

## **Protokol CIRRO IP13**

Molekylære biomarkørers (HPV, P16, KRAS, EGFR, Ki67, YKL-40 og lymfocytmarkører) korrelation med behandlingsrespons, sygdomsfri overlevelse og overlevelse for patienter med analcancer.

Godkendt af Den Videnskabetiske Komité for region Hovedstaden (journal nr. H-3-2010-068)  
Godkendt af datatilsynet (journal nr. 750.24-31)

Onkologisk afdeling R  
Herlev Universitetshospital  
Herlev Ringvej 75  
2730 Herlev  
Tlf. 44884488

**Version 3**  
**31. august 2010**

## **Protokol organisation:**

### Investigator

Klinisk assistent Eva Serup-Hansen  
Onkologisk afdeling R  
Herlev Universitetshospital

### Co-investigator

Overlæge Poul Geertsen  
Onkologisk afdeling R  
Herlev Universitetshospital

Overlæge Hanne Havsteen  
Onkologisk afdeling R  
Herlev Universitetshospital

Overlæge, professor Inge Marie Svane  
Onkologisk afdeling R  
Herlev Universitetshospital

Overlæge Dorte Linnemann  
Patologiafdelingen  
Herlev Universitetshospital

## 1. Undersøgelsens mål

**1.1** At undersøge om der er en sammenhæng mellem ekspresionen af forskellige markører (HPV (6/11, 16/18, 31/33/51), P16, KRAS, EGFR, Ki67, YKL-40 og immuncellemarkører (CD3, CD4, CD8, CD56, CD68)) og behandlingsrespons, sygdomsfri overlevelse (disease-free survival, DFS), og overlevelse (overall survival, OS) for patienter med analcancer.

## 2. Baggrund

I Danmark diagnosticeres ca. 30.000 nye tilfælde med cancer årligt (non-melanom hudkræft ej medregnet). Heraf udgør ca. 4600 tilfælde kræft i gastrointestinalkanalen, hovedparten lokaliseret i tyktarmen. En meget lille del af de gastrointestinale cancers er anal cancer, hvoraf der diagnosticeres ca. 80-100 patienter årligt ca. 2/3 blandt kvinder. Analcancer opstår i analkanalen (hyppigst) eller i den anale margin. Histologisk set er hovedparten planocellulære karcinomer efterfulgt af basaloide også kaldet transitionale eller kloacogene karcinomer.

Årsagen til analcancer er ikke helt kendt, men følgende faktorer/tilstande øger risikoen:

- Infektion med HPV<sup>1;2</sup>
- Infektion med HIV-virus og AIDS<sup>3;4</sup>
- Rygning<sup>5;6</sup>
- Mandlig homoseksualitet<sup>5</sup>
- > eller = 15 sexual partnere gennem livet<sup>5</sup>
- Høj alder<sup>7</sup>
- Hos kvinder: tidligere in situ eller invasiv cervixcancer<sup>8</sup>

De vigtigste prognostiske faktorer for overlevelse efter onkologisk behandling er tumorstørrelse<sup>9;10</sup> og lymfeknudestatus<sup>10;11</sup>. Et studie af Peiffert et al<sup>9</sup> viste 5 års overlevelsen var 94 % for T1-tumorer (tumor ≤ 2 cm i diameter), 79 % for T2 tumorer (tumor > 2 cm og ≤ 5 cm i diameter), 53 % for T3 tumorer (tumor > 5 cm i diameter) og 19 % for T4 tumorer (tumor invasion i tilstødende organer fx vagina eller blæren). Desuden viste multivariat analyse at tumorstørrelse > 4 cm og lymfeknudeinvolvering (spredning af primærtumor til lymfeknuder) var associeret med dårlig prognose. Et studie af Vuong et al<sup>10</sup> fandt også at højt tumorstadium og lymfeknudeinvolvering var associeret med dårlig prognose mens et studie af Bartelink et al<sup>11</sup> fandt at lymfeknudeinvolvering var associeret med dårlig prognose.

En undersøgelse viste foruden tumorstørrelse og lymfeknudestatus at mænd har en dårligere overlevelse end kvinder<sup>12</sup>.

