycle progression, entry into mitosis, and replication of DNA (8–10). A common feature of PLK1-PLK4 is a N-terminal serine/threonine kinase domain and a regulatory Polo-Box-Domain (PBD) in the C-terminus which is involved in subcellular localization, enzymatic activity, and substrate interaction (11). In malignant cells, PLK activity is dysregulated, resulting in increased proliferation, as well as invasion and resistance to apoptosis (12–14). Accordingly, a molecular targeting of members of the PLK family may represent an efficacious oncologic approach. This is supported by data demonstrating improved survival among acute myeloid leukemia patients treated with a PLK1 small molecular inhibitor BI 6727 (Volasertib) (15).

While the prognostic impact of PLK1 has been demonstrated across several disease sites [reviewed in (9, 12)], there is controversy regarding the prognostic value of PLK3 expression. Despite the fact that PLK3 overexpression is correlated with unfavorable outcomes in ovarian, breast, and prostate carcinomas (16–18), increased expression of PLK3 is associated with improved outcomes in hepatocellular cancer, lung cancer and human papilloma virus (HPV) associated lesions including head-and-neck as well as anal carcinoma (19–22).

Upon oxidative stress or DNA damage PLK3 kinase activity is increased in dependence of the Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and results in a phosphorylation of TP53 and checkpoint kinase 2 (Chk2) linking DNA damage to cell cycle arrest and apoptotic cell death (10, 23). Further, PLK3 directly impacts on DNA double-strand break repair by phosphorylation of C-terminal binding protein (CtBP) interaction protein (CtIP) initiating microhomology-mediated end joining (MMEJ) (24, 25). We have recently reported PLK3 phosphorylation of pro-Caspase 8 at residue T273 to promote apoptosis (26). Caspase 8 is a central component of the extrinsic apoptotic pathway (27) and thus, T273 phosphorylation by PLK3 serves to promote cell death (26). Clinically, we recently further reported that low levels of pT273 Caspase 8 and PLK3 in anal tumors are associated with inferior disease control (both local and distant), as well as poorer survival, following definitive CRT (22). Notably, in this tumor entity for both PLK3 and pT273 caspase-8 signals a significant positive correlation to the extent of HPV infection was evident (22) with quantitative HPV viral load and p16^{INK4a} expression to further correlate to local control as well as patients overall survival (28).

Here, we describe the association between disease-related outcomes and pre-treatment tumor PLK3 and pT273 Caspase 8 detection among locally-advanced cervical cancer patients.

MATERIALS AND METHODS

Patient Characteristics

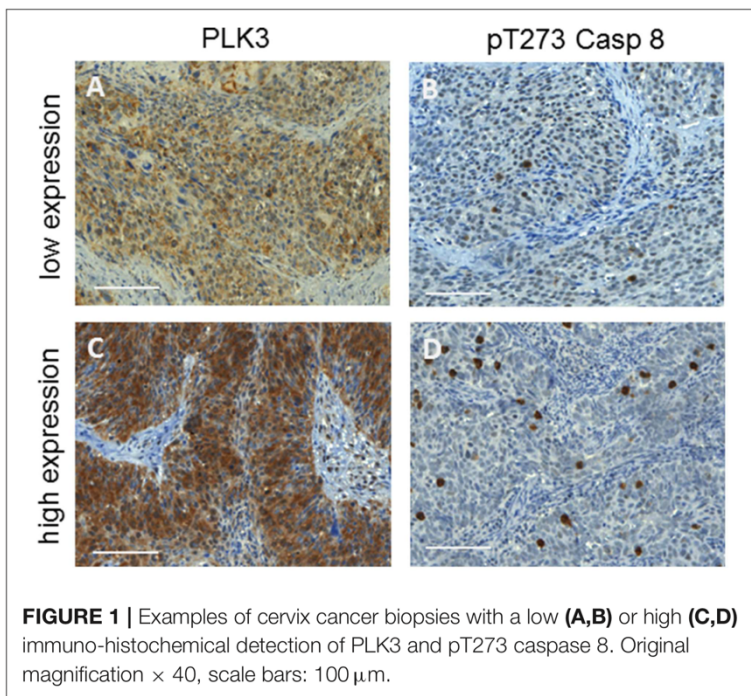
We identified, through retrospective review, 74 patients with uterine cervix squamous cell carcinoma treated with definitive CRT between 1999 and 2017 at our institution. Eligibility criteria included histological proof of cervix carcinoma FIGO stages Ib to IVb (29) and curative intent of CRT/BT. Patients were routinely subjected to standard pre-treatment staging including computer tomography or magnetic resonance tomography of the pelvis and abdomen, chest radiography, and baseline laboratory studies. Institutional review board approval was obtained in accordance with the Helsinki Declaration of 1975.

Treatment and Follow-Up Assessment

Treatment covered concomitant radiotherapy by photon beam linear accelerators (Elekta, Crowley, UK) followed by intracavitary +/- interstitial HDR-BT. Pelvic external beam radiotherapy (EBRT) was administered using a conventional four-field technique ($n = 22$), intensity-modulated RT (IMRT) or 3-D conformal RT using high-energy photons ($n = 52$). Median EBRT dose was 50.4 Gy (range, 45.0–66.6 Gy) delivered in daily 1.8Gy fractions (five fractions per week). Median physical BT dose was 40Gy (range, 4.0–48.0Gy). The median overall EQD2 generated from EBRT + BT for all patients amounted to 106.2 Gy (range, 54.2–121.6 Gy). A minimum EQD2 of 78.1 Gy was applied to every patient, who completed therapy. Cisplatin- based chemotherapy was administered weekly (40 mg/m^2) or in the first and last week of treatment concurrent to EBRT ($20 \text{ mg/m}^2/\text{day}$). Twelve patients additionally received two cycles of 5-Fluorouracil at 600 mg/m^2 , two patients Mitomycin-C at 7 mg/m^2 or Paclitaxel at 25 mg/m^2 . One patient received Cisplatin in combination with Gemcitabine (750 mg/m^2). Follow-up examinations occurred every 3 months during the first 24 months after CRT, and every 6 months thereafter. Monitoring included gynecological examination and imaging with pelvic MRI and/or abdominal CT.

Immunohistochemical Staining and

Scoring



Pre-treatment formalin fixed paraffin embedded (FFPE) biopsy tissues were stained manually by an experienced technician using DAKO EnVision™ FLEX Peroxidase Blocking reagent (K8000, DAKO, Hamburg, Germany). Primary anti-PLK3 (1:50 dilution, ab33119, Abcam, Cambridge, UK), anti-pT273 caspase 8 antibodies

established by our group (26) at a 1:200 dilution and anti p16^{INK4a} (CINtec Kit, Roche, Basel, Switzerland) were applied for 120 min at room temperature. Next, samples were incubated for 60min with anti-mouse and rabbit secondary antibodies (SM802) derived from a DAKO EnVision™ FLEX kit (K8000, DAKO) and epitope-antibody products were visualized using dextran polymer conjugated horseradish peroxidase as well as 3,3'-diaminobenzidine (DAB) chromogen. Counterstaining was performed using haematoxylin (Gill 3, Sigma Aldrich, Munich, Germany). Appropriate negative controls were utilized and stained in the absence of the corresponding primary antibody. PLK3 expression was dichotomized as being “high” (weighted score [WS] > 6) or “low” (≤ 6) based on a combination of considering the fraction of PLK3-positive tumor cells [1: (0–25%), 2: (26–50%), 3: (51–75%), and 4: (>75%)] as well as the intensity of immunohistochemical PLK3 staining (1: weak, 2: moderate, and 3: intense) as previously reported (22).

T273 Caspase 8 phosphorylation was scored as a percentage of the pT273 Caspase 8 positive tumor cells as noted via immunohistochemistry. Quantification of histochemical p16^{INK4a} detection with WS defined as for PLK3 has been previously reported in detail (28). Immunohistochemical samples were independently evaluated by two investigators (MF, FR) who were blinded to patient-specific clinical information. Image acquisition was via AxioImager Z1 microscope, with an AxioCam camera and associated Axiovision 4.6 software (Zeiss, Göttingen, Germany).

