

NRAS und SMAD4 als Biomarker bei fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

Anna Remold

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

NRAS und SMAD4 als Biomarker bei fortgeschrittenem Pankreaskarzinom

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anna Remold
aus München
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter	Prof. Dr. med. Volker Heinemann
Mitberichterstatter	PD Dr. Jan D'Haese Prof. Dr. Julia Mayerle
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Michael Haas
Dekan	Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL
Tag der mündlichen Prüfung	12.07.2018

Gewidmet in Dankbarkeit meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Das Pankreaskarzinom.....	1
1.2	Notwendigkeit der Etablierung von Biomarkern beim PDAC	6
1.3	Mögliche Biomarker beim Pankreaskarzinom	8
1.3.1	Proteine der RAS-Familie.....	8
1.3.2	SMAD4.....	11
1.3.3	hENT1.....	13
1.3.4	SPARC.....	14
1.4	Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	15
2.	Patienten, Material und Methoden	16
2.1	Patienten	16
2.2	Durchführung der labortechnischen Untersuchungen	17
2.3	Geräte und Laborausstattung	18
2.4	Verbrauchsmaterial.....	19
2.5	Chemikalien und Reagenzien	20
2.6	Primer für NRAS.....	21
2.6.1	Primermaterial.....	21
2.6.2	Primersequenzen und untersuchte Genabschnitte	22
2.7	Gewinnung der DNA-Proben	23
2.8	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
2.8.1	Das Prinzip der PCR	25
2.8.2	Technische Durchführung der PCR.....	25
2.9	Pyrosequenzierung.....	27
2.9.1	Das Prinzip der Pyrosequenzierung	27
2.9.2	Auswertung des Pyrogramms	29
2.9.3	Technische Durchführung der Pyrosequenzierung.....	31
2.10	Immunhistochemisches Nachweisverfahren von SMAD4	32

2.11	Statistische Datenauswertung.....	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Patienten	35
3.2	Ergebnisse RAS	38
3.3	Ergebnisse SMAD4	39
3.3.1	Statistische Datenauswertung.....	39
3.3.2	Verteilung von SMAD4-negativen und SMAD-positiven Tumoren	39
3.3.3	Korrelation des SMAD4-Status mit klinischen Variablen.....	40
3.3.4	PFS und OS des gesamten Kollektivs	41
3.3.5	PFS und OS der nach Tumorherkunft gegliederten Subgruppen.....	43
3.3.6	PFS und OS der nach Chemotherapieschema gegliederten Subgruppen	43
3.3.7	Tabellarische Zusammenfassung medianes PFS und OS.....	46
4.	Diskussion.....	47
4.1	RAS.....	47
4.2	SMAD4	48
4.3	Personalisierte Therapie als Behandlungskonzept der Zukunft.....	51
5.	Zusammenfassung.....	52
6.	Literaturverzeichnis	53
7.	Danksagung	63
8.	Publikationen.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte- und Laborausstattung	18
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial	19
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien	20
Tabelle 4: Primer für NRAS	21
Tabelle 5: Mastermix für 24 PCR-Ansätze	25
Tabelle 6: PCR-Protokoll	26
Tabelle 7: Beadsmix für 24 Pyrosequenzierungsansätze	31
Tabelle 8: Primermix für 24 Pyrosequenzierungsansätze	31
Tabelle 9: Patientencharakteristik	35
Tabelle 10: Verteilung von SMAD4-negativen und SMAD4-positiven Tumoren	40
Tabelle 11: Korrelation des SMAD4-Status mit klinischen Variablen	41
Tabelle 12: Zusammenfassung medianes PFS in Monaten	46
Tabelle 13: Zusammenfassung medianes OS in Monaten	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell	2
Abbildung 2: MAP-Kinase-Kaskade.....	9
Abbildung 3: TGF- β 1-Signalweg	11
Abbildung 4: Primersequenzen NRAS Exon 2 (Codon 12, 13)	22
Abbildung 5: Primersequenzen NRAS Exon 3 (Codon 59, 61)	22
Abbildung 6: Primersequenzen NRAS Exon 4 (Codon 117)	22
Abbildung 7: Primersequenzen NRAS Exon 4 (Codon 146)	22
Abbildung 8: Resektionspräparat eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas	24
Abbildung 9: Pyrogramm NRAS Exon 2 (Codon 12, 13) Wildtyp	30
Abbildung 10: Pyrogramm NRAS Exon 3 (Codon 59, 61) Wildtyp	30
Abbildung 11: Pyrogramm NRAS Exon 4 (Codon 117) Wildtyp	30
Abbildung 12: Pyrogramm NRAS Exon 4 (Codon 146) Wildtyp	30
Abbildung 13: Immunhistochemisches Nachweisverfahren von SMAD4	33
Abbildung 14: Häufigste Metastasenlokalisationen.....	36
Abbildung 15: Palliative Erstlinienchemotherapie	37
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Schätzer für das PFS des gesamten Kollektivs ab Beginn der palliativen Therapie in Bezug auf den SMAD4-Status.....	42
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Schätzer für das OS des gesamten Kollektivs ab Beginn der palliativen Therapie in Bezug auf den SMAD4-Status.....	42
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Schätzer für das PFS der GEM Subgruppe ab Beginn der palliativen Therapie in Bezug auf den SMAD4-Status.....	44
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Schätzer für das PFS der Fluoropyrimidin-Subgruppe ab Beginn der palliativen Therapie in Bezug auf den SMAD4-Status	45
Abbildung 20: Kaplan-Meier-Schätzer für das OS der Fluoropyrimidin-Subgruppe ab Beginn der palliativen Therapie in Bezug auf den SMAD4-Status	45

Abkürzungsverzeichnis

95% CI: 95% Konfidenzintervall

A: Adenin

ADP: Adenosindiphosphat

AMP: Adenosinmonophosphat

APS: Adenosin-5'-Pyrophosphat

ATP: Adenosintriphosphat

C: Cytosin

dATP: Desoxyadenosintriphosphat

dATP α S: Desoxyadenosin-alpha-thio-triphosphat

dCTP: Desoxycytosintriphosphat

dGTP: Desoxyguanintriphosphat

DNA: Desoxyribonukleinsäure

dNDP: Desoxynukleotiddiphosphat

dNMP: Desoxynukleotidmonophosphat

dNTP: Dinukleotidtriphosphat

dTTP: Desoxythymintriphosphat

EGFR: Epidermal growth factor receptor

Ex: Exon

FFPE: formalin-fixed, paraffin-embedded

G: Guanin

GEM: Gemcitabin

GTPase: Guanosintriphosphatase

HE: Hämatoxylin-Eosin

hENT1: Human equilibrative nucleoside transporter

HR: Hazard Ratio

KPS: Karnofsky Performance Status

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

NRAS: Neuroblastoma ras viral oncogene homolog

OS: overall survival

PanIN: Pankreatische intraepitheliale Neoplasie

PCR: Polymerasekettenreaktion

PDAC: Pankreatisches duktales Adenokarzinom

PFS: progression free survival

PPi: Pyrophosphat

RAS: Rat sarcoma

rpm: rounds per minute

SPARC: Secreted protein acidic and rich in cysteine

T: Thymin

TGF- β 1: Transforming growth factor- β 1

UV: Ultraviolet

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist die vierthäufigste Ursache für den Krebstod [1]. Die geschätzte Zahl der weltweiten Neuerkrankungen im Jahr 2008 liegt bei 277.000. Sie entspricht damit nahezu der Zahl der geschätzten Todesfälle von 266.000 [2]. Trotz verbesserter Diagnostik und Therapiemöglichkeiten ist die 5-Jahres-Überlebensrate bezogen auf alle Tumorstadien mit 4% weiterhin erschreckend niedrig [3]. Das mittlere Erkrankungsalter für Männer beträgt 68 Jahre und für Frauen 70 Jahre [4]. Dabei weisen 53% der Patienten bei Diagnosestellung ein bereits metastasiertes Tumorstadium auf. Nur 9% der Tumoren sind auf das Pankreas beschränkt und 27% der Tumoren wachsen lokal infiltrierend [1].

Bei der Ätiologie des Pankreaskarzinoms spielen mehrere Risikofaktoren eine Rolle. Zu den gesicherten Risikofaktoren zählt das Rauchen. Es ist Ursache für 20-25% der Pankreaskarzinomfälle [5]. Darüber hinaus stellt eine positive Familienanamnese einen gesicherten Risikofaktor dar. Die häufigsten Keimzellmutationen befinden sich in den Genen von BRCA2, PALB2, CDKN2A, STK11, PRSS1 und ATM [3], [6]. Allerdings sind Keimzellmutationen nur in ca. 2-10% der Fälle beteiligt [7]. Trotz bislang ungeklärter Ätiologie gehen Diabetes mellitus und chronische Pankreatitiden mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einher. Auch der Konsum von rotem Fleisch, ein hoher Body-Mass-Index, Gallensteine sowie Infektionen mit Helicobacter Pylori gelten als auslösende Ursachen für das Pankreaskarzinom. Patienten, die nicht Blutgruppe 0 aufweisen, zeigen ebenfalls ein erhöhtes Erkrankungsrisiko [8], [9], [10]. Auf der anderen Seite werden protektive Effekte durch die Einnahme von Aspirin und Statinen beschrieben [11]. Dies gilt auch für die Einnahme von Metformin [12].

Das pankreatische duktales Adenokarzinom (PDAC) bildet den überwiegenden Teil der Karzinome des exokrinen Pankreas (>90%) [13] und geht vom Gangepithel aus. Klinisch und histopathologisch sind drei Vorläuferläsionen des PDAC bekannt: pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), muzinös zystische Neoplasie (MCN) und intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN). Die PanIN stellt die häufigste Vorläuferläsion dar und wird in drei Schweregrade unterteilt. Der Übergang von höhergradigen PanINs in ein PDAC erfolgt durch Überschreiten der Basalmembran [14].

Bereits in den Vorläuferläsionen wie der PanIN können zahlreiche somatische Genveränderungen gefunden werden. Es wird von einem Tumorprogressionsmodell ausgegangen, das mehrere sequenzielle Mutationen in unterschiedlichen Genen voraussetzt, bevor es zur Tumorgenese kommt. Es ist zu beobachten, dass das erstmalige Auftreten dieser Genveränderungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Tumorgenese erfolgt. So werden Mutationen im KRAS-Gen und im Onkogen HER2/neu bereits in frühen Stadien der Vorläuferläsionen gefunden, während eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16 erst später auftritt. Schlussendlich kommt es zur Ausschaltung der Tumorsuppressorgene p53, SMAD4 und BRCA2 [7], [15].

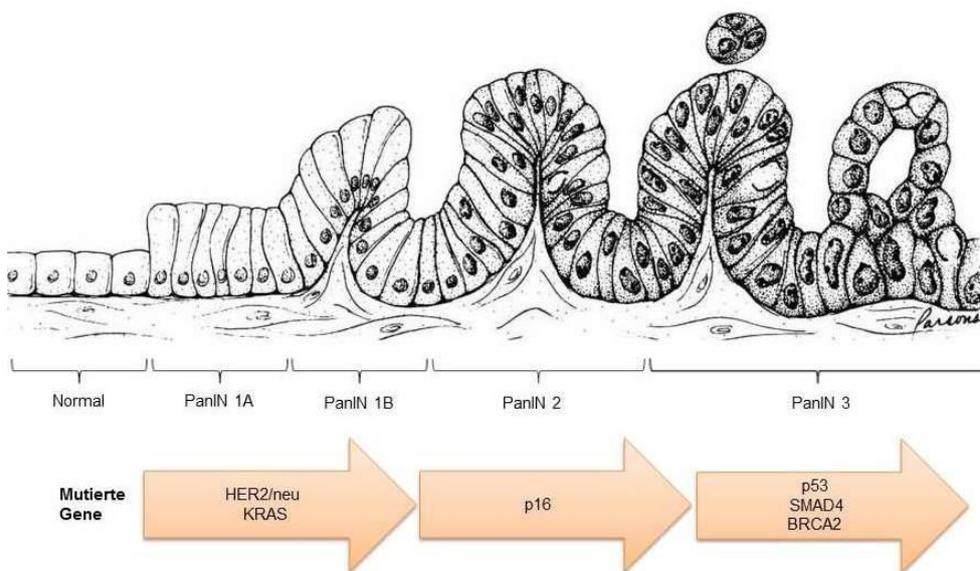


Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell, modifiziert nach Hruban et al., 2000 [15]

Der Zeitraum vom erstmaligen Auftreten genetischer Veränderungen bis zur Entwicklung von Tumorzellen beträgt oft mehr als 10 Jahre. Für die Entstehung von metastasierungsfähigen Zelllinien vergehen mindestens weitere 5 Jahre [16].