Høj ekspresion af p53 er i et studie fundet signifikant associeret med nedsat lokalkontrol efter onkologisk behandling<sup>13</sup> mens et andet studie kun kunne vise en insignifikant trend for samme undersøgelse<sup>14</sup>.

I perioden 2000-2009 har onkologisk afdeling på Herlev Universitetshospital behandlet ca. 230 patienter med analcancer. De har fået behandling enten i form af operation (meget få), strålebehandling alene eller en kombination af kemoterapi og strålebehandling. Fra disse 230 patienter foreligger kliniske data og biopsimateriale, sidstnævnte ønsker vi at undersøge for HPV (6/11, 16/18, 31/33/51), P16, KRAS, EGFR, Ki67, YKL-40 og immuncellemarkører (CD3, CD4, CD8, CD56 og CD68).

Markørerne deles i 3 undergrupper:

1. HPV og P16
2. EGFR og KRAS
3. YKL-40 og immuncellemarkører

Denne opdeling idet følgende ønskes undersøgt: Hvilken betydning har HPV-infektion for sygdomsforløbet? Hvilken betydning har mutationer i KRAS og EGFR og proliferationsmarkøren

Ki67 for sygdomsforløbet? Hvilken betydning har det inflammatoriske/immunologiske respons for sygdomsforløbet?

### 2.1. HPV (human papillomavirus).

Der findes ca. 200 forskellige typer HPV, hvoraf en meget lille del kaldes ”højrisiko” (inkluderende type 16, 18, 31, 45) da disse kan forårsage cancer bl.a. analcancer, cervixcancer, vulvacancer, peniscancer<sup>2</sup> lungecancer<sup>15;16</sup> og oropharynxcancer<sup>17</sup>.

Man ved fra undersøgelse af biopsimateriale fra patienter med analcancer i DK og Sverige, at en meget stor del af tumorerne er positive for de typer af HPV, som er associeret med høj risiko for cervixcancer (90 % af tumorerne hos kvinder, 100 % af tumorerne hos homoseksuelle mænd og 58 % af tumorerne hos mænd)<sup>7</sup>. En anden undersøgelse fra Danmark/Sverige viste at 84 % af tumorerne hos patienter med analcancer var positive for højrisiko HPV specielt HPV-16, fordelt således at 89 % af analtumorerne hos kvinder var positive for højrisiko HPV, hvorimod kun 65 % af analtumorerne hos mænd var positive for højrisiko HPV.<sup>18</sup>.

HPV associerede cancere har ofte en viral sekvens integreret i cellens DNA. Nogle af de HPV ”tidlige” gener fx E6 og E7 er kendt for at virke som oncogener som fremmer tumorvækst og malign transformation. E6 og E7 proteinet bidrager til genetisk instabilitet gennem deres inaktivering af henholdsvis p53 og retinoblastom proteinet. E6 proteinet danner et kompleks med et cellulært protein, det E6 associerede protein, som bindes til p53. Den efterfølgende proteolytiske degradering af p53 resulterer i svigt af enten stop i cellecyklus eller apoptose. E7 proteinet bindes til retinoblastom proteinet resulterende i øget proliferation og risiko for genetisk skade.

Vi håber med vores undersøgelse af de 120 biopsier for HPV 6/11, 16/18, 31/33/51 at kunne identificere, om der er en sammenhæng mellem førnævnte typer af HPV og sygdomsfri overlevelse (disease free survival).