Cervical Cancer TCGA Datasets

RNA-Sequencing (RNA-Seq) and associated clinical data for CSSC and endocervical adenocarcinoma (CESC) patients were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Genomic clinical associations were performed as previously reported (30). Briefly, gene expression normalization was performed using the RNA-Seq Expectation-Maximization (RSEM) method. Gene expression was then stratified by quartiles, where the 1st quartile represented the lowest expression, the 2nd and 3rd quartiles an intermediate expression and the 4th quartile the highest expression. To compute overall survival, we considered the patient date of death or the last date the patient was known to be alive (last follow-up). Resistance to EBRT, BT, and chemotherapy was defined as progressive disease or partial response compared to patients that displayed complete responses.

Statistical Analysis

Correlation of pathologic factors, including immunohistochemical scoring, was performed with Spearman's correlation coefficient. Local control was defined from the time of CRT initiation, with first local tumor detection or progression after response following CRT scored as a local failure event. Cancer-specific survival (CSS) and overall survival (OS) were defined from CRT initiation; cancer-related death represented a CSS event. Survival curves for all disease-related outcomes were calculated per the Kaplan-Meier method; log-rank testing and Cox proportional

hazard modeling were utilized for univariate and multivariate survival analyses, respectively. Statistical tests were performed with *a priori* $\alpha = 0.05$ for significance; all tests were performed using IBM SPSS Version 25 Software (IBM, Ehningen, Germany).

RESULTS

Tumor and Patient Histopathologic Characteristics

Assessing pre-treatment tumor samples, 54 patients (73%) presented with increased PLK3 expression, 33 (44.6%) with increased pT273 Caspase 8 levels, and 47 (63.5%) with high p16^{INK4a} detection (Table 1). Figure 1 highlights examples of dichotomized staining for PLK3 and pT273 Caspase 8 immunohistochemistry.

TABLE 1 | Results of PLK3, pT273 caspase 8, and p16^{INK4a} immunohistochemistry.

Marker	PLK3 <i>n</i> (%)	pCasp 8 <i>n</i> (%)	p16 ^{INK4a} <i>n</i> (%)
Dichotomized score	≤6 WS >6	≤ median >	≤6 WS >6
Low score	20 (27.0)	41 (55.4)	27 (36.5)
High score	54 (73.0)	33 (44.6)	47 (63.5)

Dichotomized score low vs. high based on the median weighted score (WS: intensity x % pos. tumor cells), median pT273 Casp8 positive cells (%).

CSCC is considered to be associated with a high prevalence of HPV DNA detection and surrogate marker p16^{INK4a} expression (31, 32). We have recently shown that quantitative HPV viral load and p16^{INK4a} expression significantly correlated with local control as well as overall survival among anal cancer patients (28). Thus, we wanted to assess the predictive value of quantitative p16^{INK4a} scoring on clinical endpoints in our patient cohort. We observed a significant impact of quantitative p16^{INK4a} detection on local failure ($p = 0.014$) and CSS ($p = 0.013$), and a trend for OS ($p = 0.061$), while distant failure was not correlated to p16^{INK4a} expression ($p = 0.346$, Supplemental Figure 1).

TABLE 2 | Clinicopathological findings according to PLK3 expression and T273 Caspase 8 phosphorylation.

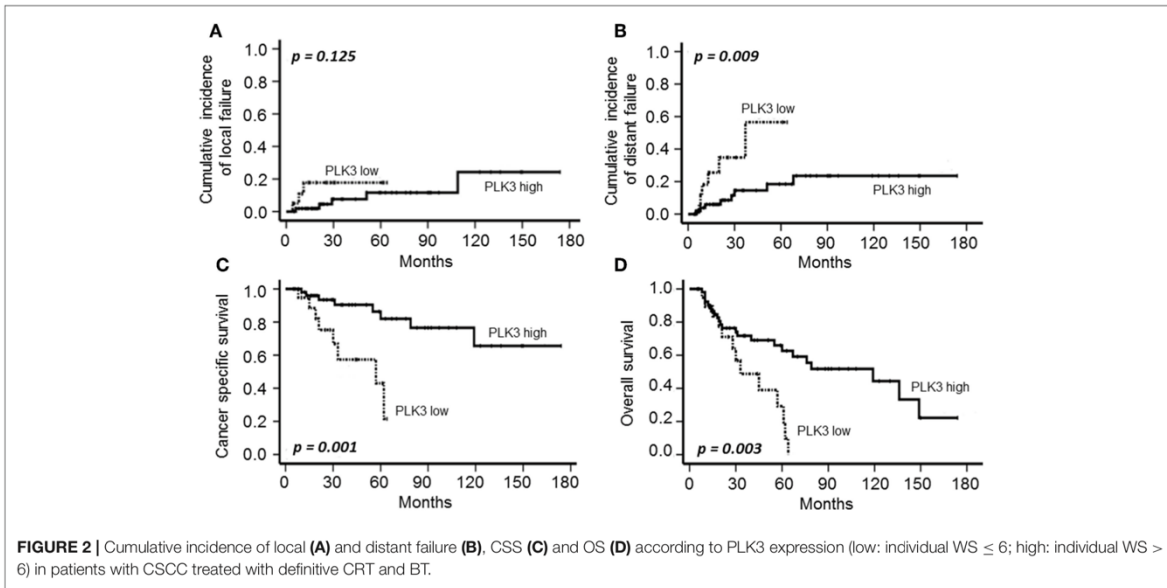
	No. of patients	PLK3 WS ≤ 6 n (%)	PLK3 WS > 6 n (%)	p-value	pCasp 8 ≤ Med n (%)	p Casp 8 > Med n (%)	p-value
AGE							
≤59 years	38	12 (16.2)	26 (35.1)		17 (23.0)	21 (28.4)	
>59 years	36	8 (10.8)	28 (37.8)	0.372	24 (32.4)	12 (16.2)	0.059
T-STAGE							
T1/2	39	7 (9.5)	32 (43.2)		17 (23.0)	22 (29.7)	
T3/4	35	13 (17.6)	22 (29.7)	0.065	24 (32.4)	11 (14.9)	0.031
N-STAGE							
N0	39	7 (9.5)	32 (43.2)		22 (29.7)	17 (23.0)	
N1	34	12 (16.2)	22 (39.7)		19 (25.7)	15 (20.3)	
Nx	1	1 (1.4)	0	0.046	0	1 (1.4)	0.766
M-STATUS							
M0	63	14 (18.9)	49 (66.2)		33 (44.6)	30 (40.5)	
M1	11	6 (8.1)	5 (6.8)	0.026	8 (10.8)	3 (4.1)	0.216
FIGO							
Low (Ia-IIb)	29	2 (2.7)	27 (36.5)		13 (17.6)	16 (21.6)	
High (IIIa-IVb)	45	18 (24.3)	27 (36.5)	0.001	28 (37.8)	17 (23.0)	0.146
GRADING							
G1/2	38	7 (9.5)	31 (41.9)		18 (24.2)	20 (27.0)	
G3	34	13 (17.6)	21 (28.4)	0.135	23 (31.1)	11 (14.9)	
Gx	2		2 (2.7)			2 (2.7)	0.267
p16							
Low (WS ≤ 6)	27	9 (12.2)	18 (24.3)		19 (25.7)	8 (10.8)	
High (WS > 6)	47	11 (14.9)	36 (48.6)	0.361	22 (29.7)	25 (33.8)	0.051
PLK3							
Low (WS ≤ 6)	20				16 (21.8)	4 (5.4)	
High (WS > 6)	54				23 (33.8)	29 (39.2)	0.009
pCasp 8							
Low (≤ Median)	41	16 (21.8)	25 (33.8)				
High (> Median)	33	4 (5.4)	29 (39.2)	0.009			

Significant values are given in bold.