Das PDAC ist ein sehr heterogener Tumor, dem individuell sehr unterschiedliche Genveränderungen zugrunde liegen [17]. Jones et al. untersuchten 2008 mit Hilfe von Genomanalysen an 24 PDAC-Patientenproben insgesamt 20.661 verschiedene Gene. Sie stellten fest, dass die Proben im Schnitt 63 genetische Veränderungen in 12 verschiedenen Signaltransduktionswegen aufwiesen, bei denen es sich meistens um Punktmutationen handelte [18].

Die einzige Chance auf Heilung bietet die chirurgische Therapie. Aufgrund des oft schon weit fortgeschrittenen Tumorstadiums bei Diagnosestellung kann diese allerdings nur bei 15-20% der Patienten durchgeführt werden [3]. Zur Beurteilung der Resektabilität kann neben bildgebenden Verfahren auch eine explorative Laparoskopie durchgeführt werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach chirurgischer Resektion liegt bei ca. 20% [19].

Als klassisches operatives Verfahren bei Karzinomen im Pankreaskopfbereich steht die partielle Duodenopankreatektomie (Whipple-Operation) zur Verfügung. Sie besteht aus einer Resektion des Pankreaskopfes, der Gallenblase, des Gallenganges, des Duodenums sowie des distalen Magens und des Pylorus. Danach kommt es zu drei Anastomosen: Gastrojejunostomie, Hepaticojejunostomie und Pancreaticojejunostomie [20]. Alternativ kann eine pyloruserhaltende Dudenopankreatektomie durchgeführt werden, bei der der Magen und der erste Abschnitt des Duodenums erhalten bleiben [21]. Bei isoliertem Befall des Pankreasschwanzes bietet eine Pankreaslinksresektion eine mögliche chirurgische Therapieoption. Bei lokal weit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom kann eine totale Pankreatektomie diskutiert werden [19].

Anschließend steht die adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin (GEM) als kurative Therapieoption zur Verfügung. So konnte in der randomisierten klinischen CONKO-001-Studie gezeigt werden, dass sowohl das Gesamtüberleben (Hazard Ratio (HR)=0,76; 95% CI: 0,61-0,95; $p=0,01$) als auch das erkrankungsfreie Intervall (13,4 vs. 6,7 Monate; $p<0,001$) bei der Behandlung mit GEM im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant verlängert waren [22], [23].

Neoptolemos et al. konnten in der internationalen multizentrischen ESPAC-4-Studie zeigen, dass die adjuvante Kombination von GEM mit Capecitabin das Gesamtüberleben im Vergleich zu einer GEM-Monotherapie signifikant verlängert (28,0 vs. 25,5 Monate; HR=0,82; 95% CI: 0,68-0,98; $p=0,032$). Die Toxizität der beiden Studienarme unterschied sich nicht wesentlich. Somit könnte sich eine GEM/Capecitabin-Kombinationstherapie als neuer zukünftiger Standard in der adjuvanten Chemotherapie beim PDAC etablieren [24].

Eine neoadjuvante Chemotherapie bei lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, das nicht oder nur grenzwertig resektabel ist, kann in 30-40% der Fälle eine vollständige chirurgische Resektabilität ermöglichen. Das Gesamtüberleben nach der sich anschließenden chirurgischen Therapie ist mit dem eines primär resektablen Karzinoms vergleichbar. Für eine Radiochemotherapie im Vergleich zu einer Chemotherapie konnten bislang keine statistisch signifikanten Vorteile gezeigt werden [25].

Bei fehlender chirurgischer Resektabilität stellt die Behandlung mit dem Antimetaboliten GEM derzeit den Standard in der palliativen Chemotherapie dar [26]. In einer randomisierten klinischen Studie bei fortgeschrittenem Pankreaskarzinom konnten 1997 Burris et al. die Vorteile von GEM gegenüber dem bis dahin verwendeten 5-Fluoruracil zeigen. Der klinische Nutzen (clinical benefit) war deutlich besser (23,8% vs. 4,8%; $p=0,0022$) unter einer GEM-Therapie. Das mediane Überleben lag bei 5,65 vs. 4,41 Monaten ($p=0,0025$). Das 12-Monatsüberleben lag bei 18% für GEM im Vergleich zu 2% für 5-Fluoruracil [27].

In Metaanalysen wurden bislang zahlreiche Kombinationstherapien von GEM mit anderen Substanzen untersucht. Für Fluoropyrimidine wie Capecitabin und Platinanaloga wie Cisplatin und Oxaliplatin konnte kein statistisch signifikanter Überlebensvorteil gegenüber einer GEM-Monotherapie gezeigt werden [28], [29], [30]. Die Kombination von GEM mit Capecitabin wies zwar Vorteile hinsichtlich des objektiven Ansprechens (19,1% vs. 12,4%; $p=0,034$) und des progressionsfreien Überlebens ($HR=0,78$; $p=0,004$) auf, für das Gesamtüberleben zeigten sich jedoch nur marginale Unterschiede gegenüber einer GEM-Monotherapie (7,1 vs. 6,8 Monate; $HR=0,86$; $p=0,08$) [31].

Von Hoff et al. zeigten 2013 statistisch signifikante Vorteile für die Zugabe von Nab-Paclitaxel zu GEM. Sie verglichen die Studienarme GEM-Nab-Paclitaxel vs. GEM-Monotherapie. Untersucht wurden das mediane Gesamtüberleben (8,5 vs. 6,7 Monate; $HR=0,72$; 95% CI: 0,62-0,83; $p<0,001$), die 1-Jahres-Überlebensrate (35% vs. 22%), das progressionsfreie Überleben (5,5 vs. 3,7 Monate, $HR=0,69$; 95% CI: 0,58-0,82; $p<0,001$) und die Ansprechrate (23% vs. 7%; $p<0,001$) [32].

Eine statistisch signifikante Verlängerung des progressionsfreien Intervalls konnte 2007 von Moore et al. insbesondere für die Kombinationstherapie von GEM mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib nachgewiesen werden [33]. Dieser greift in den Signalweg des epidermal growth factor receptors (EGFR), einem Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, ein [34]. 41,6% der Pankreaskarzinome weisen eine Überexpression des EGFR-Rezeptors auf, die mit erhöhter Rezidivrate und Metastasierungswahrscheinlichkeit und damit mit einer schlechteren Prognose einhergeht [35]. Moore et al. stellten die Studienarme GEM in Kombination mit Erlotinib und GEM-Monotherapie gegenüber. Vorteile für die Kombinationstherapie zeigten sich im medianen Gesamtüberleben (6,24 vs. 5,91 Monate; $HR=0,82$; 95% CI: 0,69-0,99; $p=0,038$), in der 1-Jahres-Überlebensrate (23% vs. 17%; $p=0,023$) und im progressionsfreien Überleben ($HR=0,77$; 95% CI: 0,64-0,92; $p=0,004$) [33].

Zudem gilt ein unter Erlotinib-Therapie aufgetretener Hautausschlag (skin rash) als positiver prädiktiver Indikator für das Therapieansprechen. Patienten, die unter Erlotinib-Therapie einen Hautausschlag entwickeln, zeigen einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patienten ohne Hautausschlag [26].

Eine Alternative zur GEM-Therapie bietet das FOLFIRINOX-Schema, eine Kombination aus 5-Floururacil, Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin. In einer randomisierten Phase III-Studie wurden die Arme FOLFIRINOX vs. GEM getestet. Im Hinblick auf das objektive Ansprechen (31,6% vs. 9,4%; $p < 0,001$), das progressionsfreie Überleben (6,4 vs. 3,3 Monate; $HR=0,47$; $p < 0,001$), das Gesamtüberleben (11,1 vs. 6,8 Monate; $HR=0,57$; $p < 0,001$) und die 1-Jahres-Überlebensrate (48,4% vs. 20,6%) konnten statistisch signifikante Vorteile des FOLFIRINOX-Arms gezeigt werden. Aufgrund der erhöhten Toxizität und der starken Nebenwirkungen, insbesondere der febrilen Neutropenie, kommen allerdings nur Patienten unter 75 Jahren in gutem Allgemeinzustand und mit normalen Bilirubinwerten für dieses Therapieschema in Frage [36].

Bei fehlendem Ansprechen der Erstlinientherapie stehen sogenannte Salvage-Therapien zur Verfügung. Hier kommen Capecitabin [37] oder die Kombination von Capecitabin mit Oxaliplatin als Zweitlinientherapie zum Einsatz [38]. In der CONKO-003-Studie konnte der Vorteil von Oxaliplatin, 5-Floururacil und Folinsäure (OFF-Schema) im Gegensatz zu alleinigem Einsatz von 5-Floururacil mit Folinsäure sowie im Gegensatz zu Best Supportive Care (BSC) nach vorangegangener GEM-Therapie gezeigt werden [39], [40]. Für Patienten, die FOLFIRINOX als Erstlinienchemotherapie erhalten haben, besteht die Option mit einer GEM-Zweitlinienchemotherapie behandelt zu werden [36].

1.2 Notwendigkeit der Etablierung von Biomarkern beim PDAC

Durch Verschmelzung des ursprünglich zweiteiligen Begriffs *biologischer Marker* entsteht der zusammengefasste Begriff *Biomarker*. Er bezieht sich auf eine Vielzahl von klinischen Zeichen, die als objektive Indikatoren von außen am Patienten bestimmt werden können. Diese Bestimmung muss präzise erfolgen und reproduzierbar sein [41]. Die „Biomarkers Definitions Working Group“ der National Institutes of Health der USA in Bethesda beschreibt einen Biomarker als „ein Charakteristikum, das objektiv gemessen sowie ausgewertet wird und als Indikator für normale biologische Prozesse, für pathogene Prozesse oder für das pharmakologische Ansprechen auf eine therapeutische Intervention dient“. Ein Biomarker kann dabei als diagnostisches Mittel, zu Stagingzwecken, zum Feststellen des Krankheitsausmaßes, als prognostischer Marker für den Krankheitsverlauf sowie als prädiktiver Marker für das Ansprechen und Monitoring von Therapien eingesetzt werden [42].

An dieser Stelle sei auch auf den Unterschied zwischen prädiktiven und prognostischen Biomarkern hingewiesen. Wie bereits aus dem Namen ersichtlich ist, gibt ein prognostischer Biomarker Auskunft über die Krankheitsprognose (zum Beispiel hinsichtlich des Gesamtüberlebens). Er stellt diese Information unabhängig von der eingesetzten Therapie zur Verfügung. Auch bei Ausbleiben einer Therapie kann er Aussagen über die Prognose der Krankheit treffen. Im Falle einer Therapie ist der Nutzen der Behandlung gleich für Biomarker-positive und Biomarker-negative Patienten. Der Erfolg des Behandlungsansatzes ist also unabhängig vom Status des Biomarkers. Die Assoziation des Biomarkers mit der Krankheitsprognose bleibt weiterhin bestehen [43].

Im Gegensatz dazu stehen prädiktive Biomarker. Sie beziehen sich auf Therapien mit mindestens zwei Vergleichsgruppen (Experimentalgruppe vs. Kontrollgruppe). Ein Biomarker besitzt eine prädiktive Aussagekraft sobald sich der Therapieerfolg in den Vergleichsgruppen signifikant unterscheidet. Biomarker-positive und Biomarker-negative Patienten weisen unter Einsatz der gleichen Therapie also einen unterschiedlichen Therapieerfolg (wie zum Beispiel Ansprechrate, Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben unter Therapie) auf. Dies kann auch der Fall sein, wenn zwar beide Gruppen von der Therapie profitieren, aber dennoch ein quantitativer Unterscheid hinsichtlich des Therapieerfolgs besteht [43].