### 2.2. P16 (INK4a).

P16 er en cyclin-afhængig kinase-4 inhibitor og et tumorsupressor gen. P16 er en integreret komponent i den retinoblastom protein-medierede kontrol af G1-S overgangsfasen og udøver dets funktion ved at hæmme aktiviteten af de cyclin-afhængige kinaser (CDK4 og 6) som fosforilerer retinoblastom proteinet. Tab af p16 funktion fremmer G1/S progression og er associeret med mitogen-afhængig celle proliferation. Selve genet for p16 er locus 9p21, dette gen koder også for tumorsupressor generne p14 (ARF) og p15 (INK4b). For patienter med familiær melanom har man vist tab af p16 funktionen og man mener at det spiller en vigtig rolle i carcinogenesen<sup>19</sup>. For andre cancertyper er der derimod vist stærk p16 overekspression bl.a. adenocarcinomer i ventriklen<sup>20</sup>, forskellige neuroendocrine lungetumorer incl. carcinoider, storcellet neuroendokrint carcinom og småcellet carcinom<sup>21;21</sup> samt planocellulære og adenocarcinomer i lungerne<sup>22</sup>. For cervix uteri cancer har man også fundet en stor del af tumorerne positive for p16 og i den diagnostiske setting har bl.a. et studie vist at diffus positivitet for p16 kan anses som et surrogat for tilstedeværelsen af high-risk HPV<sup>23</sup>. Der foreligger et studie med 30 patienter med analcancer hvor man har fundet at p16 ikke er korreleret med DFS (disease-free survival)<sup>24</sup>.

### 2.3. KRAS.

KRAS er en af de hyppigst aktiverede oncogener. 17-25 % af alle humane tumorer har en aktiveret mutation i genet. KRAS er et guanin nucleotid (GDP/GTP)-bindende protein som omdanner GTP til GDP og fungerer som en selv-inaktiverende signaltransducer. Normal (vildtype) KRAS kan blive kortvarigt aktiveret af signaler fra cellens overfladereceptorer som fremmer udvekslingen af bunden GDP for GTP. At aktiveringen forbliver kortvarig er sikret ved en selvregulerende proces hvor KRAS hydrolyserer GTP og dermed ”slukker” sig selv. Enkelte punktmutationer i KRAS oncogenet resulterer i aminosyresubstitutioner (oftest codon 12, 13 eller 61)

og dermed proteiner med stærkt reduceret GTP'ase aktivitet. Muterede KRAS proteiner er derfor låst i en konstant aktiveret GTP-bunden tilstand.

KRAS mutationer er fundet i stort antal i coloncancer<sup>25</sup>, pancreascancer<sup>26</sup> og lungecancer<sup>27</sup>. For dissemineret coloncancer har studier vist, at tumorer med den muterede form af KRAS ikke responderer så godt på behandling med kemoterapi og Erbitux som vildtypen<sup>28;29</sup>

Kun få og små studier har undersøgt KRAS status i analcancer og korreleret det med kliniske data<sup>30</sup>.

## 2.4. EGFR.

Den epidermale vækst faktor receptor (EGFR) er en central transmembranøs vækst faktor receptor, som er almindelig forekommende i mange væv. Molekylet har tyrosin kinase aktivitet som interagerer med forskellige ligander og aktiverer forskellige intracellulære veje. EGFR er opreguleret i mange tumorer, specielt planocellulære tumorer (hoved og hals, lunge, cervix uteri). Ved at hæmme EGFR håber man, at kunne hæmme væksten af tumor. Ved ikke små-cellet lungecancer behandlet med EGFR-inhibitoren Tarceva er der næsten udelukkende fundet respons hos aldrig rygere, og man mener, at rygning kan inducere en mutation i EGFR, der forårsager denne forskel. EGFR overekspression er relateret til accelereret tumorcelle repopulation under fraktioneret stråleterapi og dermed resistens overfor strålebehandling<sup>31</sup>. Der er indtil videre kun udført få små studier, hvor man har undersøgt ekspressionen af EGFR hos patienter med analcancer og korreleret det med kliniske data.