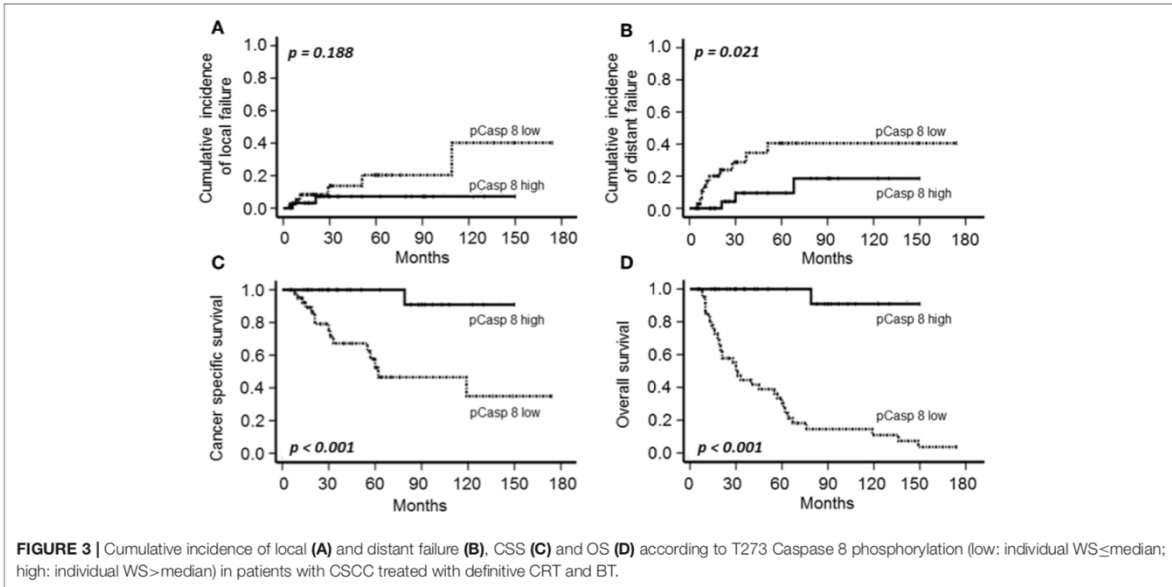
Elevated PLK3 expression was correlated with elevated pT273 Caspase 8 levels ($p = 0.009$). By contrast, we did not detect a significant relationship to p16^{INK4a} expression for both, PLK3 and pT273 caspase 8 expression (Table 2). Concerning patient- and tumor-related characteristics, elevated levels of PLK3 detection were more prevalent in patients with lower N- stage ($p = 0.046$), M-stage ($p = 0.026$), and FIGO category ($p = 0.001$), while no significant differences for age, T category and tumor grading were observed (Table2). Phospho T273 caspase 8 detection was significantly ($p = 0.031$) associated with T stage, but not with age, N and M stage, FIGO category, and tumor grading (Table 2).

Disease-Related Outcomes

Following definitive CRT plus BT, 19 patients (25.6 %) experienced disease relapse, including local recurrence ($n = 8$) and/or distant metastasis ($n = 15$). Local failure was associated with both T-stage ($p = 0.011$) and FIGO category ($p = 0.006$) in univariate analysis, while PLK3 and pT273 caspase 8 did not significantly impact on local control (Figures 2A, 3A).



The cumulative 5- and 10-year distant metastasis incidence in the cohort were estimated at 22.3 and 29.8%, respectively. T-stage ($p = 0.011$), FIGO category ($p = 0.008$), low PLK3 (Figure 2B, $p = 0.009$), and low pT273 caspase 8 levels (Figure 3B, $p = 0.021$) were associated with distant metastasis risk; only FIGO stage continued to predict for distant metastasis risk on multivariate analysis ($p = 0.041$) (Table 3).



With a median of 32 months follow-up (range: 5–174 months), OS and CSS were 51.4 and 78.4%, respectively. A total of 36 patients died during follow-up; 16 due to cervical cancer, 16 of intercurrent diseases and three because of treatment-related events. Clinical factors with a significant impact on the oncologic outcome were T- and FIGO-stage on CSS ($p = 0.006$ and $p = 0.017$). As shown in Figures 2C, 3C, both PLK3 expression ($p = 0.001$) and pT273 caspase 8 levels ($p < 0.001$) were associated with CSS on univariate analysis; this was true for both markers with regard to OS as well (PLK3, $p = 0.003$, Figure 2D; pT273 Caspase 8, $p < 0.001$, Figure 3D). On multivariate analyses, pT273 caspase 8 phosphorylation remained a significant independent predictor for both CSS ($p = 0.04$) and OS ($p < 0.001$) (Table 3).

TABLE 3 | Univariate and multivariate analyses of prognostic factors in patients with CSCC.

	Univariate <i>p</i> -value	Hazard ratio (HR)	Multivariate analyses		<i>p</i> -value
			95 % confidence interval (CI)		
			Lower	Upper	
CUMULATIVE INCIDENCE OF LOCAL FAILURE					
T-stage (T1-2/T3-4)	0.011	1.51	0.29	7.90	0.619
FIGO (Ia-IIb/IIIa-IVb)	0.006	5.07	0.62	41.23	0.129
CUMULATIVE INCIDENCE OF DISTANT FAILURE					
T-stage (T1-2/T3-4)	0.011	1.16	0.24	5.66	0.850
FIGO (Ia-IIb/IIIa-IVb)	0.008	8.40	1.19	64.75	0.041
PLK3 (WS ≤ 6/> 6)	0.009	1.87	0.57	6.12	0.299
pCasp 8 (≤/> median)	0.021	3.18	0.88	11.52	0.077
CANCER-SPECIFIC SURVIVAL					
T-stage (T1-2/T3-4)	0.006	2.15	0.056	8.24	0.263
FIGO (Ia-IIb/IIIa-IVb)	0.017	1.55	0.12	19.05	0.732
p16 (WS ≤ 6/> 6)	0.013	2.43	0.86	6.70	0.094
PLK3 (WS ≤ 6/>6)	0.001	2.89	0.94	8.83	0.062
pCasp 8 (≤/> median)	<0.001	9.12	1.10	75.14	0.040
OVERALL SURVIVAL					
PLK3 (WS ≤ 6/>6)	0.003	1.39	0.66	2.90	0.377
pCasp 8 (≤/> median)	<0.001	35.94	4.90	263.47	<0.001

Significant values are given in bold.

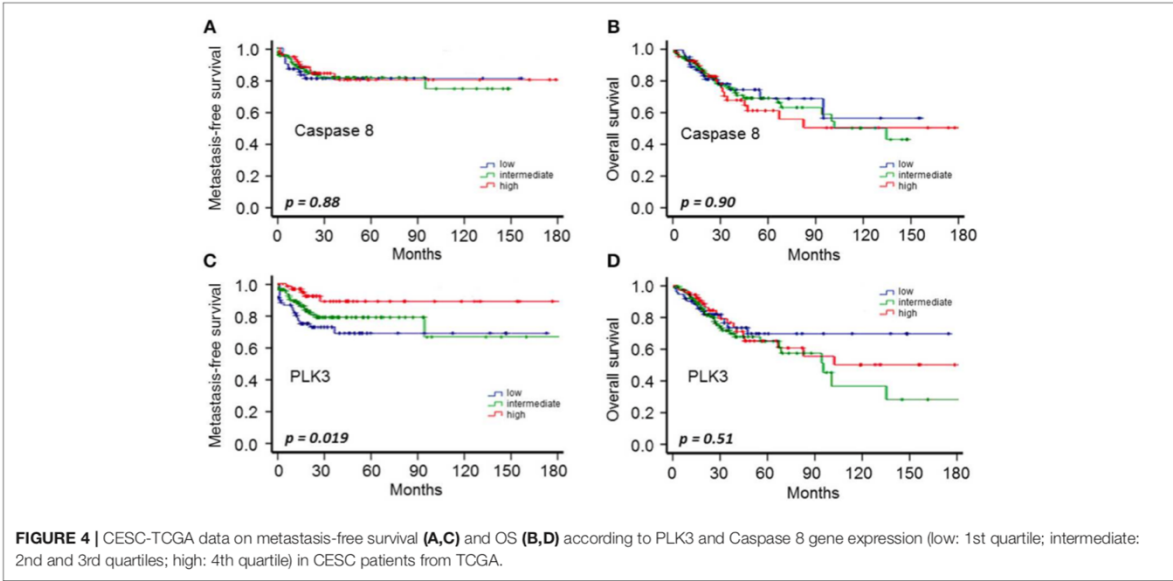
To validate these findings regarding the prognostic role of PLK3, we analyzed TCGA data from cervical cancer (CESC) patients and while there were no differences in metastasis and overall survival for Caspase 8 gene expression and OS for PLK3 gene expression, we found a significant association between low PLK3 gene expression and poor metastasis-free survival ($p = 0.019$) (Figure 4). Notably, patients with low expression levels of PLK3 indicated a significant ($p < 0.05$) association with resistance to EBRT and BT, but not to chemotherapy (Table 4). Caspase 8 mRNA expression had no impact on these properties.