Trotz der erfolgversprechenden Untersuchungen an in Frage kommenden Biomarkern für das PDAC konnten noch keine zuverlässigen und für die klinische Praxis tauglichen Parameter identifiziert werden. Derzeit stehen noch keine anerkannten Biomarker zur Früherkennung des PDAC zur Verfügung. Auch besteht die dringende Notwendigkeit, sensitive und spezifische Biomarker für die Identifizierung von Patientensubgruppen zu finden. Zudem müssen Biomarker mit prädiktiver Aussagekraft für das Ansprechen von neuen und bestehenden Therapien gefunden werden [17]. Etablierte Biomarker wären hilfreich in der Auswertung von Studienergebnissen. Sie bieten essentielle Grundlagen, um durch weitere Studien und Forschungen das Gesamtüberleben beim PDAC langfristig zu verbessern

Das PDAC zeichnet sich durch seine besonders große Heterogenität aus. Im Jahr 2013 konnten Biankin et al. Genomsequenzierungen an 99 PDAC-Proben durchführen. Sie identifizierten dabei 16 verschiedene mutierte Gene [13]. Diese hohe genetische Vielfalt des PDAC stellt eine große Herausforderung bei der Suche nach geeigneten Biomarkern dar [17]. Durch die Vielzahl an möglichen Mutationen gestaltet sich insbesondere die Suche nach universellen Biomarkern schwierig.

Ein weiteres oft aufgetretenes Problem der bislang durchgeführten Untersuchungen war das Studiendesign. Die Kohorten waren nicht vergleichbar oder es handelte sich um retrospektive Studien mit uneinheitlichem Therapieregime. In Zukunft müssen mehr prospektive translationale Studien mit genau definierten Studienprotokollen durchgeführt werden. Das Ziel sind Analysen mit genau definierten Patientenkollektiven, standardisierten Labortechniken und statistischen Auswertungen. Hierbei sollten auch innovative Methoden wie Genomsequenzierung und Multiplex-ELISA genutzt werden [44].

Dazu stehen auch die gemeinsamen Vorgaben und Empfehlungen vom Cancer Biomarkes Collaborative der American Association of Cancer Research, der Food and Drug Association und des National Cancer Institutes zur Verfügung [45].

1.3 Mögliche Biomarker beim Pankreaskarzinom

1.3.1 Proteine der RAS-Familie

Die Proteinfamilie der rat sarcoma (RAS) Proteine besteht aus kleinen Guanosintriphosphatasen (GTPasen). Zu dieser Familie der kleinen G-Proteine zählen Neuroblastoma ras viral oncogene homolog (NRAS), Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) und Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (HRAS). Nach Aktivierung durch extrazelluläre Stimuli sind sie als Onkogene an Zellwachstum und Zelldifferenzierung beteiligt. So kann es bei einer Mutation zur ständigen Aktivierung der angeschlossenen Signaltransduktionswege kommen. Dies führt zu Zellteilung, Zellwachstum und Unterdrückung von Apoptosevorgängen [46].

Es gibt im Wesentlichen drei Signalkaskaden, die ausgehend von aktivierten RAS-Proteinen gesteuert werden: die MAP-Kinase-Kaskade, den PI3K-AKT-PDK1-Signaltransduktionsweg und den RalGEF-RAL-Signalweg [47].

Die MAP-Kinase-Kaskade ist ein von den Proteinen der RAS-Familie gesteuerter Signaltransduktionsweg, der durch die Aktivierung von membranständigen Rezeptoren stimuliert wird [48]. Zu diesen Rezeptoren zählt unter anderem EGFR aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Bei Bindung von Liganden wie Wachstumsfaktoren an den Rezeptor kommt es zu einer Dimerisierung und intrazellulären Transphosphorylierung des Rezeptors [34]. Dadurch kann der Rezeptor Komplexe mit Adaptermolekülen wie GRB2 eingehen. Es werden Guanin nucleotide exchange factors (GNEF) wie SOS aktiviert, die die Bindung von GTP an G-Proteine der RAS-Familie ermöglichen [49]. Diese können nun einen Komplex mit den Proteinen der RAF-Familie bilden. Die RAF-Proteine wiederum phosphorylieren und aktivieren MEK-Proteine, die ihrerseits ERK-Proteine phosphorylieren und aktivieren. Die ERK-Proteine, die auch MAP-Kinasen genannt werden, bilden die eigentliche Gruppe der Effektorproteine. Diese können jetzt in den Nukleus translozieren, wo sie Transkriptionsfaktoren an regulatorische Bereiche der DNA binden [48], [50].

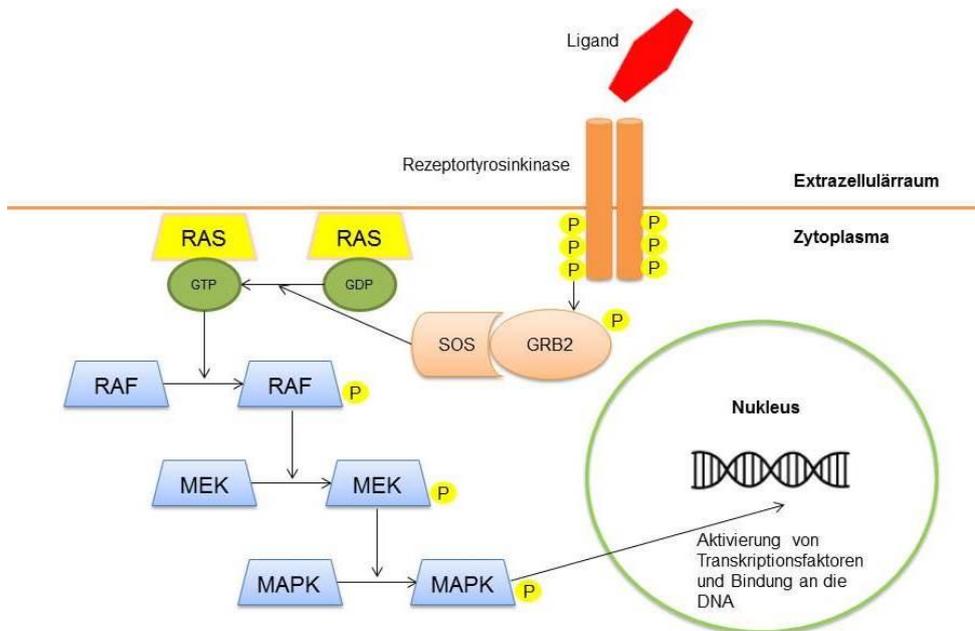


Abbildung 2: MAP-Kinase-Kaskade, modifiziert nach Rassow et al., 2008 [51]; Schubbert et al., 2007 [49]

Ein ebenso durch die Proteine der RAS-Familie gesteuerter Signalweg ist die PI3K-AKT-PDK1-Kaskade. Zunächst wird die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) von RAS-Proteinen aktiviert und kann nun das sich in der Zellmembran befindliche Phospholipid Phosphatidylinositol-4, 5-Bisphosphat (PIP₂) phosphorylieren. Das Produkt dieser Phosphorylierung ist Phosphatidylinositol-3, 4, 5-Triphosphat (PIP₃). Dieses rekrutiert eine Untergruppe von Signalproteinen wie die Serin/Threonin-Kinasen Proteinkinase B (AKT) und PDK1, sowie Tyrosinkinasen und Austauschfaktoren wie GRP1 und GAB-1, die die wiederum die Aktivität von heterotrimeren G-Proteinen regulieren. Alle diese aktivierten Proteine sind an der Initiierung von komplexen Vorgängen der Proteinsynthese, Aktinpolymerisation, Zellüberleben und Steuerung von Zellzyklen beteiligt [52], [53].

Zudem nehmen die RAS-Proteine Einfluss auf den insbesondere beim PDAC häufig aktivierten RalGEF-RAL-Signaltransduktionsweg. Zunächst werden Ral guanine exchange factors (RalGEFs) von einem GTP-gebundenen RAS-Protein aktiviert. Sie ermöglichen so den Austausch von GDP zu GTP am Onkogen RAL [54]. RAL ist ebenfalls ein kleines G-Protein, das in die Isoformen RALA und RALB unterteilt werden kann. Insbesondere für RALA konnte eine Initiierung von Metastasierungsprozessen gezeigt werden [55].

Somatische Genveränderungen in den RAS-Genen waren die ersten spezifischen Genveränderungen in menschlichen Krebszellen, die vor mehr als 30 Jahren beschrieben wurden. Seitdem wurden mehr als 40.000 wissenschaftliche Artikel zu diesem Thema veröffentlicht [56]. Immerhin stellen Mutationen in den RAS-Genen die Ursache für ca. 30% aller Krebserkrankungen dar. Es treten vorwiegend Punktmutationen in den Codons 12, 13 und 61 auf. Diese inaktivieren die intrinsische GTPase-Aktivität des Proteins und führen damit zu einem ständig aktivierten GTP-gebundenen Form von RAS [49].

Insbesondere Mutationen im Onkogen KRAS bilden einen Großteil der RAS-Genveränderungen [56]. Auch beim PDAC sind KRAS-Mutationen der Hauptgrund der Zellentartung. Hier gehören sie zu den am häufigsten (>90%) und am frühesten auftretenden Genveränderungen [57]. Mutationen im NRAS-Gen kommen bei ca. 8% aller Tumorarten vor und sind damit deutlich geringer [56]. Bei einigen Tumorarten sind sie jedoch besonders häufig. So beträgt die Anzahl der NRAS-Mutationen beim malignen Melanom 13-25%, bei der akuten myeloischen Leukämie 10,3%, beim Schilddrüsenkarzinom 6,2% und beim Kolonkarzinom 2,2-5,1% [46]. Mutationen im HRAS-Gen sind nur bei ca. 3% aller Tumorarten beschrieben [56].

KRAS-Mutationen sind als negative prädiktive Biomarker für das Ansprechen einer anti-EGFR gerichteten Tumortherapie beim kolorektalen Karzinom [58], [59] und beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom [60] etabliert. Beim kolorektalen Karzinom zeigen KRAS-Mutationen im Exon 2 eine schlechtere Prognose unter einer kombinierten Therapie mit EGFR-Antikörpern und oxaliplatinhaltigen Chemotherapeutika [61]. Im Gegensatz zum kolorektalen Karzinom konnte eine KRAS-Mutation nicht als prädiktiver Marker für eine anti-EGFR-Therapie beim PDAC etabliert werden. Hier muss die prädiktive Rolle von KRAS noch evaluiert werden [62], [63].

Beim PDAC zeichnet sich KRAS eher als prognostischer Biomarker ab. In der AIO-PK0104-Studie zeigten Patienten mit KRAS-Wildtypstatus ein signifikant besseres Überleben als Patienten mit mutiertem KRAS-Status (7,9 vs. 5,7 Monate; HR=1,68; p=0,005). Erlotinib war hier Bestandteil der Erstlinientherapie [64]. Auch eine Metaanalyse von 17 KRAS-Studien wies auf die mögliche Signifikanz von KRAS als prognostischer Biomarker für das PDAC hin [65].

An dieser Stelle sei die Dissertation von Frau Sibylle Bächmann erwähnt. Sie beschäftigt sich mit der Rolle von KRAS als Biomarker bei fortgeschrittenem PDAC, das nicht mit anti-EGFR-gerichteten Substanzen wie Erlotinib behandelt wurde. In diesen Untersuchungen konnte KRAS nicht als prognostischer Biomarker für das fortgeschrittene PDAC identifiziert werden.

1.3.2 SMAD4

Die Bezeichnung SMAD stammt aus der Taufliiegenforschung und entsteht durch Fusion der Begriffe SMA und MAD. Bei SMA handelt es sich um ein Gen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*. MAD (Mothers against decapentaplegic) hingegen bezeichnet ein Gen der Taufliede *Drosophila*. Das hier untersuchte SMAD4-Protein, ein Mitglied der SMAD-Proteinfamilie, wird auch häufig als DPC4-Protein (deleted in pancreatic carcinoma) bezeichnet [66].

SMAD4 ist ein zytoplasmatisches Protein und Bestandteil des Signaltransduktionswegs von transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) [67]. TGF- β 1 ist an der Regulation der Zellproliferation, an der Zelldifferenzierung sowie an Apoptosevorgängen beteiligt. Die an den TGF- β 1-Signaltransduktionsweg angeschlossenen Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei Zellwachstum und Homöostase des Gewebes [68]. TGF- β 1 bindet an eine Rezeptortyrosinkinase, wodurch es zu einer intrazellulären Phosphorylierung dieses Rezeptors kommt. Der aktivierte Rezeptor phosphoryliert nun sogenannte receptor-regulated SMAD-Proteine (R-SMADS). Diese wiederum bilden Heterodimere mit dem Protein SMAD4, die nun im Zellkern zusammen mit weiteren Cofaktoren an die DNA binden und dort die Transkription der durch TGF- β 1 regulierten Gene fördern [51]. Da das SMAD4-Gen als Tumorsuppressorgen fungiert, kann es bei dessen Inaktivierung zur Entstehung maligner Tumoren kommen [69].