## 2.5. Ki67.

Ki67 er et protein som er associeret med cellens prolifération. Endvidere er proteinet også associeret med ribosomal RNA transskription. Gennem cellens interfase findes Ki67 antigenet udelukkende i cellens nucleus mens det i mitosen flyttes til overfladen af kromosomerne. Ki-67 proteinet er til stede i alle de aktive faser af cellecyklus (G1, S, G2 og mitosen) men findes ikke i celler som er i G0 fasen. Derfor er Ki67 er god markør mhp at bestemme vækstfraktionen af en given cellepopulation. For mammacancer<sup>32;33</sup> har Ki67 vist sig at være en prognostisk markør for overlevelse idet der er vist kortere overlevelse for patienter med positiv Ki67. Der foreligger et studie med 30 patienter med analcancer, hvor man har fundet at Ki67 er associeret med DSF (disease-free survival)<sup>24</sup>

## 2.6. YKL-40.

YKL-40 dannes af flere forskellige celletyper: makrofager i områder med inflammation, cancer celler, neutrofile granulocytter, bruskceller og glatte muskelceller i kar. YKL-40 gen ekspressionen er øget i mange cancertyper, men funktionen ved cancersygdomme er ukendt. YKL-40 spiller måske en rolle for cancercellens prolifération og overlevelse, angiogenese, og metastasering/invasiv vækst. In vitro studier af en glioblastom cellelinie har vist øget YKL-40 produktion ved stress påvirkninger f.eks. hypoxi, kemoterapi og strålebehandling.

Høj YKL-40 protein ekspression i glioblastom biopsier er relateret til dårligt respons på strålebehandling og hurtig sygdomsprogression<sup>34</sup>. En høj serum YKL-40 (sammenlignet med raske) er relateret til kort tid til sygdomsprogression og død hos patienter med kolorektalcancer<sup>35</sup>, mammecancer<sup>36</sup>, småcellet lungecancer<sup>37</sup>, ovariecancer<sup>38;39</sup>, hoved-halscancer<sup>40</sup>, og malignt melanom<sup>41;42</sup>.

Vedrørende analcancer er der et studie med 34 patienter hvor man fundet at ekspressionen af YKL-40 er associeret med kortere overlevelse og sygdomsfri overlevelse<sup>36;43</sup>

## 2.7. Immuncellemarkører.

Lymfocytter (CD3), Cytotoksiske T-celler (CD8), T-hjælperceller/T-reg (CD4), NK (natural killer) celler (CD56) og makrofager (CD68) udgør en del af immunresponset mod fremmede celler fx tumorceller. Tumorinfiltrerende lymfocytter findes i mange forskellige cancertyper og er blevet betragtet som en manifestation af værtens immunrespons mod cancerceller. Generelt set betragtes

cytotoksiske T-celler som prognostiske favorable mens T-hjælpercellen kan have den modsatte virkning idet T-hjælpercellen kan blokerer/hæmme virkningen af nogle de andre typer lymfocytter og derved forhindre at immunsystemet bekæmper cancercellerne. Flere studier har vist at tilstedeværelsen af mange tumorinfiltrerende CD8+ T-celler, NK celler eller CD3+ T-celler er associeret med en favorabel prognose i colorectalcancer<sup>44-46</sup>, ovariecancer<sup>47</sup>, pancreascancer<sup>48</sup> og oesofagus cancer<sup>49;50</sup>. Der foreligger imidlertid også studier som viser det modsatte. Et studie med patienter med EBV-associeret nasopharyngealt carcinom viste at tilstedeværelsen af mange granzym B/CD8+ er associeret med dårlig prognose<sup>51</sup>, denne observation kan måske forklares ved at de proapoptotiske veje er ødelagte pga. manglende aktivering af caspase 3<sup>52</sup>. Lignende resultater er observeret for renalcelle carcinom (øget antal tumorinfiltrerende CD4+ og CD8+ er associeret med dårlig prognose)<sup>53</sup>.

I et studie med patienter med oro- og hypopharynxcancer har man fundet at indflydelsen af tumor infiltrerende lymfocytter på prognosen måske er påvirket af typen af behandling og sygdomsstadie<sup>54</sup>.

Der foreligger et studie med 38 patienter med analcancer, hvor man viste at stort antal tumorinfiltrerende cytotoksiske T-celler var en signifikant negativ prognostisk faktor hvorimod hverken et lavt eller stort antal T-hjælperceller var signifikant<sup>55</sup>.