TABLE 4 | Development of resistance according to PLK3 and Caspase 8 gene expression.

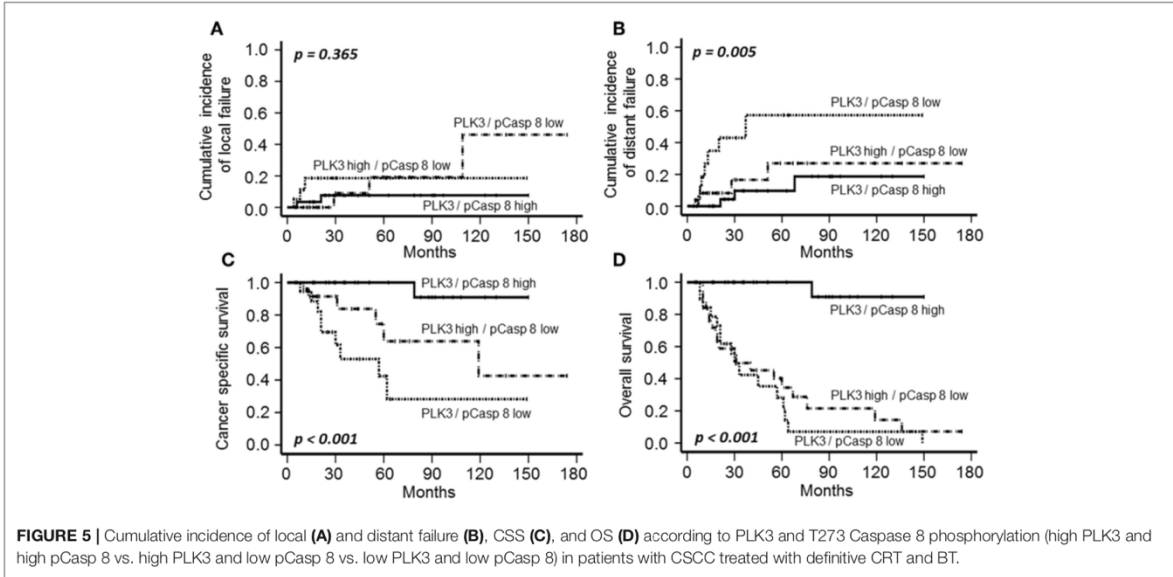
Patient resistance		<i>n</i>	CASP 8	PLK3
Chemoresistant	No	53	618 ± 32	475 ± 68
	Yes	24	597 ± 63	472 ± 53
Radioresistant	No	115	593 ± 23	515 ± 42
	Yes	31	606 ± 54	390 ± 36*
Brachyresistant	No	65	576 ± 30	488 ± 46
	Yes	19	646 ± 69	359 ± 43*

Average ± SEM; * $P < 0.05$.

Data represent RNA-Seq Expectation-Maximization (RSEM) normalized expression values.



Finally, given the direct correlation between PLK3 and pT273 Caspase 8 levels as shown above ($p = 0.009$), we combined these molecular features into a single variable. A combined PLK3 (>WS6) and pT273 caspase 8 (>Median) variable was significantly associated with disease-related outcome, including distant failure ($p = 0.005$), CSS ($p < 0.001$), and OS ($p < 0.001$) (Figure5). Multivariate analysis confirmed the independent predictive capacity of this combined variable for distant failure ($p = 0.041$) and CSS ($p = 0.003$) (Supplemental Table 1).



DISCUSSION

At present, only a few valid markers to predict outcome and survival of patients with uterine cervical cancer patients are available. In particular, FIGO stage, primary tumor size, parametrial, and lymph node invasion, as well as the quality and availability of BT are considered essential and critical parameters in predicting treatment success (33). Moreover, overexpression of a variety of molecular (bio)markers including among others epidermal growth factor receptor has been shown to be associated with poor response to CRT, poor disease-free and OS [reviewed in (34)]. The prognostic impact of PLK3 and its substrate pT273 Caspase 8, however, has not been evaluated in cervical cancer thus far to the best of our knowledge.

Notably, there are controversial reports on the prognostic impact of PLK3 in different tumor entities. Whereas, overexpression of PLK3 has been correlated with a non-favorable outcome in ovarian, breast, and prostate cancer (16–18), contradicting evidence exists in hepatocellular carcinoma, in lung cancer, in head and neck squamous cell and in anal squamous cell carcinoma, where PLK3 is considered to be a tumor suppressor and is correlated with an improved tumor control and survival (19–22). In line with these latter findings, we indicate a high expression of PLK3 to significantly correlate with improved distant tumor control and long-term survival (Figure 2) in a CSCC cohort treated with definitive CRT plus BT, supporting its proposed tumor suppressor activity.

The underlying basis for increased PLK3 expression being associated with improved patient survival remains elusive. It is reasonable to speculate that this relationship may be a function of DNA damage response and apoptosis induction (10, 23, 35). Concerning DNA damage response, PLK3 mediates a response pathway involving ATM as well as TP53 (35, 36). PLK3 further interacts with Chk2 (37) and mediates Cdc25 phosphatase function, linking oxidative stress and DNA damage to G1-S transition and cell cycle arrest (10). Furthermore, PLK3 directly impacts on DNA double-strand break repair by phosphorylation of CtIP in G1, which promotes the

resection of DNA double-strand breaks to initiate alternative repair pathways like MMEJ (24, 25). Additionally, PLK3 induction by transcription factor nuclear factor kappa B activity (37) indicates a pro-apoptotic activity of the kinase. Our group has previously demonstrated that T273 phosphorylation of Caspase 8 by PLK3 enhances its pro-apoptotic function, likely through the extrinsic apoptotic pathway (26).

Caspase 8 is involved in death induction signaling as well as necroptosis, extracellular matrix adhesion, and cell migration (38–42). With this in mind, Caspase 8 may also affect cancer cell metastatic potential and behavior. This is supported by our data demonstrating an inverse relationship between pT273 Caspase 8 levels (as well as PLK3 levels) with distant metastasis incidence, where lower pT273 Caspase 8 levels, for instance, predict increased risk of distant relapse.

CSCC is a prime example of a malignancy associated with a high prevalence of HPV DNA and surrogate marker p16^{INK4a} detection which are associated with an improved tumor remission and prognosis following RT or CRT (31, 32, 43). By applying a quantitative assessment in our patient cohort, we observed a significant impact of a high p16^{INK4a} expression on an improved local failure, CSS and a trend for OS, while distant failure was not correlated to p16^{INK4a} (Supplemental Figure 1) confirming the marker to display a positive prognosticator for increased local and tumor response. However, in contrast to a recent investigation in anal carcinoma treated with definitive RCT (22), we did neither recognize a significant correlation of p16^{INK4a} with PLK3 and a borderline significance with pT273 Caspase 8 expression (Table 2), nor did we observe a significant impact of PLK3 and pT273 Caspase 8 detection on the incidence of local failure (Figures 2, 3). There are different aspects to explain this discrepancy. First, in contrast to anal cancer local failure is a prescriptive/narrow and deliberately confined event in recurrent cervical cancer. Local recurrence is defined and restricted as a central or pelvic side wall recurrence, while relapsing at para-aortic or inguinal lymph nodes already is defined as metastatic disease. Second, as compared to anal carcinoma, treatment regimens in

cervical cancer differ by the addition of BT as an integral component to maximize the probability of achieving local control. Quality and availability of BT, however, are critical parameters in predicting treatment success (44).