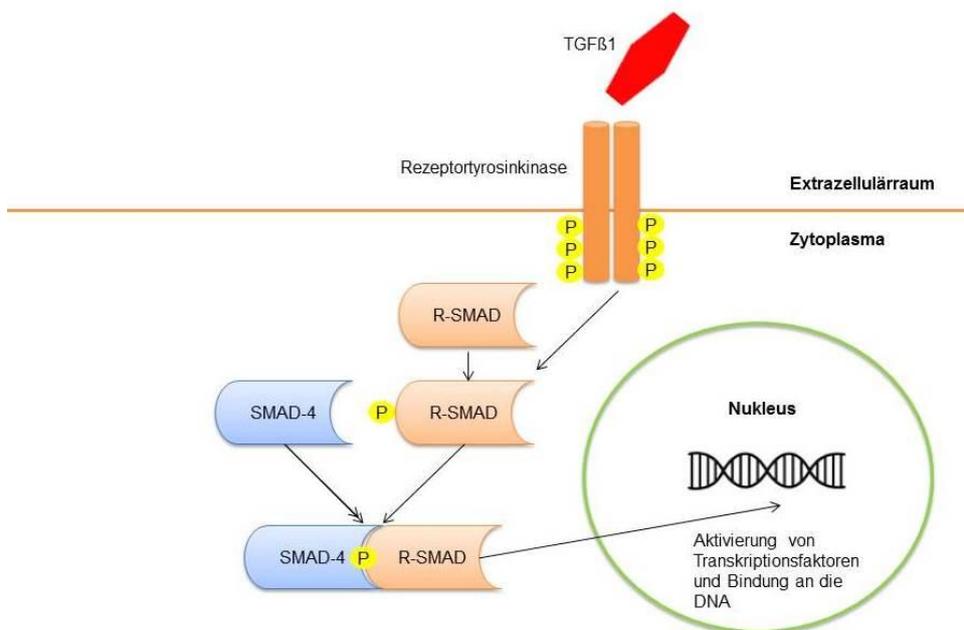


Abbildung 3: TGF- β 1-Signalweg, modifiziert nach Kang, 2009 [68]

In 55% der Fälle von PDAC ist das SMAD4-Gen inaktiviert [70]. Der Verlust eines Allels im Chromosom 18q21.1, das für das SMAD4-Gen kodiert, ist dabei ausschlaggebend. So kommt es entweder zu einer Mutation in einem Allel in Kombination mit dem Verlust des anderen Allels oder zu einem homozygoten Verlust beider Allele des SMAD4-Gens [71].

SMAD4 wird als prognostischer Biomarker für die Metastasierungswahrscheinlichkeit des PDAC diskutiert. Iacobuzio-Donahue et al. untersuchten die Expression von SMAD4 an 65 Patientenproben mit PDAC anhand von immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparaten. Dabei zeigten 41 Patienten (63%) eine SMAD4-Inaktivierung. Ein Verlust von SMAD4 war häufiger bei metastasierten Patienten als bei lokal begrenzten Tumoren zu sehen (78% vs. 22%; $p=0,007$) [72]. Ebenso konnten Oshima et al. bei der Untersuchung von 106 Patienten mit resektablem PDAC eine SMAD4-Inaktivierung bei 64 Patienten (60%) immunhistochemisch nachweisen. Sie zeigten eine Korrelation zwischen der Geninaktivierung und der TumorgroÙe ($p=0,006$), Lymphgefäßinvasion ($p=0,033$) und der Lymphknotenmetastasierung ($p=0,006$) [73].

Ein Zusammenhang des SMAD4-Mutationsstatus mit dem Gesamtüberleben bei resektablem PDAC konnte ebenfalls gezeigt werden. Blackford et al. zeigten den signifikanten Unterschied in den Überlebenskurven für Patienten mit und ohne SMAD4-Geninaktivierung. Sie untersuchten dabei den Mutationsstatus von SMAD4 bei 89 Patienten mit Hilfe von DNA-Microarrays. Das mediane Überleben der Patienten mit inaktiviertem SMAD4-Genstatus war signifikant kürzer als das der Patienten mit SMAD4-Wildtyp (HR=1,92; 95% CI: 1,20-3,05; $p=0,006$). Das mediane Überleben betrug 14,2 Monate für SMAD4-Wildtypstatus vs. 11,5 Monate für inaktivierten SMAD4-Genstatus [74]. Dies zeigten auch Oshima et al. Hier lag das Gesamtüberleben für resektable Tumoren bei 30,1 Monaten bei SMAD4-Wildtyp im Gegensatz zu 18,3 Monaten bei mutiertem SMAD4-Status ($p<0,001$) [73].

Zudem wird SMAD4 als prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie angesehen. Dies zeigte die Untersuchung von Bachet et al. an 471 Patienten mit PDAC. Der SMAD4-Genstatus wurde hier per DNA-Microarray nachgewiesen. Patienten mit SMAD4-Mutation profitierten sichtlich von adjuvanter Chemotherapie (HR=0,59; 95% CI: 0,42-0,82; $p=0,002$), wohingegen Patienten mit SMAD4-Wildtyp keinen signifikanten Nutzen aus der Therapie zogen (HR=0,85; 95% CI: 0,49-1,46; $p=0,552$) [75].

1.3.3 hENT1

Ein für das PDAC in Frage kommender prädiktiver Biomarker ist der human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). Er ist als Transmembranprotein für den intrazellulären Transport von Purin- und Pyrimidinnukleosiden zuständig [76]. Auch die Nukleoside GEM, Capecitabin und 5-Fluoruracil benötigen hENT1 zur Aufnahme in die Tumorzelle und Entfaltung seiner Toxizität. Nach Durchführung von immunhistochemischen Untersuchungen der hENT1-Expression diskutierten Spratlin et al. 2004 hENT1 als prädiktiven Biomarker für das Ansprechen auf GEM. Das mediane Überleben lag bei 13 vs. 4 Monaten ($p=0,01$) für Patienten mit hoher hENT-Expression im Vergleich zu Patienten mit niedriger hENT-Expression [77]. Ähnliche Ergebnisse zeigten Greenhalf et al. 2014 in einer translationalen retrospektiven Studie an chirurgisch resezierten Patienten mit adjuvanter GEM-Chemotherapie. Sie identifizierten hENT1 als prädiktiven Biomarker für das Ansprechen auf GEM. Patienten mit hoher hENT1-Expression zeigten statistisch signifikante Überlebensvorteile im Vergleich zu Patienten mit niedriger hENT1-Expression (26,2 vs. 17,1 Monate; $p=0,002$). Für die Patientengruppe unter 5-Fluoruracil-Therapie konnten keine vom hENT1-Expressionslevel abhängigen signifikanten Überlebensvorteile festgestellt werden [78].

2013 führten Poplin et al. eine randomisierte klinische Studie an Patienten mit metastasiertem PDAC durch. Sie gingen der Frage nach, ob CO-101, ein Derivat von GEM, das unabhängig von hENT1-Transporterfunktionen in die Zelle aufgenommen wird, signifikante Überlebensvorteile bei Patienten mit niedriger hENT1-Expression im Vergleich zu GEM bietet. Es zeigte sich kein Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den beiden Therapiearmen in der Patientengruppe mit geringer hENT1-Expression (HR=0,994; 95% CI: 0,746-1,326) [79]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Greenhalf et al. in der adjuvanten Situation [78] konnten in dieser Studie bei fortgeschrittenem PDAC kein verlängertes Gesamtüberleben für Patienten unter GEM-Therapie mit hoher hENT1-Expression nachgewiesen werden [79]. Ebenso zeigten translationale Untersuchungsergebnisse der AIO-PK0104-Studie, dass bei bereits metastasiertem PDAC hENT1 als prädiktiver Biomarker für das Ansprechen von GEM möglicherweise ausgeschlossen werden muss [80].

1.3.4 SPARC

Charakteristisch für das PDAC ist ein stark ausgebildetes desmoplastisches Stroma, welches das Tumorgewebe umgibt. Dieses stellt ein Hindernis für Chemotherapeutika dar und ist mit einem verschlechterten Therapieansprechen verbunden [81]. Im Stroma findet sich häufig eine verstärkte Expression von secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), das auch als Osteonectin bezeichnet wird. Eine SPARC-Überexpression spielt eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese. Sie wird in Zusammenhang mit einer schnelleren Tumorausbreitung sowie einem schlechteren Gesamtüberleben gestellt [82].

Infante et al. identifizierten eine erhöhte Expression von SPARC in peritumorösen Fibroblasten als negativen prognostischen Faktor bei Patienten mit resezierbarem PDAC [83]. Auch für das fortgeschrittene Pankreaskarzinom konnte bei zytoplasmatischer SPARC-Expression im Primärtumor eine schlechtere Prognose bezogen auf progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben gezeigt werden [84].

In der Aufarbeitung der CONKO-001-Studie schlugen Sinn et al. eine verstärkte stromale Expression von SPARC beim resektablen PDAC als negativen prädiktiven Biomarker für eine adjuvante GEM-Therapie vor. Dies zeigte sich an einem schlechteren progressionsfreien Überleben sowie einem schlechteren Gesamtüberleben im Vergleich zur Patientengruppe ohne SPARC-Überexpression im peritumorösen Stroma [85]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch von Ormanns et al. für das fortgeschrittene PDAC veröffentlicht werden. Eine zytoplasmatische SPARC-Expression wurde als negativer prädiktiver Biomarker für GEM-basierte Chemotherapien vorgeschlagen [84].

Zudem besitzt das Protein SPARC eine albuminbindende Fähigkeit, die für die intrazelluläre Aufnahme von Chemotherapeutika wie dem albumingebundenen Paclitaxel (Nab-Paclitaxel) essentiell ist. Als vielversprechend galten daher Kombinationstherapien von Nab-Paclitaxel mit GEM [86]. In einer Phase-II-Studie zeigten von Hoff et al. 2011 einen Vorteil im Gesamtüberleben für eine Kombinationschemotherapie bei Tumoren mit SPARC-Expression im Stroma aber nicht im Tumorgewebe selbst [87]. 2015 wurden diese Studienergebnisse von Hidalgo et al. allerdings in einer Phase-III-Studie widerlegt. Sie konnten keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf das Gesamtüberleben zwischen einer GEM-Monotherapie und einer GEM-Therapie in Kombination mit Nab-Paclitaxel zeigen [88]. Der prädiktive Stellenwert von SPARC bleibt damit umstritten.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll durch die Anwendung von molekularbiologischen Techniken die Bedeutung des Mutationsstatus in den NRAS-Genen und der Expressionstatus von SMAD4 bei fortgeschrittenem PDAC untersucht werden.

Zur Bestimmung des NRAS-Mutationsstatus sollen retrospektive translationale Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei werden Exon 2 (Codon 12, 13), Exon 3 (Codon 59, 61) und Exon 4 (Codon 117, 146) des NRAS-Gens betrachtet. Für die Bestimmung des SMAD4-Expressionsstatus sind etablierte immunhistochemische Methoden vorgesehen.

Eine Zielsetzung dieser Arbeit besteht unter anderem darin, die Rolle des NRAS-Mutationsstatus beim PDAC zu definieren und zu untersuchen, inwieweit NRAS als Biomarker für das PDAC in Frage kommt. Nach unserer Kenntnis ist dies die erste Untersuchung, die sich in dieser Fragestellung in dieser Konstellation widmet.

Zur Behandlung des Pankreaskarzinoms ist Erlotinib, ein Hemmstoff der EGFR-assoziierten Tyrosinkinase, zugelassen [33]. Dieser greift in die von Proteinen der RAS-Familie gekoppelte MAP-Kinase-Kaskade ein [34]. Alle Patienten des hier betrachteten Kollektivs erhielten eine palliative Erstlinienchemotherapie *ohne* Tyrosinkinaseinhibitoren wie Erlotinib. Dies stellt eine wesentliche Grundlage zur Beurteilbarkeit der Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen dar. So kann gezielt geprüft werden, ob der NRAS-Mutationsstatus als prognostischer Biomarker in Frage kommt.