### **3. Undersøgelsens formål**

#### **3.1 Hypotese**

HPV (type 6, 11, 16, 18, 31, 33 og 51), P16, KRAS, EGFR, Ki67, YKL-40 og immuncellemarkører (CD3, CD4, CD8, CD56 og CD68) er markører for behandlingsrespons, sygdomsfri overlevelse (DFS) og overlevelse (OS) for patienter med analcancer.

#### **3.2 Formål**

Formålet med dette studie er at undersøge biopsimateriale fra 230 patienter diagnosticeret med planocellulær analcancer for HPV (type 6, 11, 16, 18, 31, 33 og 51), P16, KRAS, EGFR, Ki67, YKL-40 og immuncellemarkører (CD3, CD4, CD8, CD56 og CD68). mhp. hyppighed og gradering og sammenligne disse data med journaloplysninger vedrørende recidiv og sygdomsfri overlevelse.

### **4. Undersøgelsens design**

Retrospektiv opgørelse af biopsimateriale fra de ca. 230 patienter som siden 2000 og frem til januar 2010 har fået behandling for analcancer på onkologisk afdeling Herlev Hospital.

### **5. Kriterier for patientudvælgelse**

Histologisk eller cytologisk verificeret planocellulært karcinom i analkanalen eller den anale margin  
Klinisk stadium T1-T4/N0-3/M0-1

### **6. Biopsimateriale**

Undersøgelsen er retrospektivt, de biopsier vi ønsker at undersøge er arkivmateriale fra tidligere diagnostiske undersøgelser. Biopsierne opbevares på de patologi afdelinger/patologilaboratorier, hvor den primære diagnose er stillet. Biopsierne vil være dels knivbiopsier og dels almindelige biopsier. Restmaterialet som er tilbage efter at protokollens markører er målt returneres til det diagnostiske arkiv i patologi afdelingerne/patologilaboratorierne. Der vil ikke blive udtaget

yderligere materiale fra patienterne i forbindelse med protokollen. Protokollen kan betragtes som et registerforskningsprojekt med biologisk materiale.

## 7. Måling af markører

**7.1 HPV.** Parafinsnit af tumor vil blive undersøgt for 7 forskellige HPV typer: 6, 11, 16, 18, 31, 33 og 51 ved in situ hybridisering (FISH)

**7.2 P16.** På parafinsnit af tumor måles P16 ved immunhistokemisk undersøgelse med antistof JC8 som binder sig til P16.

**7.3 KRAS.** Fra parafinsnit af tumor oprenses DNA, som vi undersøger for mutationer med PCR.

**7.4 EGFR.** Fra parafinsnit af tumor oprenses DNA, som vi undersøger for mutationer med PCR.

**7.5 Ki67.** På parafinsnit af tumor måles Ki67 ved immunhistokemisk undersøgelse med antistof MIB-1 som binder sig til Ki67.

**7.6 YKL-40.** På parafinsnit af tumor måles YKL-40 ved immunhistokemisk undersøgelse og ELISA.

**7.7 Immuncellemarkører.** På parafinsnit af tumor måles immuncellemarkørerne vha. immunhistokemiske undersøgelser CD3:lymfocytter, CD4: T-hjælper celler, CD8: cytotoksiske T-celler, CD56: NK celler og CD68: makrofager.

## 8. Effektmål

Ekpressionen af HPV, P16, KRAS, EGFR, Ki67 og immuncellemarkører vil blive sammenlignet med kliniske data i form af journalmateriale, og der vil blive foretaget statistiske undersøgelser om hvorvidt førnævnte markører har betydning for: behandlingsrespons, sygdomsfri overlevelse (disease free survival (DSF)) og overlevelse (overall survival (OS)).

## 9. Statistik

Vi forventer at analysere ca. 230 biopsier og korrelere data herfra med patientoplysninger i form af journalmateriale. Vi har valgt at inddele markørerne i følgende 3 grupper:

1. HPV og P16
2. EGFR og KRAS
3. YKL-40 og immuncellemarkører

Der vil blive udført statistiske undersøgelser på hver af de 3 grupper i form af multipel logistisk regressions analyser mhp at identificere hvilke variabler der prædikerer behandlingsrespons, sygdomsfri overlevelse (disease free survival (DSF)) og overlevelse (overall survival (OS)).