Limitations of our study include caveats conventionally associated with a retrospective series involving a relatively modest pool of patients and few events. The retrospective design of our analysis is more susceptible to selection, misclassification, and therefore calculation bias. While confirmation of our findings in a larger cohort of patients is indicated, we endeavored to address this limitation in some respect through analysis of TCGA data as an independent validation cohort. CASP8 gene expression showed no clinical significance for OS or incidence of metastasis, not discarding that posttranscriptional modification of Caspase 8 might be more relevant clinically. PLK3 gene expression instead showed that, although not associated with OS, patients with low PLK3 expression levels presented higher incidence of metastasis. In addition, low PLK3 expression was correlated with resistance to EBRT and BT, but not chemotherapy, in cervical cancer patients, again confirming the association of PLK3 levels with prognosis.

In summary, our data support the notion that increased pre-treatment tumor levels of PLK3 and pT273 caspase 8 predict for superior clinical response among cervical cancer patients treated with definitive CRT plus BT. Beyond the association of these markers with clinical outcomes, these results may impact on therapeutic decisions. Existing PLK1 small molecular inhibitors may exhibit PLK3 cross-reactivity and therefore may also contribute to PLK3 inhibition (12). In light of the hypothesized tumor suppressive role of PLK3 in cervical cancer, we advise caution in future clinical investigations regarding the utility of PLK1 inhibitors in this setting.

DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the Supplementary Files.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MF, DM, SP-L, CR, KS, JvdG, MD, GC, and SB provided patient data and material. JO contributed to the sample-preparation and staining. MF, JO, FR, GC, and NT performed staining and microscopy. MF, DM, SP-L, MD, EF, CR, FR, and NT performed the statistics, analyzed, and interpreted the data. MF, DM, SP-L, KS, FR, EF, and NT drafted the manuscript and designed the figures with contributions from the other authors. All authors read and approved the final manuscript.

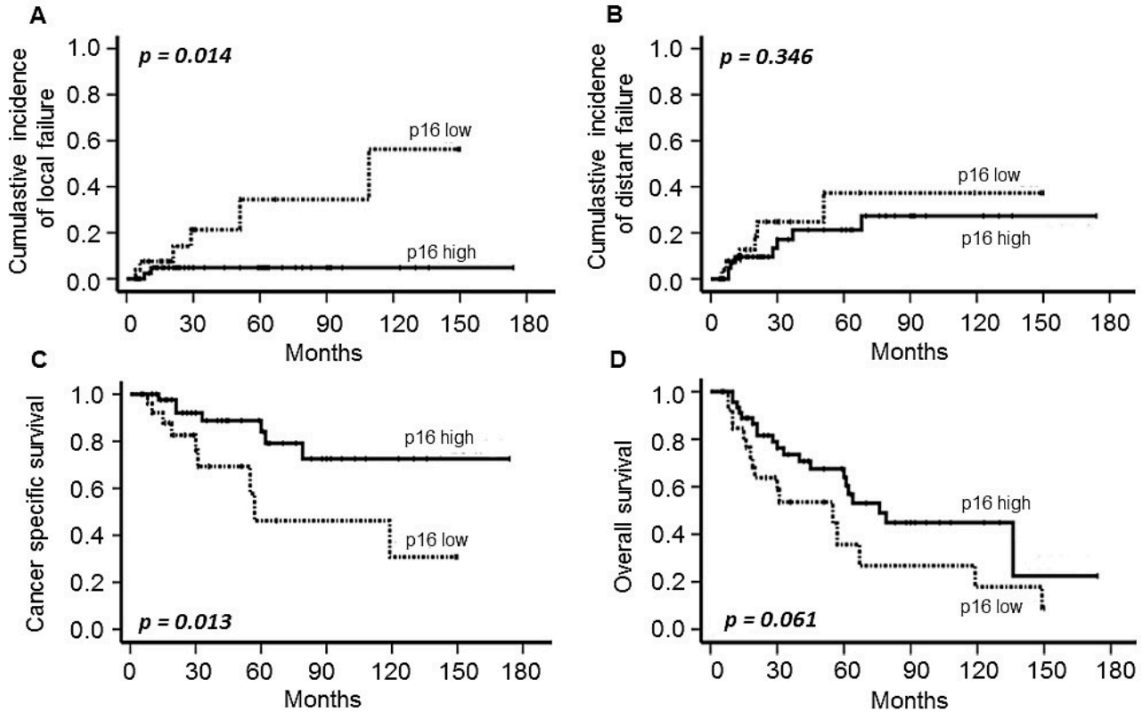
FUNDING

This work was funded by the European Union Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie Grant Agreement No. 798637 with SP-L. This work was further supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft, the Research Support Foundation, the Messer Stiftung, and the Deutsche Krebshilfe with KS.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for administrative support provided by Mrs. Stephanie Sheffield, Department of Radiotherapy and Oncology, Goethe University, Frankfurt am Main.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Suppl. Figure 1

Supplemental Table 1. Univariate and multivariate analyses of prognostic factors and combined PLK3/pT273 Caspase 8 variable in patients with CSCC.

	Univariate p-value	Hazard ratio (HR)	Multivariate analyses		p-value
			95 % Confidence interval (CI)		
			lower	upper	
Cumulative incidence of distant failure					
T-stage (T1-2/T3-4)	0.011	1.28	0.26	6.36	0.756
FIGO (Ia-IIb/IIIa-IVb)	0.008	7.09	0.89	56.06	0.063
combined PLK3/pCasp 8	0.005	4.28	1.06	17.30	0.041
Cancer-specific survival					
T-stage (T1-2/T3-4)	0.006	1.36	0.15	11.87	0.777
FIGO (Ia-IIb/IIIa-IVb)	0.017	2.88	0.64	12.99	0.167
p16 (WS ≤ 6/>6)	0.013	1.75	0.60	5.03	0.299
combined PLK3/pCasp 8	<0.001	23.20	2.87	187.09	0.003

DARSTELLUNG DES EIGENEN ANTEILS

Da es sich bei der hier vorliegenden Arbeit um eine publikationsbasierte Dissertation handelt, liegt dieser eine in einem Peer Review-Verfahren geprüfte und veröffentlichte Publikation zugrunde, die naturgemäß nicht durch eine einzelne Person entstanden und verfasst worden ist, sondern Produkt und Zusammenschritt gemeinsamer Arbeit darstellt.

Als Doktorand und Erstautor bietet sich die Möglichkeit in allen Entstehungsphasen einer Publikation mitzuwirken und diese mitzugestalten – hierbei handelte es sich zunächst um das Identifizieren eines geeigneten Patientenkollektivs, die Erfassung der benötigten Daten und Pflegen eines umfassenden Data-Sets. Später galt es das für den experimentellen Teil der Arbeit benötigte Biomaterial (Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe) teilweise zu beschaffen, sodass die angefertigten Mikrotomschnitte dann, zunächst unter Anleitung und später selbständig, mittels immunhistochemischer Methoden gefärbt und am Mikroskop ausgewertet werden konnten. Es folgte die statistische Auswertung der erfassten Daten und Marker, sowie die gemeinsame Evaluation und Interpretation der Ergebnisse. Durch ausgiebige Literaturrecherche konnte ein Entwurf des Manuskripts erstellt werden, welches unter stetiger Einbeziehung aller Beteiligten vervollständigt und ediert wurde. Während des Peer Review-Verfahrens wurden dann durch die Autoren noch kleinere Änderungen gemeinschaftlich an der finalen Arbeit vorgenommen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, et al. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. Robert Koch-Institut (2016).
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. (2015) 136:E359–86. doi: 10.1002/ijc.29210
3. Small W Jr, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: a global health crisis. *Cancer*. (2017) 123:2404–12. doi: 10.1002/cncr.30667
4. Potter R, Georg P, Dimopoulos JC, Grimm M, Berger D, Nesvacil N, et al. Clinical outcome of protocol based image (MRI) guided adaptive brachytherapy combined with 3D conformal radiotherapy with or without chemotherapy in patients with locally advanced cervical cancer. *Radiother Oncol*. (2011) 100:116–23. doi: 10.1016/j.radonc.2011.07.012
5. Sankaranarayanan R, Swaminathan R, Jayant K, Brenner H. An overview of cancer survival in Africa, Asia, the Caribbean and Central America: the case for investment in cancer health services. *IARC Sci Publ*. (2011) 257–91.
6. Jackson SE, Chester JD. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer*. (2015) 137:262–6. doi: 10.1002/ijc.28940
7. Holtrich U, Wolf G, Yuan J, Bereiter-Hahn J, Karn T, Weiler M, et al. Adhesion induced expression of the serine/threonine kinase Fnk in human macrophages. *Oncogene*. (2000) 19:4832–9. doi: 10.1038/sj.onc.1203845
8. Lee KS, Park JE, Asano S, Park CJ. Yeast polo-like kinases: functionally conserved multitask mitotic regulators. *Oncogene*. (2005) 24:217–29. doi: 10.1038/sj.onc.1208271
9. Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. (2006) 6:321–30. doi: 10.1038/nrc1841