Zudem wird die Aktivität von SMAD4 des gleichen Patientenkollektivs bestimmt und hinsichtlich seiner prognostischen und prädiktiven Aussage bei fortgeschrittenem PDAC untersucht. Bislang existieren einige Veröffentlichungen über SMAD4 als Biomarker bei resektablem PDAC. Für das fortgeschrittene PDAC ist die Rolle von SMAD4 als Biomarker noch ungeklärt. Auch hier soll also der Frage nachgegangen werden, inwiefern SMAD4 als Biomarker auch für das fortgeschrittene PDAC von Relevanz ist.

In der statistischen Auswertung der Ergebnisse sollen insbesondere das mediane Gesamtüberleben sowie das mediane progressionsfreien Überleben in Bezug auf den jeweiligen Expressionsstatus von SMAD4 analysiert werden. Diese Betrachtungen sollen sowohl für das gesamte Kollektiv als auch für spezifische Subgruppen durchgeführt werden.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Die durchgeführten translationalen Untersuchungen basierten auf einer retrospektiven und explorativen Studie. Dabei wurden Tumoren von bereits therapierten und verstorbenen Patienten betrachtet. Das Patientenkollektiv bestand aus Patienten, die in den letzten Jahren an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Klinikums Großhadern der LMU München behandelt wurden. Außerdem wurden Daten von Patienten mit einbezogen, die in den Jahren 1997-2006 im Rahmen von drei großen deutschlandweiten multizentrischen Studien zum Pankreaskarzinom ermittelt wurden. Darunter fallen die Studien Heinemann et al. 2006 (Phase III Studie, GEM-Cisplatin vs. GEM-Monotherapie) [89], Boeck et al 2008 (Phase II Studie, Capecitabin-Oxaliplatin vs. Capecitabin-GEM vs. GEM-Oxaliplatin) [90] und Heinemann et al. 2013 (Cross-Over-Studiendesign im Rahmen der AIO-PK0104-Studie: Capecitabin vs. GEM gefolgt von GEM vs. Capecitabin) [64]. Aus der letzten der genannten Studien wurden nur Patienten in diese Arbeit miteinbezogen, die vor einem Amendment im Jahr 2007 in die Studie eingeschlossen wurden und somit Erlotinib nicht Bestandteil der Erstlinienchemotherapie war.

Leiter der klinischen Prüfungen war jeweils Prof. Dr. med. Volker Heinemann. Zur Studienteilnahme lagen die folgenden Ein- und Ausschlusskriterien vor.

Einschlusskriterien

- Histologisch gesicherte Diagnose eines zum Zeitpunkt des Therapiebeginns inoperablen (lokal fortgeschrittenen oder metastasierten) PDAC
- Verfügbarkeit von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Tumorschnitten
- Behandlung mit palliativer Chemotherapie ohne Substanzen, die in den EGFR-Signalweg eingreifen (wie zum Beispiel Erlotinib)
- Klinisch messbare Tumorkläsion, deren Therapieansprechen durch bildgebende Verfahren nach den RECIST-Kriterien (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) [91] beurteilbar ist

Ausschlusskriterien

- Endokrine Tumoren des Pankreas
- Zweit- oder Doppelkarzinome

- Vorbehandlung des Pankreaskarzinoms mit palliativer Chemotherapie oder Radiochemotherapie vor dem Beobachtungszeitraum der Studie
- Erhalt der neueren und effektiveren Therapieregime FOLFIRINOX oder GEM-Nab-Paclitaxel

Es existierte ein positives Votum der Ethikkommission der LMU München vom Januar 2012 und vom Januar 2013 (siehe Anhang), das für die Durchführung der Studie essentiell war. Es war davon auszugehen, dass keine überlebenden Patienten in dem Kollektiv enthalten waren, da die Studien zu Beginn dieser Arbeit bereits seit einigen Jahren geschlossen waren. Aus diesem Grund konnte keine Einverständniserklärung der Teilnehmer eingeholt werden. Eine Einholung von Einverständniserklärungen der Hinterbliebenen war nicht realistisch durchführbar und hätte die Durchführbarkeit dieses wissenschaftlichen Projekts erheblich eingeschränkt.

Die Patientendaten lagen in pseudonymisierter Form vor, was die Anforderung der Probenmaterials von den diversen Studienzentren ermöglichte. Nach Zusendung der Tumorblöcke konnten diese im Pathologischen Institut der LMU München gesammelt werden. Es erfolgte eine irreversible Anonymisierung aller Patientendaten mit Hilfe von studienbezogenen Patientennummern.

Hier sei nochmals auf die Dissertation von Frau Sibylle Bächmann hingewiesen, deren Untersuchungen an demselben Patientenkollektiv wie diese Arbeit stattfanden. Ihre Studien beschäftigen sich mit dem Mutationsstatus der KRAS-Exone 2,3 und 4 und evaluieren die prognostische und prädiktive Bedeutung des KRAS-Status bei fortgeschrittenem PDAC.

2.2 Durchführung der labortechnischen Untersuchungen

Die unten beschriebenen Methoden wurden im molekularpathologischen Labor des Pathologischen Instituts der LMU München am Standort Innenstadt durchgeführt. Dort konnte der Mutationszustand des NRAS-Gens schnell und hochqualitativ im Rahmen der Routinediagnostik bestimmt werden. Die HE-Färbungen der Mikrotomschnitte erfolgten freundlicherweise durch das medizinisch-technische Personal des Instituts. Die immunhistochemischen Färbungen zur Detektion des SMAD4-Expressionsstatus wurden freundlicherweise vom Pathologischen Institut der LMU am Standort Großhadern übernommen.

2.3 Geräte und Laborausstattung

Bezeichnung	Hersteller, Vertrieb
Cartridge: PyroMark Q24 Cartridge	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Heizplatte: Präzitherm	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Hood für PCR-Ansatz: DNA/ RNA UV-Cleaner UVC/T-M	Biosan Ltd, Riga, Lettland
Mikroskop: Primo Star	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikrozentrifuge: iFuge M08VT	Neuation Technologies Pvt. Ltd, Gandhinagar, Indien
Pipetten: Pipetman classic 20 µl/ 200 µl/ 1000 µl	Gilson International B.V., Limburg an der Lahn, Deutschland
Pipetten: Reference 10 µl/ 100 µl/ 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pyrosequenzierer: PyroMark Q24	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAcube	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Schüttler: Variomag Monoshake	Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert, Deutschland
Thermocycler: Mastercycler Pro	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer: Thermomixer comfort, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vakuumstation für Pyrosequenzierung: PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Vortexmischer: Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA

Tabelle 1: Geräte- und Laborausstattung

2.4 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller, Vertrieb
Adapter für QIAcube: Rotor Adapters	Qiagen, GmbH, Hilden, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße: SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml/ 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
PCR-Tubes: Multiply-µStripPro 8er Kette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen für QIAcube: Filter-Tips 100 µl	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Pipettenspitzen: ClearLine Filter Tips 100 µl	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Pipettenspitzen: OneTouch Barrier Tips 10 µl (1–20 µl)	Sorenson Bioscience Inc., Salt Lake City, USA
Pipettenspitzen: SafeGuard Filterspitzen 1000 µl	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pipettenspitzen: SafeSeal Tips 20 µl/ 200 µl/ 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Platte für Beads: 24-PCR Platte ohne Rahmen	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Platte für Pyrosequenzierungsprimer: PyroMark Q24 Plate, Version 1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Skalpellsklingen: neoLab-Skalpellsklingen steril Fig.16	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

2.5 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller, Vertrieb
Annealing Buffer für Pyrosequenzierung: PyroMark Annealing Buffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Beads: Streptavidin Sepharose High Performance	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Binding Puffer für Pyrosequenzierung: PyroMark Binding Buffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Denaturation Solution für Pyrosequenzierung: PyroMark Denaturation Solution	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Enzym, Substrat und Nukleotide für Pyrosequenzierung: PyroMark Gold Q24 Reagents	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Ethanol: Ethanol ≥ 99,5%, Ph.Eur., reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
H ₂ O für PCR: Aqua ad injectabilia Mini- Plasco connect	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
H ₂ O: Aqua Bidest.	H. Kerndl GmbH, Weißenfeld, Deutschland
Kit für DNA-Extraktion: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Nukleotide für PCR: dNTP Mix, 10mM each	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Puffer und Taq-Polymerase für PCR: HotStarTaq DNA Polymerase 1000 units	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Wash Buffer für Pyrosequenzierung: PyroMark Wash Buffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Wildtyp-DNA: Human Genomic DNA: Male, 100 µg	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Xylol: Xylol (Isomere) > 98%, rein, für die Histologie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

2.6 Primer für NRAS

2.6.1 Primermaterial

<u>Artikel</u>	<u>Name</u>	<u>Sequenz (5' - ... - 3')</u>
A2346	NRAS Ex2 p.12, 13 F4	CTTGCTGGTGTGAAATGACTGAG
A2347	NRAS Ex2 p.12, 13 R6~BIO	TGGATTGTCAGTGCGCTTTT
A2348	NRAS Ex2 p.12, 13 S	TGGTGGTGGTTGGAG
A2822	NRAS Ex3 59, p61 F1	AAACCTGTTTGTGGACATACTG
A2823	NRAS Ex3 p59, p61 R1~BIO	TATTGGTCTCTCATGGCACTGT
A2824	NRAS Ex3 p59, p61 S1	TTGTTGGACATACTGGAT
A3176	NRAS Ex4 p117 F1~BIO	ATGATGTACCTATGGTGCTAGTGG
A3177	NRAS Ex4 p117 R1	CGTAACTCTTGGCCAGTTTCG
A3178	NRAS Ex4 p117 S1	TCCTTGTTGGCAAATC
A2797	NRAS Codon 146 F1	CGAACTGGCCAAGAGTTACG
A2798	NRAS Codon 146 R1~BIO	TGAAAGCTGTACCATACCTGTCTG
A2799	NRAS Codon 146 S1	TCCATTCATTGAAACCT

Tabelle 4: Primer für NRAS

Alle Primer stammten von Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland.

2.6.2 Primersequenzen und untersuchte Genabschnitte

Die folgenden Abbildungen zeigen die Primersequenzen und die untersuchten Exonabschnitte. Für die graphische Darstellung wurde die Software Geneious 6.0.6 von Biomatters Ltd., Auckland, Neuseeland verwendet.

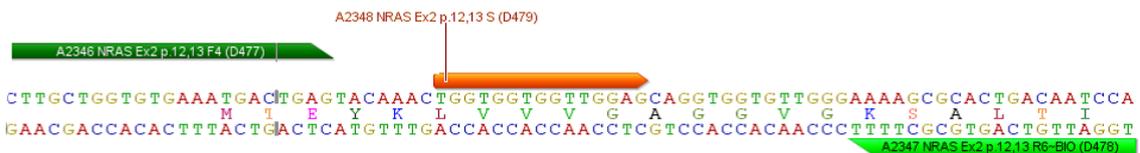


Abbildung 4: Primersequenzen NRAS Exon 2 (Codon 12, 13)

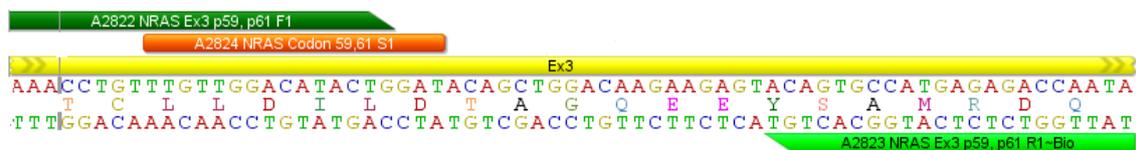


Abbildung 5: Primersequenzen NRAS Exon 3 (Codon 59, 61)



Abbildung 6: Primersequenzen NRAS Exon 4 (Codon 117)



Abbildung 7: Primersequenzen NRAS Exon 4 (Codon 146)

2.7 Gewinnung der DNA-Proben

Das Probenmaterial stammte aus Operationspräparaten sowie aus Gewebebiopsien, die unter sonographischer Kontrolle entnommen wurden. Dabei handelte es sich sowohl um primäres Pankreasgewebe als auch um Fernmetastasen, die vorrangig in der Leber zu finden waren. Die Proben lagen in Form von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeschnitten vor. Die DNA-Extraktion erfolgte hochstandardisiert mit Hilfe des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits und des QIAcubes von Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland [92].

Die FFPE-Schnitte wurden zunächst in einer Reihe aus Xylol und Ethanol $\geq 99,5\%$ entparaffiniert. Nach mikroskopischer Identifizierung des Tumorgewebes an einem korrespondierenden HE-gefärbten Schnittpräparat konnte das für die Proben relevante Gewebe mit einer sterilen Skalpellklinge gezielt disseziert werden. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde das Tumorgewebe in weitem Sicherheitsabstand zu dem angrenzenden normalen Pankreasparenchym extrahiert.