## **10. Datatilsynet og økonomi**

Projektet er anmeldt til datatilsynet via Herlev Hospital, Region Hovedstaden, Koncern IT og oplysninger vedrørende forsøgspersoner beskyttes i henhold til lov om behandling af persondata (persondataloven).

Projektet er initieret af overlæge Hanne Havsteen, onkologisk afdeling R, Herlev Hospital.

Projektet er støttet af The Lundbeck Foundation Centre for Interventional Research in Radiation Oncology (CIRRO) med 880.000,- kr. Dette beløb går til løn af investigator Eva Serup-Hansen i samlet 22 måneder. Der vil blive søgt andre fonde til dækning af løn de resterende 14 måneder, som ph.d. studiet forventes at vare.

Udgifter i forbindelse med analyse af prøverne vil blive dækket af fondsmidler samt ved at udnytte huller i analysekittet brugt til rutinebrug på patologisk afdeling, Herlev Hospital.

## **11. Ethiske overvejelser**

Protokollen er anmeldt til Videnskabsetisk komite, region hovedstaden. Der ansøges om dispensation fra hovedregel om pligt til indhentelse af informeret samtykke fra forsøgspersonerne. Se venligst vedlagte følgebrev.

Anmodningen begrundes med, at de vævsprøver/biopsier vi undersøger i projektet, er arkivmateriale som tidligere er udtaget fra forsøgspersonerne. Der henvises til komitélovens §16 stk.3. Protokollen indebærer således ikke, at der udtages yderligere materiale fra forsøgspersonerne. Der er således ingen sundhedsmæssige risici eller andre belastninger for forsøgspersonerne.

Imidlertid er alle forsøgspersoner, som indgår i projektet, inkluderet i et follow-up forløb efter afsluttet onkologisk behandling. Her vil såvel positive som negative resultater fra nærværende projekt kunne inddrages i follow-up strategien, som forsøgspersonerne efterfølgende vil kunne drage nytte af.

På den baggrund vurderes der derfor, at det ikke er nødvendigt at informere de forsøgspersoner, der indgår i projektet.

En af fordelene ved et positivt udfald af projektet er, at prognosen for nye patienter med analcancer kan karakteriseres bedre for den enkelte patient og behandlingen tilrettelægges individuelt i henhold til de prognostiske markører. Man kunne forstille sig både en mere eller mindre intensiv behandlingsstrategi i fremtiden. Resultaterne af projektet vil kunne bidrage til bedre forståelse om sygdommens patogenese. Resultaterne såvel positive som negative kunne give ideer til fremtidig forskning, nye medicinske tiltag og forebyggelse.

## **12. Offentliggørelse**

Forsøgsresultaterne såvel positive som negative forventes at blive publiceret i internationalt videnskabeligt tidsskrift i henhold til Vancouver reglerne. Såfremt førnævnte publicering mod forventning ikke er mulig vil resultaterne forventes offentliggjort på conference. Forsøget vil desuden indgå i en offentlig tilgængelig ph.d. afhandling af klinisk assistent Eva Serup-Hansen. Klinisk assistent Eva Serup-Hansen vil være førsteforfatter, mens vejledere og samarbejdspartnere indgår som forfattere i et omfang og en rækkefølge, som afspejler deres deltagelse i projektet.

## Reference List

1. Monograph on Human Papillomaviruses. 90. 2007. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

Ref Type: Generic

2. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* 2006; **118**: 3030-3044.
3. Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000; **92**: 1500-1510.
4. Frisch M, Biggar RJ, Engels EA, Goedert JJ. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *JAMA* 2001; **285**: 1736-1745.
5. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG *et al.* Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* 2004; **101**: 270-280.
6. Tseng HF, Morgenstern H, Mack TM, Peters RK. Risk factors for anal cancer: results of a population-based case--control study. *Cancer Causes Control* 2003; **14**: 837-846.
7. Frisch M. On the etiology of anal squamous carcinoma. *Dan. Med. Bull.* 2002; **49**: 194-209.
8. Evans HS, Newnham A, Hodgson SV, Moller H. Second primary cancers after cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer in Southeast England. *Gynecol. Oncol.* 2003; **90**: 131-136.
9. Peiffert D, Bey P, Pernot M *et al.* Conservative treatment by irradiation of epidermoid cancers of the anal canal: prognostic factors of tumoral control and complications. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1997; **37**: 313-324.