10. Helmke C, Becker S, Strebhardt K. The role of Plk3 in oncogenesis. *Oncogene*. (2015). 35:135–47 doi: 10.1038/onc.2015.105
11. Lee KS, Grenfell TZ, Yarm FR, Erikson RL. Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1998) 95:9301–6. doi: 10.1073/pnas.95.16.9301
12. Strebhardt K. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*.(2010) 9:643–60. doi: 10.1038/nrd3184
13. Liu X. Targeting polo-like kinases: a promising therapeutic approach for cancer treatment. *Transl Oncol*. (2015) 8:185–95. doi: 10.1016/j.tranon.2015.03.010
14. Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*. (2009) 9:28–39. doi: 10.1038/nrc2559
15. Dohner H, Lubbert M, Fiedler W, Fouillard L, Haaland A, Brandwein JM, et al. Randomized, phase 2 trial of low-dose cytarabine with or without volasertib in AML patients not suitable for induction therapy. *Blood*. (2014) 124:1426–33. doi: 10.1182/blood-2014-03-560557
16. Weichert W, Denkert C, Schmidt M, Gekeler V, Wolf G, Kobel M, et al. Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. *Br J Cancer*. (2004) 90:815–21. doi: 10.1038/sj.bjc.6601610
17. Weichert W, Kristiansen G, Winzer KJ, Schmidt M, Gekeler V, Noske A, et al. Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications. *Virchows Arch*. (2005) 446:442–50. doi: 10.1007/s00428-005-1212-8
18. Lin C, Bai S, Du T, Lai Y, Chen X, Peng S, et al. Polo-like kinase 3 is associated with poor prognosis and regulates proliferation and metastasis in prostate cancer. *Cancer Manag Res*. (2019) 11:1517–24. doi: 10.2147/CMAR.S176762
19. Dai W, Li Y, Ouyang B, Pan H, Reissmann P, Li J, et al. PRK, a cell cycle gene localized to 8p21, is downregulated in head and neck cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. (2000) 27:332–6. doi: 10.1002/(SICI)1098-2264(200003)27:3<332::AID-GCC15>3.0.CO;2-K

20. Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S, Ehemann V, Staniscia T, Evert M, et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. (2010) 51:857–68. doi: 10.1002/hep.23467
21. Li B, Ouyang B, Pan H, Reissmann PT, Slamon DJ, Arceci R, et al. Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas. *J Biol Chem*. (1996) 271:19402–8. doi: 10.1074/jbc.271.32.19402
22. Rodel F, Martin D, Helmke C, Balermipas P, Fokas E, Wieland U, et al. Polo-like kinase 3 and phosphoT273 caspase-8 are associated with improved local tumor control and survival in patients with anal carcinoma treated with concomitant chemoradiotherapy. *Oncotarget*. (2016) 7:53339–49. doi: 10.18632/oncotarget.10801
23. Bahassi el M, Conn CW, Myer DL, Hennigan RF, McGowan CH, Sanchez Y, et al. Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways. *Oncogene*. (2002) 21:6633–40. doi: 10.1038/sj.onc.1205850
24. Barton O, Naumann SC, Diemer-Biehs R, Kunzel J, Steinlage M, Conrad S, et al. Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1. *J Cell Biol*. (2014) 206:877–94. doi: 10.1083/jcb.201401146
25. Makharashvili N, Paull TT. CtIP: a DNA damage response protein at the intersection of DNA metabolism. *DNA Repair (Amst)*. (2015) 32:75–81. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.04.016
26. Helmke C, Raab M, Rodel F, Matthes Y, Oellerich T, Mandal R, et al. Ligand stimulation of CD95 induces activation of Plk3 followed by phosphorylation of caspase-8. *Cell Res*. (2016) 26:914–34. doi: 10.1038/cr.2016.78
27. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. (2000) 407:770–6. doi: 10.1038/35037710
28. Rodel F, Wieland U, Fraunholz I, Kitz J, Rave-Frank M, Wolff HA, et al. Human papillomavirus DNA load and p16INK4a expression predict for local control in

- patients with anal squamous cell carcinoma treated with chemoradiotherapy. *Int J Cancer*. (2015) 136:278–88. doi: 10.1002/ijc.28979
29. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*. (2009) 105:103–4. doi: 10.1016/j.ijgo.2009.02.012
 30. Peña-Llopis S, Wan Y, Martinez ED. Unique epigenetic gene profiles define human breast cancers with poor prognosis. *Oncotarget*. (2016) 7:85819–31. doi: 10.18632/oncotarget.13334
 31. Li P, Tan Y, Zhu LX, Zhou LN, Zeng P, Liu Q, et al. Prognostic value of HPV DNA status in cervical cancer before treatment: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. (2017) 8:66352–9. doi: 10.18632/oncotarget.18558
 32. Fu HC, Chuang IC, Yang YC, Chuang PC, Lin H, Ou YC, et al. Low P16(INK4A) expression associated with high expression of cancer stem cell markers predicts poor prognosis in cervical cancer after radiotherapy. *Int J Mol Sci*. (2018) 19:E2541. doi: 10.3390/ijms19092541
 33. Biewenga P, van der Velden J, Mol BW, Stalpers LJ, Schilthuis MS, van der Steeg JW, et al. Validation of existing prognostic models in patients with early-stage cervical cancer. *Gynecol Oncol*. (2009) 115:277–84. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.08.006
 34. Gadducci A, Guerrieri ME, Greco C. Tissue biomarkers as prognostic variables of cervical cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. (2013) 86:104–29. doi: 10.1016/j.critrevonc.2012.09.003
 35. Xie S, Wu H, Wang Q, Cogswell JP, Husain I, Conn C, et al. Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway. *J Biol Chem*. (2001) 276:43305–12. doi: 10.1074/jbc.M106050200
 36. Jen KY, Cheung VG. Identification of novel p53 target genes in ionizing radiation response. *Cancer Res*. (2005) 65:7666–73. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1039

37. Li Z, Niu J, Uwagawa T, Peng B, Chiao PJ. Function of polo-like kinase 3 in NF- κ B-mediated proapoptotic response. *J Biol Chem.* (2005) 280:16843–50. doi: 10.1074/jbc.M410119200
38. Keller N, Ozmadenci D, Ichim G, Stupack D. Caspase-8 function, and phosphorylation, in cell migration. *Semin Cell Dev Biol.* (2018) 82:105–17. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.01.009
39. Finlay D, Vuori K. Novel noncatalytic role for caspase-8 in promoting SRC-mediated adhesion and Erk signaling in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* (2007) 67:11704–11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1906
40. Helfer B, Boswell BC, Finlay D, Cipres A, Vuori K, Bong Kang T, et al. Caspase-8 promotes cell motility and calpain activity under nonapoptotic conditions. *Cancer Res.* (2006) 66:4273–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4183
41. Barbero S, Mielgo A, Torres V, Teitz T, Shields DJ, Mikolon D, et al. Caspase-8 association with the focal adhesion complex promotes tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res.* (2009) 69:3755–63. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3937
42. Senft J, Helfer B, Frisch SM. Caspase-8 interacts with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase to regulate cell adhesion and motility. *Cancer Res.* (2007) 67:11505–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5755
43. Lindel K, Burri P, Studer HU, Altermatt HJ, Greiner RH, Gruber G. Human papillomavirus status in advanced cervical cancer: predictive and prognostic significance for curative radiation treatment. *Int J Gynecol Cancer.* (2005) 15:278–84. doi: 10.1136/ijgc-00009577-200503000-00015
44. Viswanathan AN, Thomadsen B. American Brachytherapy Society consensus guidelines for locally advanced carcinoma of the cervix. Part I: general principles. *Brachytherapy.* (2012) 11:33–46. doi: 10.1016/j.brachy.2011.07.003