Zusammen mit 180 μ l Zellysepuffer (Buffer ATL) und 20 μ l Proteinase K wurde das Zellmaterial in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß für 5 Stunden bei 56°C und 450 rpm zur Zellyse und Proteindenaturierung im Thermomixer geschüttelt. Anschließend diente eine 10-minütige Erhitzung auf 95°C ohne Schütteln im Thermomixer der Aufhebung der Formalinfixierung.

Die Proben wurden nun in den vollautomatisierten QIAcube gegeben, wo eine Bindung der DNA an die Membran von Silicasäulen (QIAamp MinElute Column) mit Hilfe eines Äquilibriumspuffer (Buffer AL) und Ethanol $\geq 99,5\%$ stattfand. Nach dem Auftragen von Waschpuffern (Buffer AW1, Buffer AW2) konnte der QIAcube im letzten Schritt die hochkonzentrierte DNA mit 20 μ l Elutionspuffer (Buffer ATE) von der Säule lösen und in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß auffangen [92]. Die Lagerung der DNA-Proben erfolgte bei -20°C im Gefrierschrank.

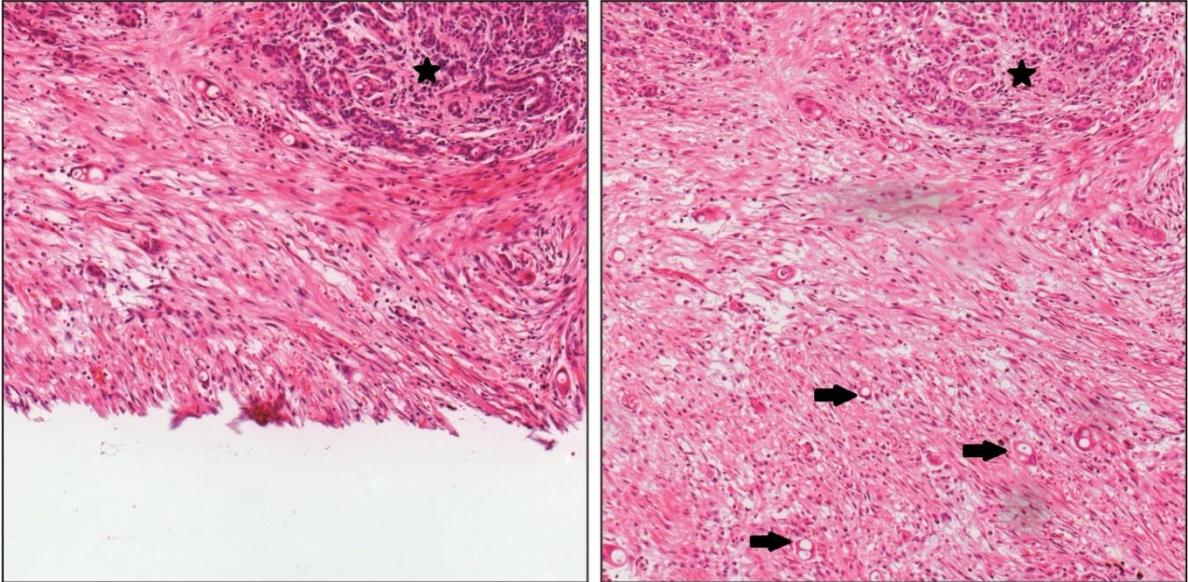


Abbildung 8: Resektionspräparat eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas, vor (rechts) und nach Gewebsextraktion (links). Tumorgewebe (Pfeile) wurde in weitem Sicherheitsabstand zu angrenzendem normalen Pankreasparenchym (*) extrahiert, um eine Kontamination zu vermeiden. Konventionelle HE-Färbung. 100-fache Vergrößerung.

2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.8.1 Das Prinzip der PCR

Die PCR ist eine 1983 von Kary B. Mullis entwickelte Methode zur in-vitro-Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte. Durch Durchführung mehrerer Zyklen, in denen der DNA-Gehalt jeweils verdoppelt wird, ermöglicht die PCR eine exponentielle Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenzen [93].

Jeder Zyklus läuft nach dem folgenden Schema ab. Zunächst kommt es zur Denaturierung der DNA. Durch Erhitzen auf 95°C wird die doppelsträngige DNA hierbei in Einzelstränge aufgeteilt. Nun können sich die beiden PCR-Primer bei ungefähr 60°C an ihren jeweils komplementären DNA-Einzelstrang anlagern. Diese Phase der Primerhybridisierung wird auch als Annealing bezeichnet. Anschließend setzt während der Phase der DNA-Synthese eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) bei 72°C am freien 3'-OH-Ende der Primer an. Unter Verbrauch von dNTPs wird somit die gewünschte DNA-Sequenz an jedem Einzelstrang zu einem Doppelstrang verlängert. Jetzt kann die DNA in einem weiteren Zyklus erneut verdoppelt werden [94].

2.8.2 Technische Durchführung der PCR

Die PCR diente zur Vervielfältigung der gesuchten DNA-Abschnitte (NRAS Exon 2 (Codon 12, 13), Exon 3 (Codon 59, 61), Exon 4 (Codon 117), Exon 4 (Codon 146)).

Nach Erstellung eines Primermixes aus 60 µl H₂O und jeweils 20 µl der beiden PCR-Primer wurde in einer zuvor durch UV-Licht bestrahlten Hood ein Mastermix für 24 PCR-Ansätze nach folgendem Schema angesetzt.

H ₂ O	782,4 µl
Puffer	96,0 µl
dNTP-Mix 10mM	9,60 µl
Primermix	19,2 µl
Taq-Polymerase	4,80 µl

Tabelle 5: Mastermix für 24 PCR-Ansätze

Nun wurden 38 µl des Mastermixes pro Ansatz in die PCR-Tubes (3x8 Tubes) pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der DNA in einer zweiten zuvor mit UV-Licht bestrahlten Hood. Dabei wurden 20 Ansätze mit jeweils 2 µl der zuvor extrahierten DNA gefüllt. Ein Ansatz diente als Positivkontrolle. Zu diesem wurden dementsprechend 2 µl Wildtyp-DNA hinzugefügt. Die restlichen 3 Ansätze dienten als Negativkontrollen und enthielten nur den Mastermix.

Anschließend wurden die PCR-Tubes in den Thermocycler gegeben, wo das folgende Protokoll ausgeführt wurde.

Initiale Denaturierung	15 Minuten	95°C
50 Zyklen à 90 Sekunden		
Denaturierung	30 Sekunden	95°C
Primerhybridisierung	30 Sekunden	60°C
DNA-Synthese	30 Sekunden	72°C
Schlussphase	2 Minuten	72°C
Kühltemperatur		4°C

Tabelle 6: PCR-Protokoll

Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei +4°C im Kühlschrank.

2.9 Pyrosequenzierung

2.9.1 Das Prinzip der Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung wurde 1996 von Mostafa Ronaghi and Pål Nyrén zur Sequenzierung von Genabschnitten entwickelt. Sie basiert auf dem Prinzip des „sequencing-by-synthesis“. Als Ausgangsprodukt dient eine einzelsträngige DNA-Sequenz, an die ein Primer gekoppelt ist und die mit Hilfe einer DNA-Polymerase ergänzt wird. Bei Einbau eines komplementären Nukleotids an den Vorgabestrang kommt es zur Freisetzung von Pyrophosphat (PPi). Dieses freigesetzte PPi kann mit Hilfe einer Enzymkaskade in einen messbaren Lichtblitz umgewandelt werden. Die graphische Darstellung der Lichtimpulse bildet ein Pyrogramm mit der zu untersuchenden Basensequenz [95].

Im ersten Schritt wird an der Vakuumstation eine einzelsträngige DNA hergestellt. Dazu wird das Prinzip der Affinitätschromatographie eingesetzt. Es handelt sich hierbei um ein effektives Trennverfahren zur Isolierung von DNA aus komplexen Gemischen.

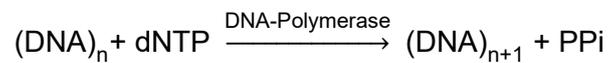
Durch einen Antikörper-Antigen-Komplex wird das biotinylierte PCR-Produkt zunächst an Beads gekoppelt. Bei Beads handelt es sich um Sepharose, also um quervernetzte Agarose, die als Ligand für Biotin dient. Das mit dem Biotin gekoppelte PCR-Produkt bindet kovalent an Sepharose. Durch den Einsatz von Ethanol 70% und Denaturation Solution kommt es zur Auftrennung des DNA-Doppelstrangs und Bildung einer einzelsträngigen DNA.

Nun können Verunreinigungen durch nicht kovalent an Sepharose gebundene Substanzen abgewaschen und die neutralisierte DNA durch Veränderung der Pufferzusammensetzung von den Beads eluiert werden. Dies geschieht mit Hilfe von Wash Buffer. Im nächsten Schritt wird die isolierte einzelsträngige DNA in die Reaktionsplatte mit dem in Annealing Buffer gelösten Pyrosequenzierungsprimer entlassen. Durch kurzzeitige Hitzeeinwirkung kommt es zum Annealing des Primers an das DNA-Template [96].

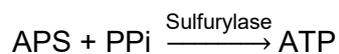
Die einzelsträngige und an den Pyrosequenzierungsprimer gekoppelte DNA wird nun in den Pyrosequenzierer gegeben, wo sie mit einem Substrat- und Enzymgemisch inkubiert wird.

Das Substratgemisch beinhaltet Adenosin-5'-Pyrophosphat (APS) und Luciferin. Das Enzymgemisch enthält DNA-Polymerase, Sulfurylase, Luciferase, Apyrase sowie single-stranded binding protein (ssb) zur Vermeidung von Sekundärstrukturen in der Ausgangs-DNA. Als Nukleotide dienen Desoxyadenosin-alpha-thio-triphosphat (dATP α S), dCTP, dGTP und dTTP. Es wird dATP α S anstelle des natürlich vorkommenden dATP verwendet, da es von der Luciferase nicht abgebaut werden kann. Durch die DNA-Polymerase kann es jedoch problemlos erkannt werden.

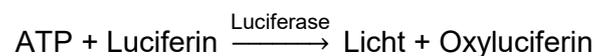
Im nächsten Schritt werden die Nukleotide nacheinander zur Reaktion mit dem DNA-Template gegeben. Ist eines der Nukleotide komplementär zur Ausgangs-DNA, wird diese durch die DNA-Polymerase elongiert und Pyrophosphat freigesetzt.



Anschließend wird ATP freigesetzt. Dies geschieht mit Hilfe der Sulfurylase aus APS und PPi.

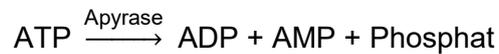
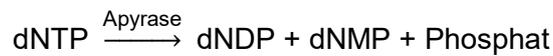


Diese Bereitstellung von ATP führt zur Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin durch die Luciferase. Dabei entsteht ein sichtbarer Lichtimpuls.



Jeder Lichtimpuls ist proportional zur verbrauchten ATP-Menge und damit zur Menge der eingebauten Nukleotide. Er wird als Gipfel im Pyrogramm sichtbar gemacht.

Zur Vermeidung von fehlerhaften Gipfeln im Pyrogramm baut das Enzym Apyrase nicht eingebaute Nukleotide und ATP nach jedem Schritt ab.



Erst nach diesen Abbaureaktionen wird vom Pyrosequenzierer das nächste Nukleotid hinzugefügt.

Die Erstellung des obigen Textabschnitts erfolgte mit Hilfe der Handbücher von Qiagen GmbH, Hilden [97], [98], [99].

2.9.2 Auswertung des Pyrogramms

Am Ende des Sequenzierungsverfahrens kann die Basenabfolge im Pyrogramm abgelesen werden. Die im Folgenden genannten Beispiele zeigen die wildtypischen Basenabfolgen für die untersuchten NRAS-Gene und wurden mit Hilfe der Software PyroMark Q24 2.0.6. von Qiagen GmbH, Hilden erstellt. Auf der y-Achse ist die emittierte Lichtmenge angegeben, auf der x-Achse wird zunächst das verwendete Enzym (E) und Substrat (S) und danach das dispensierte Nukleotid (A, G, T, C) abgebildet.