10. Vuong T, Kopek N, Ducruet T *et al.* Conformal therapy improves the therapeutic index of patients with anal canal cancer treated with combined chemotherapy and external beam radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007; **67**: 1394-1400.
11. Bartelink H, Roelofsen F, Eschwege F *et al.* Concomitant radiotherapy and chemotherapy is superior to radiotherapy alone in the treatment of locally advanced anal cancer: results of a phase III randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Gastrointestinal Cooperative Groups. *J. Clin. Oncol.* 1997; **15**: 2040-2049.
12. Ajani JA, Winter KA, Gunderson LL *et al.* Fluorouracil, mitomycin, and radiotherapy vs fluorouracil, cisplatin, and radiotherapy for carcinoma of the anal canal: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; **299**: 1914-1921.
13. Wong CS, Tsao MS, Sharma V, Chapman WB, Pintilie M, Cummings BJ. Prognostic role of p53 protein expression in epidermoid carcinoma of the anal canal. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1999; **45**: 309-314.
14. Bonin SR, Pajak TF, Russell AH *et al.* Overexpression of p53 protein and outcome of patients treated with chemoradiation for carcinoma of the anal canal: a report of randomized trial RTOG 87-04. Radiation Therapy Oncology Group. *Cancer* 1999; **85**: 1226-1233.
15. Klein F, Amin Kotb WF, Petersen I. Incidence of human papilloma virus in lung cancer. *Lung Cancer* 2009; **65**: 13-18.
16. Rezazadeh A, Laber DA, Ghim SJ, Jenson AB, Kloecker G. The role of human papilloma virus in lung cancer: a review of the evidence. *Am. J. Med. Sci.* 2009; **338**: 64-67.
17. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R *et al.* Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2007; **356**: 1944-1956.

18. Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ *et al.* Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N. Engl. J. Med.* 1997; **337**: 1350-1358.
19. Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp. Cell Res.* 2001; **264**: 42-55.
20. Vo QN, Geradts J, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. CDKN2A promoter methylation in gastric adenocarcinomas: clinical variables. *Hum. Pathol.* 2002; **33**: 1200-1204.
21. Beasley MB, Lantuejoul S, Abbondanzo S *et al.* The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung. *Hum. Pathol.* 2003; **34**: 136-142.
22. Leversha MA, Fielding P, Watson S, Gosney JR, Field JK. Expression of p53, pRB, and p16 in lung tumours: a validation study on tissue microarrays. *J. Pathol.* 2003; **200**: 610-619.
23. O'Neill CJ, McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv. Anat. Pathol.* 2006; **13**: 8-15.
24. Ajani JA, Wang X, Izzo JG *et al.* Molecular Biomarkers Correlate with Disease-Free Survival in Patients with Anal Canal Carcinoma Treated with Chemoradiation. *Dig. Dis. Sci.* 2009.
25. Burner GC, Loeb LA. Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1989; **86**: 2403-2407.
26. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; **53**: 549-554.
27. Tam IY, Chung LP, Suen WS *et al.* Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin. Cancer Res.* 2006; **12**: 1647-1653.

28. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A *et al.* Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; **27**: 663-671.
29. Van CE, Kohne CH, Hitre E *et al.* Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2009; **360**: 1408-1417.
30. Zampino MG, Magni E, Sonzogni A, Renne G. K-ras status in squamous cell anal carcinoma (SCC): it's time for target-oriented treatment? *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2009; **65**: 197-199.
31. Riesterer O, Milas L, Ang KK. Use of molecular biomarkers for predicting the response to radiotherapy with or without chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2007; **25**: 4075-4083.
32. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast* 2008; **17**: 323-334.
33. de AE, Cardoso F, de CG, Jr. *et al.* Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br. J. Cancer* 2007; **96**: 1504-1513.
34. Pelloski CE, Mahajan A, Maor M *et al.* YKL-40 expression is associated with poorer response to radiation and shorter overall survival in glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 2005; **11**: 3326-3334.
35. Cinton C, Johansen JS, Christensen IJ, Price PA, Sorensen S, Nielsen HJ. Serum YKL-40 and colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 1999; **79**: 1494-1499.
36. Johansen JS, Christensen IJ, Riisbro R *et al.* High serum YKL-40 levels in patients with primary breast cancer is related to short recurrence free survival. *Breast Cancer Res. Treat.* 2003; **80**: 15-21.