45. Seifert, U. and S.J. Klug, [Early detection of cervical cancer in Germany : Evidence and implementation]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. (2014) 57(3): p. 294-301.
46. Walboomers JM et al., *MJ-TJ* (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. 1999. [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)10969896\(199909\)189:1%3C12::AID-PATH431%3E3.0.CO;2-F/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)10969896(199909)189:1%3C12::AID-PATH431%3E3.0.CO;2-F/full).
47. Schiffman, M., et al., Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. (2011) 103(5): p. 368-83.
48. Castellsague, X., F.X. Bosch, and N. Munoz, Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* (2002) 89(2): p. 191-9.
49. Moody CA, Cancer LL-NR, 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. (2010) <https://www.nature.com/articles/nrc2886>.
50. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, genes BS-V, 2010. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. (2010) <https://link.springer.com/article/10.1007/s11262-009-0412-8>.
51. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathology*. (2011);119(3):158-166. doi:10.1002/cncy.20140.
52. Rödel F, Martin D, Balermipas P, et al. Modulation of radiation sensitivity and antitumor immunity by viral pathogenic factors: Implications for radio-immunotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. (2019);1871(1):126-137. doi:10.1016/j.bbcan
53. Stupack DG. Caspase-8 as a therapeutic target in cancer. *Cancer Letters*. (2013);332(2):133-140. doi:10.1016/j.canlet
54. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *The Lancet*. (2019);393(10167):169-182. doi:10.1016/s0140-6736(18)32470-x.

55. Eifel PJ, Winter K, Morris M, Levenback C, Grigsby PW, Cooper J, Rotman M, Gershenson D, Mutch DG. Pelvic irradiation with concurrent chemotherapy versus pelvic and para-aortic irradiation for high-risk cervical cancer: an update of the radiation therapy oncology group trial (RTOG) 90-01. *The Womens Oncology Review*. (2004);4(2):119-120. doi:10.1080/1473340410001732451.
56. Umezawa R, Murakami N, Nakamura S, et al. Image-guided interstitial high-dose-rate brachytherapy for locally recurrent uterine cervical cancer: A single-institution study. *Brachytherapy*. (2018);17(2):368-376. doi:10.1016/j.brachy.2017.11.011.
57. Krebsgesellschaft D, Krebshilfe AD. Leitlinienprogramm Onkologie. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patienten mit Zervixkarzinom, Langversion 1.0, AWMF (2014).
58. Monk BJ, Sill M, Mcmeekin DS, et al. A randomized phase III trial of four cisplatin (CIS) containing doublet combinations in stage IVB, recurrent or persistent cervical carcinoma: a gynecologic oncology group (GOG) study. *Journal of Clinical Oncology*. (2008);26(15_suppl). doi:10.1200/jco.2008.26.15_suppl.lba5504.
59. Tewari KS, Sill MW, Penson RT, et al. Bevacizumab for advanced cervical cancer: final overall survival and adverse event analysis of a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial (Gynecologic Oncology Group 240). *The Lancet*. (2017);390(10103):1654-1663. doi:10.1016/s0140-6736(17)31607-0.
60. Chung HC, Ros W, Delord J-P, et al. Efficacy and Safety of Pembrolizumab in Previously Treated Advanced Cervical Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *Journal of Clinical Oncology*. (2019);37(17):1470-1478. doi:10.1200/jco.18.01265.
61. Ock CY, Keam B, Kim S, et al. Pan-cancer immunogenomic perspective on the tumor microenvironment based on PD-L1 and CD8 T-cell infiltration. (2016). <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/9/2261.short>.
62. Enwere EK, Kornaga EN, Dean M, et al. Expression of PD-L1 and presence of CD8-positive T cells in pre-treatment specimens of locally advanced cervical

cancer. *Modern Pathology*. (2017);30(4):577-586.
doi:10.1038/modpathol.2016.221.

63. Ho C, Kornaga E, Klimowicz A, et al. Expression of DNA damage response proteins in cervical cancer patients treated with radical chemoradiotherapy. *Gynecologic Oncology*. (2017);145(1):176-184. doi:10.1016/j.ygyno.2016.12.025.
64. The Cancer Genome Research Network. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*. (2017);543(7645):378-384. doi:10.1038/nature21386.

ANHANG

FIGO-Klassifikation Stand Januar 2019

Stadium I

Das Karzinom beschränkt sich rein auf die Cervix uteri

- IA Invasives Karzinom kann nur mikroskopisch diagnostiziert werden. Die maximale Invasionstiefe ist $< 5\text{mm}$.
 - IA1 Stromainvasion $< 3\text{mm}$
 - IA2 Stromainvasion zwischen $\geq 3\text{mm}$ und $< 5\text{mm}$
- IB Invasives Karzinom mit einer Stromainvasion $\geq 5\text{mm}$. Läsion ist strikt auf die Cervix uteri limitiert
 - IB1 Stromainvasion $\geq 5\text{mm}$ aber $< 2\text{cm}$
 - IB2 Karzinom $\geq 2\text{cm}$ aber $< 4\text{cm}$
 - IB3 Karzinom $\geq 4\text{cm}$

Stadium II

Das Karzinom hat den Uterus infiltriert, nicht jedoch das untere Drittel der Vagina oder die Beckenwand

- IIA Wachstum beschränkt auf die oberen Zweidrittel der Vagina ohne Invasion der Parametrien
 - IIA1 größte Ausdehnung $< 4\text{cm}$
 - IIA2 größte Ausdehnung $\geq 4\text{cm}$
- IIB Infiltration der Parametrien

Stadium III

Infiltration des unteren Drittels der Vagina und/oder der Beckenwand und/oder verursacht eine Hydronephrose und/oder befallene Lymphknoten

- IIIA Infiltration des unteren Drittels der Vagina
- IIIB Beckenwandinfiltration und/oder Hydronephrose
- IIIC jeglicher Lymphknotenbefall
 - IIIC1 lediglich pelviner Lymphknotenbefall
 - IIIC2 Para-aortaler Lymphknotenbefall

Stadium IV

- IVa Ausbreitung des Wachstums auf benachbarte Organe
- IVb Fernmetastasen

Anm.: Seit Januar 2019 wird der Befall para-aortaler Lymphknoten nicht mehr als Fernmetastasierung (M1) gewertet, sondern genau wie pelvine Lymphknoten als regionärer Lymphknotenbefall (N1a sowie N1b) definiert. Das Staging der hier untersuchten Patientinnen erfolgte nach FIGO-Klassifikation zum damaligem Zeitpunkt.

Quelle: Bhatla, N. , Berek, J. S., Cuello Fredes, M. , Denny, L. A., Grenman, S. , Karunaratne, K. , Kehoe, S. T., Konishi, I. , Olawaiye, A. B., Prat, J. and Sankaranarayanan, R. (2019), Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. Int J Gynecol Obstet, 145: 129-135.

METHODIK

Patientenkollektiv

Wir identifizierten eine Kohorte von 74 Patientinnen mit histologisch-gesichertem Zervixkarzinom der FIGO-Stadien IB bis IVB, die mittels kurativ intendierter Radiochemotherapie sowie HDR-Brachytherapie zwischen 1999 und 2017 am Universitätsklinikum der Goethe-Universität Frankfurt am Main behandelt wurden. Das mediane Alter bei Diagnosestellung betrug 59 Jahre (Spannweite: 31 bis 89 Jahre). Das *Staging* umfasste standardmäßig eine Computertomographie (CT) respektive Magnetresonanztomographie des Beckens und des Abdomens, eine röntgenologische Untersuchung des Thorax sowie Blutbild und Serumuntersuchung.