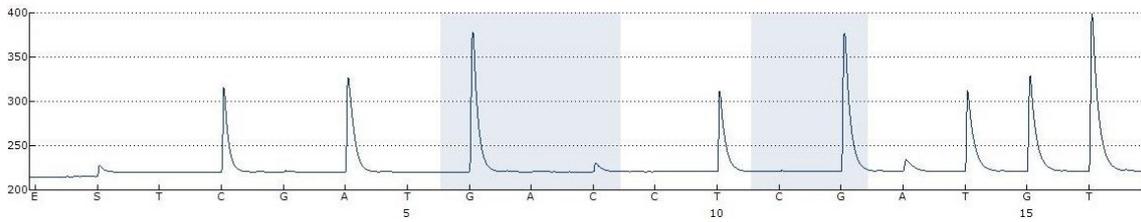


Abbildung 9: Pyrogramm NRAS Exon 2 (Codon 12, 13) Wildtyp

Die Basenabfolge lautet in diesem Fall CAGGTGGTGT.

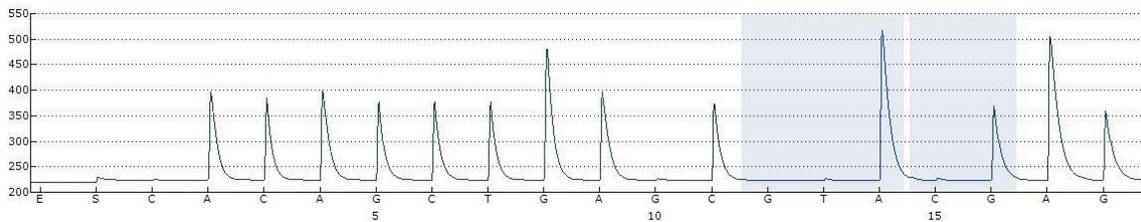


Abbildung 10: Pyrogramm NRAS Exon 3 (Codon 59, 61) Wildtyp

Die Basenabfolge lautet in diesem Fall ACAGCTGGACAAGAAG.

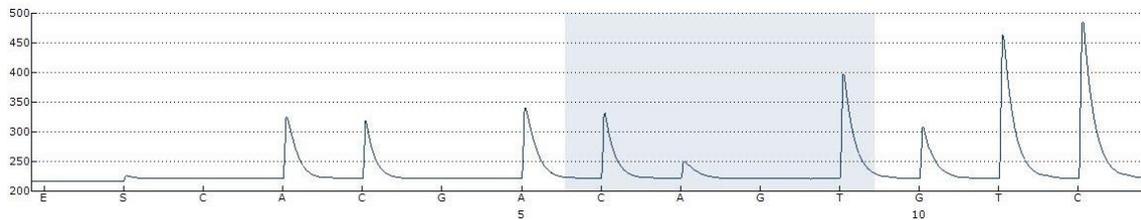


Abbildung 11: Pyrogramm NRAS Exon 4 (Codon 117) Wildtyp

Die Basenabfolge lautet in diesem Fall ACACTGTTCC.

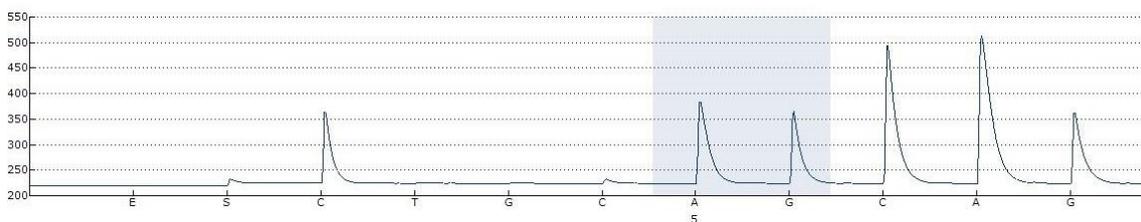


Abbildung 12: Pyrogramm NRAS Exon 4 (Codon 146) Wildtyp

Die Basenabfolge lautet in diesem Fall CAGCCAAG.

2.9.3 Technische Durchführung der Pyrosequenzierung

Zunächst wurde ein Beadsmix nach folgendem Schema angesetzt.

Beads	24,0 μ l
Binding Buffer	960 μ l
H ₂ O	576 μ l

Tabelle 7: Beadsmix für 24 Pyrosequenzierungsansätze

Jeweils 65 μ l des Beadsmixes sowie 15 μ l des PCR-Produktes pro Ansatz konnten jetzt in die 24 Nöpfchen der Platte für die Beads pipettiert werden. Anschließend wurde die Platte für 10 Minuten bei 1400 rpm zur Inkubation auf den Schüttler gegeben. Der 100 μ M Primer für die Pyrosequenzierung wurde mit Hilfe von Annealing Buffer auf einen 3 μ M Primer verdünnt. Dieser verdünnte Primer (3 μ M) diente als Grundlage für den folgenden Primermix.

Pyrosequenzierungsprimer (3 μ M)	60,0 μ l
Annealing Buffer	540 μ l

Tabelle 8: Primermix für 24 Pyrosequenzierungsansätze

Jetzt wurden jeweils 25 μ l des Primermixes pro Ansatz in die 24 Nöpfchen der Platte für den Pyrosequenzierungsprimer pipettiert. Nach Befüllen der Vakuumstation und Spülen der Vakuumfilterprobe mit H₂O saugte diese den inkubierten Beadsmix auf und wurde nacheinander durch die Reagenzien (Ethanol 70%, Denaturation Solution, Wash Buffer) in der Vakuumstation geführt. Zum Schluss wurde die ausgeschaltete Filterprobe auf die Primerplatte aufgesetzt. Die Primerplatte wurde nun für 2 Minuten bei 80°C auf der Heizplatte inkubiert und kühlte anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur ab. Das Befüllen des Cartridges mit dem Enzymgemisch, dem Substratgemisch und den Nukleotiden erfolgte laut den Vorlagen des Protokolls der Software PyroMark Q24 2.0.6. Auf einem USB-Stick wurde das auszuführende Pyrosequenzierungsprogramm gespeichert und nun mit Hilfe des PyroMark Q24 ausgeführt.

2.10 Immunhistochemisches Nachweisverfahren von SMAD4

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen lässt sich das Vorkommen von Proteinen in Zellstrukturen nachweisen. Zunächst findet eine Antigen-Antikörper-Reaktion statt, bei der ein mono- oder polyklonaler Antikörper an das gesuchte Epitop bindet. In diesem Fall ist das Epitop das SMAD4-Protein im Zytosol pankreatischer Tumorzellen. Durch immunologische oder chemische Reaktionen kommt es zur Bindung von Farbstoffen an den Primärantikörper, die dann mikroskopisch im Schnittpräparat detektiert werden können. Die Immunhistochemie stellt eine äußerst spezifische und sensitive Methode zur Bestimmung der SMAD4-Expression beim PDAC dar [100].

Bei der mikroskopischen Identifizierung der Tumorzellen zeigten sich heterogen wachsende Tumore, die oft von zahlreichen Stroma- und Entzündungszellen umgeben waren. Auf den schwach angefärbten immunhistochemischen Schnittpräparaten gestaltete sich die Tumoridentifizierung daher als nicht immer trivial. Zur eindeutigen Auffindung des Tumorgewebes und Abgrenzung vom Parenchym halfen die korrespondierenden HE-gefärbten Schnittpräparate. Histologisch zeichneten sich die Tumorzellen durch unvollständige und unregelmäßige drüsige Strukturen mit geringer Schleimbildung, Epitheltypen mit vakuolisiertem Drüsenepithel sowie durch polymorphe und hyperchrome Zellkerne aus. Außerdem zeigten sich eine erhöhte Mitoserate und eine Tumorzellinfiltration in das Stroma. Die Tumordrüsen waren teilweise mit neutrophilen Granulozyten angefüllt und der Mitte des Tumorgewebes bildeten sich häufig Nekrosezonen.

Die vom Antikörper angefärbten und damit SMAD4-positiven Tumorzellen färbten sich bräunlich. Nicht angefärbte oder nur leicht fleckig angefärbte Präparate wurden als SMAD4-negativ eingestuft. Die nicht angefärbten und damit SMAD4-negativen Tumorzellen erschienen in blassem Hellblau unter dem Mikroskop. Ein Farbabgleich mit dem die Tumorzellen umgebenden intakten Pankreas- oder Lebergewebe, das sich meist stark bräunlich anfärbte, trug ebenfalls zur Einstufung des Tumorgewebes in SMAD-negativ und SMAD-positiv bei.

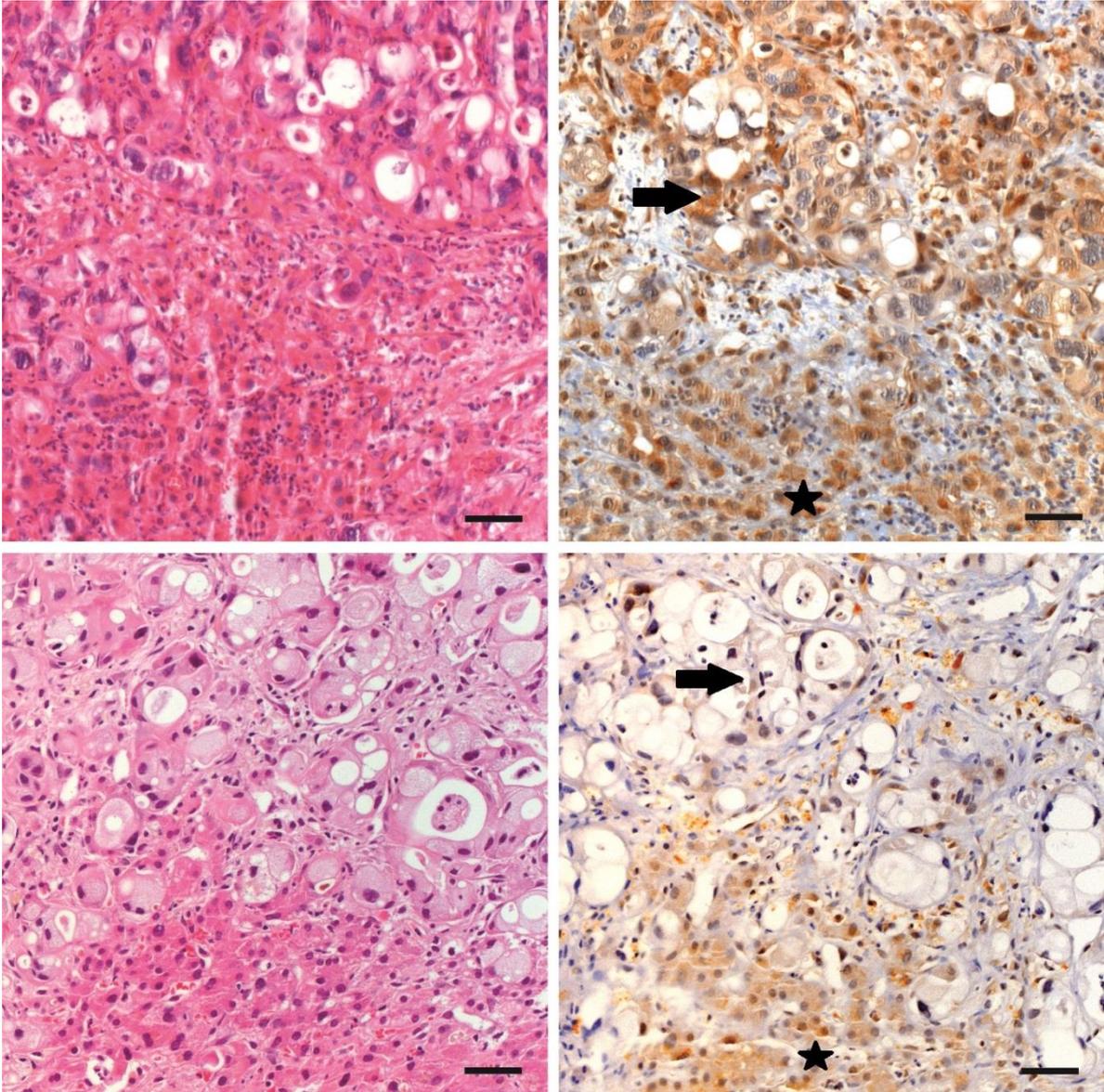


Abbildung 13: Immunhistochemisches Nachweisverfahren von SMAD4. Konventionelle HE-Färbung und immunhistochemische Färbung für SMAD4 im Gewebe von Lebermetastasen duktaler Adenokarzinome des Pankreas. Während im angrenzenden Leberparenchym (*) die SMAD4-Expression durchwegs erhalten ist, zeigt sich im Tumorgewebe (->) ein SMAD4-Verlust (unten rechts) bzw. eine erhaltene SMAD4-Expression (oben rechts). 200-fache Vergrößerung. Maßstab=25 µm.