37. Johansen JS, Drivsholm L, Price PA, Christensen IJ. High serum YKL-40 level in patients with small cell lung cancer is related to early death. *Lung Cancer* 2004; **46**: 333-340.
38. Hogdall EV, Johansen JS, Kjaer SK *et al.* High plasma YKL-40 level in patients with ovarian cancer stage III is related to shorter survival. *Oncol. Rep.* 2003; **10**: 1535-1538.
39. Hogdall EV, Ringsholt M, Hogdall CK *et al.* YKL-40 tissue expression and plasma levels in patients with ovarian cancer. *BMC. Cancer* 2009; **9**: 8.
40. Roslind A, Johansen JS, Christensen IJ *et al.* High serum levels of YKL-40 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck are associated with short survival. *Int. J. Cancer* 2008; **122**: 857-863.
41. Schmidt H, Johansen JS, Gehl J, Geertsen PF, Fode K, von der MH. Elevated serum level of YKL-40 is an independent prognostic factor for poor survival in patients with metastatic melanoma. *Cancer* 2006; **106**: 1130-1139.
42. Schmidt H, Johansen JS, Sjoegren P *et al.* Serum YKL-40 predicts relapse-free and overall survival in patients with American Joint Committee on Cancer stage I and II melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2006; **24**: 798-804.
43. Castellano I, Mistrangelo M, Crudo V *et al.* YKL-40 expression in anal carcinoma predicts shorter overall and disease-free survival. *Histopathology* 2009; **55**: 238-240.
44. Menon AG, Janssen-van Rhijn CM, Morreau H *et al.* Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest* 2004; **84**: 493-501.
45. Prall F, Duhrkop T, Weirich V *et al.* Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Hum. Pathol.* 2004; **35**: 808-816.

46. Tachibana T, Onodera H, Tsuruyama T *et al.* Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2005; **11**: 7322-7327.
47. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D *et al.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003; **348**: 203-213.
48. Ryschich E, Notzel T, Hinz U *et al.* Control of T-cell-mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2005; **11**: 498-504.
49. Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 2001; **61**: 3932-3936.
50. Cho Y, Miyamoto M, Kato K *et al.* CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003; **63**: 1555-1559.
51. Oudejans JJ, Harijadi H, Kummer JA *et al.* High numbers of granzyme B/CD8-positive tumour-infiltrating lymphocytes in nasopharyngeal carcinoma biopsies predict rapid fatal outcome in patients treated with curative intent. *J. Pathol.* 2002; **198**: 468-475.
52. Oudejans JJ, Harijadi A, Cillessen SA *et al.* Absence of caspase 3 activation in neoplastic cells of nasopharyngeal carcinoma biopsies predicts rapid fatal outcome. *Mod. Pathol.* 2005; **18**: 877-885.
53. Igarashi T, Takahashi H, Tobe T *et al.* Effect of tumor-infiltrating lymphocyte subsets on prognosis and susceptibility to interferon therapy in patients with renal cell carcinoma. *Urol. Int.* 2002; **69**: 51-56.
54. Distel LV, Fickenscher R, Dietel K *et al.* Tumour infiltrating lymphocytes in squamous cell carcinoma of the oro- and hypopharynx: prognostic impact may depend on type of treatment and stage of disease. *Oral Oncol.* 2009; **45**: e167-e174.

55. Grabenbauer GG, Lahmer G, Distel L, Niedobitek G. Tumor-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2006; **12**: 3355-3360.