Therapie und *Follow-up*

Das Therapieregime umfasste eine externe Strahlentherapie (Teletherapie/external beam radiotherapy, EBRT) mittels Photonen (Elekta Linearbeschleuniger, Crowley, UK) gefolgt von einer intracavitären, interstitiellen oder kombinierten HDR-Brachytherapie. 22 Patientinnen wurden mittels konventioneller 4-Felder-Technik behandelt, während 3D-konformale sowie intensitätsmodulierte Strahlentherapie (intensity modulated radiation therapy, IMRT) bei 52 Patientinnen angewendet wurde. Die mediane Dosis, die mittels EBRT appliziert wurde, betrug 50,4Gy (Spannweite: 45,0 – 66,6Gy). Die Fraktionierung entsprach 1,8Gy bzw. 2Gy täglich an fünf Tagen der Woche. Die mediane HDR-BT Dosis betrug 40Gy (Spannweite: 4,0 – 48,0 Gy), sodass eine mediane biologische Äquivalenzdosis (EQD2) aus EBRT und HDR-BT von 106,2Gy generiert werden konnte (Spannweite: 54,2Gy – 121,6Gy). Patientinnen, bei denen die Therapie in vollem Umfang durchgeführt werden konnte, erreichten mindestens eine EQD2 von 78,1Gy.

Simultan zur Radiotherapie wurde in der Regel wöchentlich eine platin-haltige Chemotherapie (Cisplatin, 40mg/m²) verabreicht. Zwölf Patientinnen erhielten zusätzlich zwei Zyklen 5-Fluoruracil (5FU, 600mg/m² als Dauerinfusion) additiv zur

Cisplatin-haltigen Chemotherapie als *split course* in der ersten und fünften Behandlungswoche (Cisplatin, 20mg/m², täglich). Zwei Patientinnen erhielten Mitomycin (7mg/m²) bzw. Paclitaxel (25mg/m²) als Zytostatikum. Einer Patientin wurde eine Polychemotherapie basierend auf Cisplatin in Kombination mit Gemcitabine (750mg/m²) appliziert.

Nachsorgeuntersuchungen waren in den ersten 24 Monaten alle 3 Monate terminiert, danach in 6 monatlichen Abständen und beinhalteten eine gynäkologische Untersuchung sowie radiologische Bildgebung mittels CT resp. MRT.

Immunhistochemische Methoden und Assesment der PLK3-Expression und des pT273 Caspase 8 Signals

Um die Expression von PLK3 und das pT273Caspase 8-Signal zu quantifizieren wurde eine immunhistochemische Färbung des Biopsiegewebes von 74 Patientinnen mit histologisch gesichertem Zervixkarzinom durchgeführt.

Zu diesem Zweck erfolgte zunächst die Entparaffinierung und Rehydrierung der formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte (*formalin fixed paraffin embeded*, FFPE), sowie die hitzeinduzierte Epitopdesmaskierung (*heat induced epitope retrieval*, HIER). Anschließend erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mittels DAKO EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (K8000, DAKO, Hamburg, Deutschland) zur Minimierung unspezifischer Hintergrundfärbung. Für die Detektion der PLK3-Expression erfolgte nun die Inkubation mit einem Primärantikörper (anti-PLK3, Verdünnung: 1:50, ab33119, Abcam, Cambridge, UK) für 120min bei Raumtemperatur. Entsprechend für pT273 Caspase 8 (Primärantikörper stammt aus eigener Arbeitsgruppe) in einer Verdünnung von 1:200. Zur Amplifikation des Signals folgte die Inkubation mit Maus- bzw. Kaninchen-Sekundärantikörpern (SM802, DAKO, Hamburg, Deutschland) für 60min bei Raumtemperatur und Anwendung von *horseradish peroxidase* und Kopplung eines Dextran-Backbone Polymers. Zur Visualisierung der Immunkonjugate wurde 3'3-Diaminobenzidinlösung (DAB) als chromogenes

Substrat verwendet, welches nach Oxidation mit Wasserstoffperoxid zur Braunfärbung des Zielantigens führt. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Hematoxylin (Gill 3, Sigma Aldrich, München, Deutschland). Neben einer immunhistochemischen Färbung von PLK3 und pT273 Caspase 8 führten wir weitere Färbungen zur p16ink4a-Detektion durch.

Zur Quantifizierung der PLK3-Expression wurde ein individuell-gewichteter Score errechnet, der das Produkt aus dem Anteil PLK3-positiver Tumorzellen (1: 0 – 25%, 2: 26 – 50%, 3: 51 – 75%, 4: 76 – 100%) und der Intensität der Färbung (1: schwach, 2: moderat, 3: intensiv) darstellt. Dieser Wert wurde dann dichotomisiert, wobei ≤ 6 als schwache PLK3-Expression und Werte > 6 als hohe PLK3-Expression gewertet wurden. Die Phosphorylierungsrate von Caspase 8 wurde anhand der Anzahl positiver Tumorzellen durch die Gesamtzahl an Tumorzellen mal 100 ermittelt. Als *cut-off* wurde der Median des errechneten Wertes gewählt.

Statistische Analysen

Auswertung und Evaluation betreffend wurde zunächst der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt, um die erfassten Daten (histopathologische Charakteristika, PLK3-Expression, pT273 Caspase 8 Signal) auf eine Korrelation hin zu untersuchen. Zur Durchführung der uni- und multivariaten Überlebenszeitanalysen wurde die Kaplan-Meier-Methode, der log-rank-Test und die Cox-Regression angewendet. Lokale Kontrolle wurde dazu als Zeit von Therapiebeginn bis zum Zeitpunkt einer lokalen Tumorprogredienz oder eines Lokalrezidivs definiert. *Cancer-specific survival* (CSS) und *Overall survival* (OS) wurden als Zeit von Therapiebeginn bis zum Tod einer Patientin definiert. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Alle statistischen Analysen wurden mit IBM SPSS Version 25 (IBM, Ehningen, Deutschland) ausgeführt.

The Cancer Genome Atlas Project TCGA Data-set

Im Rahmen des *Cancer Genome Atlas Projects* (TCGA) wurde das Genom von 228 Zervixkarzinomen sequenziert und auf Aberrationen, Amplifikationen und Mutationen untersucht. Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung (*RNA-Seq Expectation-Maximization*, RSEM) und die damit assoziierten klinischen Daten wurden zur Validierung der hier dargelegten Resultate gedownloadet und verglichen (<https://portal.gdc.cancer.gov>). Die Genexpression wurde dann in Quartilen stratifiziert, wobei die erste Quartile niedrige, die zweite und dritte Quartile intermediäre und die vierte Quartile eine hohe Genexpression repräsentiert. Die primären Endpunkte wurden Zeitpunkt des Todes bzw. als das letzte Follow-up-Datum definiert. Verglichen wurde dann Progress versus *complete response* und als Strahlenresistenz (EBRT, BT) oder Chemoresistenz gewertet.

Darüber hinaus wurden weitere Gewebeschnitte für p16 und CD8-positive Lymphozyten gefärbt und ausgewertet. Die Ergebnisse sind nur teilweise oder nicht in diese Publikation mit eingeflossen.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Association of Polo-Like Kinase 3 and PhosphoT273 Caspase 8 Levels With Disease-Related Outcomes Among Cervical Squamous Cell Carcinoma Patients Treated With Chemoradiation and Brachytherapy

in der Klinik für Strahlentherapie unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. med. Dr. habil. Nikolaos Tselis mit Unterstützung durch Prof. Dr. rer. nat. Franz Rödel ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Fleischmann M, Martin D, Peña-Llopis S, Oppermann J, von der Grün J, Diefenhardt M, Chatzikonstantinou G, Fokas E, Rödel C, Strebhardt K, Becker S, Rödel F and Tselis N (2019) Association of Polo-Like Kinase 3 and PhosphoT273 Caspase 8 Levels With Disease-Related Outcomes Among Cervical Squamous Cell Carcinoma Patients Treated With Chemoradiation and Brachytherapy. *Front. Oncol.* 2019; 9:742

(Ort, Datum)

(Unterschrift)