2.11 Statistische Datenauswertung

Die statistische Datenauswertung erfolgte mit der Statistiksoftware SPSS Version 23.0 von IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland. Dabei diente die Kaplan-Meier-Methode [101] zur Schätzung der Überlebensraten und Berechnung der Mediane für OS und PFS. Der Log-rank-Test [102], [103] wurde als Vergleichsmethode für Überlebenskurven benutzt. Für alle Berechnungen galt ein p -Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant. Mit Hilfe der Cox-Regression [104] konnten Hazard Ratios (HR) und 95%-Konfidenzintervalle (95%-CI) bestimmt werden. Zudem wurden Vierfeldertafeln und Chi-Quadrat-Test benutzt, um zu testen, ob zwei dichotome Merkmale statistisch unabhängig voneinander sind. Diese Methode diente auch zur Bestimmung der Verteilung dieser dichotomen Merkmale in zwei Gruppen [105].

3. Ergebnisse

3.1 Patienten

Patientenanzahl	160
Alter in Jahren	
Median	63
Range	36-83
Geschlecht	
Männlich	90 (56,3%)
Weiblich	70 (43,8%)
Karnofsky Performance Status (KPS)	
60%	2 (1,3%)
70%	20 (12,5%)
80%	40 (25,0%)
90%	62 (38,8%)
100%	24 (15,0%)
ohne Angabe	12 (7,5%)
Tumorlokalisierung	
Pankreaskopf	96 (60%)
Pankreaskörper	32 (20%)
Pankreasschwanz	30 (18,8%)
ohne Angabe	2 (1,3%)
Histologischer Typ	
Adenokarzinom	160 (100%)
Grading	
G1	2 (1,3%)
G2	62 (38,8%)
G3	73 (45,6%)
G4	2 (1,3%)
ohne Angabe	21 (13,1%)
Operative Therapie	
keine Resektion	123 (76,9%)
Resektion in kurativer Intention	37 (23,1%)
Erkrankungsstadium bei Beginn palliative Chemotherapie	
lokal fortgeschritten	15 (9,4%)
Metastasiert	145 (90,6%)
Metastasenlokalisierung	
nur Leber	77 (48,1%)
nur Lymphknoten	8 (5,0%)
nur Lunge	7 (4,4%)
nur Peritoneum	5 (3,1%)
Leber/ Lymphknoten	13 (8,1%)
Leber/ Lunge	12 (7,5%)
Leber/ Peritoneum	8 (5,0%)
Leber/ Knochen	1 (0,6%)
Leber/ Nebenniere	1 (0,6%)
Leber/ Milz	1 (0,6%)
Lunge/ abdominale Lymphknoten	1 (0,6%)
Leber/ Lunge/ Lymphknoten	2 (1,3%)
Leber/ Lunge/ Peritoneum	1 (0,6%)
Leber/ Lunge/ Knochen	2 (1,3%)
keine Metastasierung bei Beginn palliative Chemotherapie	14 (8,8%)
Sonstige	6 (3,8%)
ohne Angabe	1 (0,6%)
Palliative Erstlinienchemotherapie	
Gemcitabin	55 (34,4%)
Gemcitabin und Cisplatin	43 (26,9%)
Gemcitabin und Oxaliplatin	13 (8,1%)
Gemcitabin und Capecitabin	21 (13,1%)
Capecitabin	13 (8,1%)
Capecitabin und Oxaliplatin	12 (7,5%)
FOLFOX-6	3 (1,9%)

Tabelle 9: Patientencharakteristik

Die Untersuchungen konnten an 160 Patienten, die die Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten, durchgeführt werden. Das mediane Alter bei Aufnahme in die Studie betrug 63 Jahre (Range 36-83 Jahre). 90 Patienten (56,3%) waren männlich, 70 Patienten (43,8%) waren weiblich. Dabei zeigten 86 Patienten (53,8%) einen KPS von 90–100% und 62 Patienten (38,8%) einen KPS von 60-80%. Die Tumoren waren bei 96 Patienten (60%) im Pankreaskopf, bei 32 Patienten (20%) im Pankreaskörper und bei 30 Patienten (18,8%) im Pankreasschwanz lokalisiert. Es wurden ausschließlich Karzinome vom histologischen Typ eines Adenokarzinoms untersucht. Hiervon waren 40,1% gut bis mäßig differenziert (G1, G2) und 46,9% schlecht differenziert oder undifferenziert (G3, G4). 37 Patienten (23,1%) erhielten initial eine operative Therapie in kurativer Intention. 145 Patienten (90,6%) wiesen bei Start der palliativen Therapie ein bereits metastasiertes Tumorstadium auf. Für die genaue Lokalisation der Metastasen siehe Tabelle 9. Abbildung 14 zeigt die Verteilung der häufigsten Metastasenlokalisationen. Die Leber war der häufigste Metastasierungsort. Bei 118 Erkrankten (73,8%) konnten Leberfiliae gefunden werden.

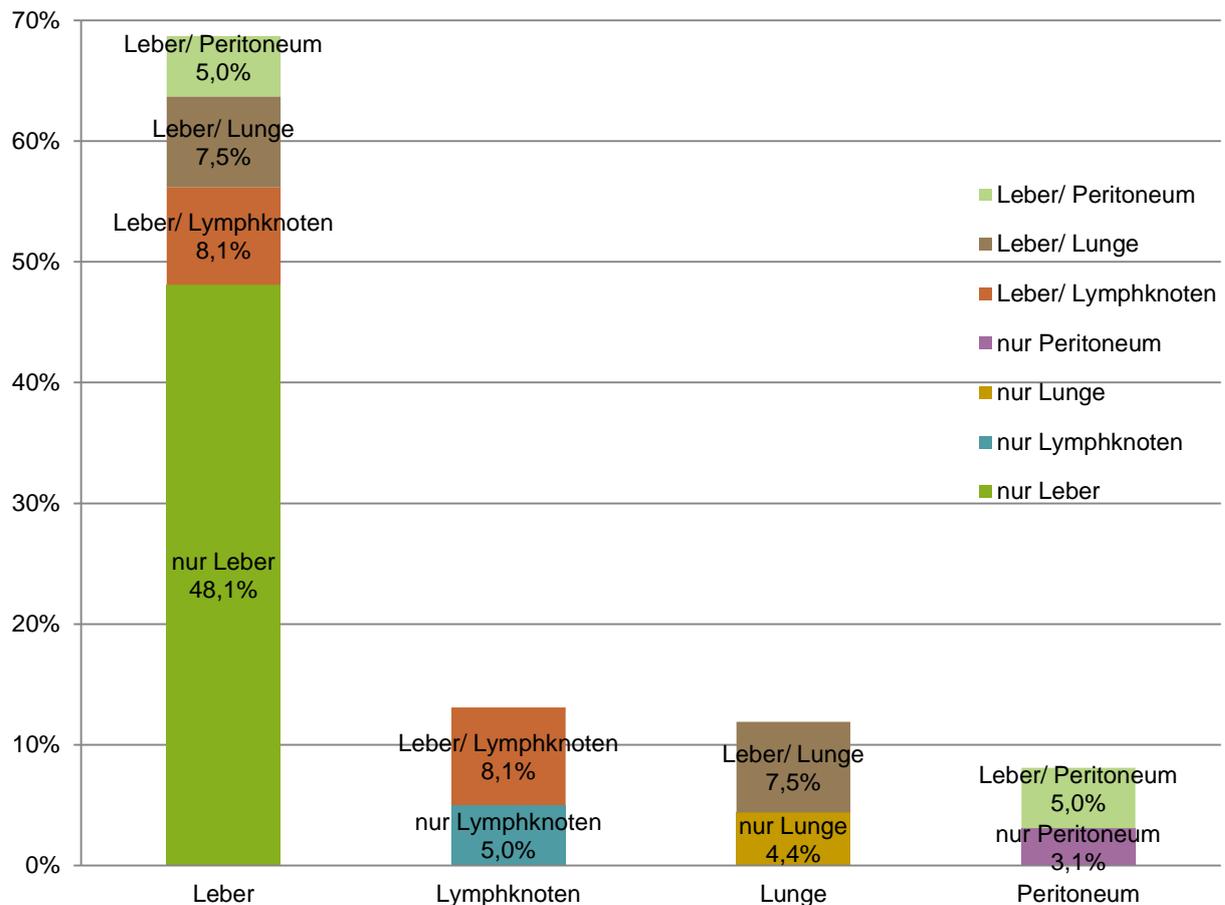


Abbildung 14: Häufigste Metastasenlokalisationen

Die angewendeten palliativen Erstlinientherapien zeigen Tabelle 9 und Abbildung 15. 55 Patienten (34,4%) erhielten eine GEM-Monotherapie. 56 Patienten (35,0%) wurden mit einer Kombinationstherapie aus GEM und Platinderivaten behandelt. 43 Patienten (26,9%) erhielten zusätzlich zu GEM Cisplatin und 13 Patienten (8,1%) Oxaliplatin. 21 Patienten (13,1%) wurden mit einer Kombination aus GEM und Capecitabin therapiert. Eine Capecitabin-Monotherapie wurde an 13 Erkrankten (8,1%) durchgeführt. Oxaliplatin war Kombinationspartner von Capecitabin bei 12 Patienten (7,5%). Das FOLFOX-6-Schema fand Anwendung bei nur 3 Erkrankten (1,9%).

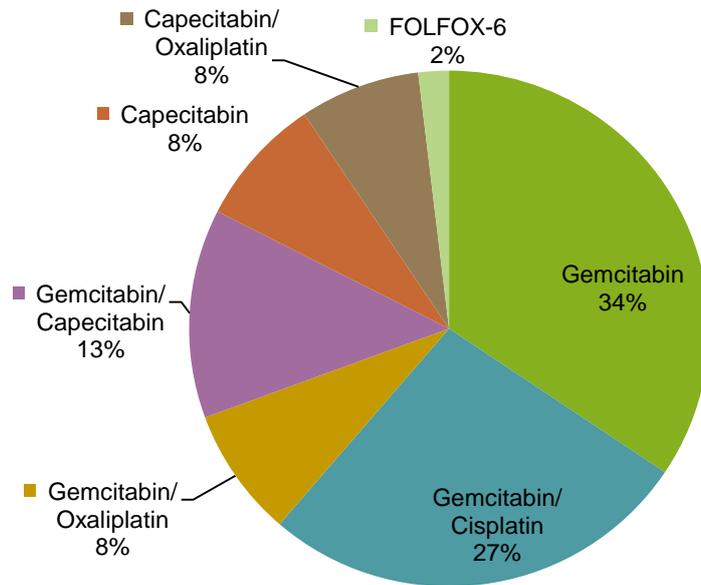


Abbildung 15: Palliative Erstlinienchemotherapie

3.2 Ergebnisse RAS

KRAS

Hier sind die Ergebnisse der Dissertation von Frau Sibylle Bächmann zu erwähnen. In ihrer Arbeit wurde die prädiktive und prognostische Bedeutung des KRAS-Mutationsstatus des in Abschnitt 3.1 beschriebenen Patientenkollektivs betrachtet.

Hierbei wiesen 79% der Fälle eine oder mehrere Mutationen im KRAS-Gen auf. 21% der Tumoren waren KRAS-Wildtyp. Dabei zeigten sich vorwiegend Mutationen im Exon 2 (Codon 12, 13) von KRAS (74%). Die häufigste Mutation (49%) war G12D (Austausch der Aminosäure Glycin gegen Aspartat), gefolgt von G12V (34%) und G12R (14%). 5% der Tumoren waren im Exon 3 (Codon 61) von KRAS mutiert. Keine Mutationen wurden im Exon 4 gefunden.

Es konnte kein signifikanter Unterschied des Gesamtüberlebens in Bezug auf den KRAS-Status (Wildtyp vs. KRAS-Mutation) gesehen werden (9,9 vs. 8,3 Monate; $p=0,70$). Einzelne Punktmutationstypen des Exon 2 zeigten einen unterschiedlichen Verlauf hinsichtlich des medianen Gesamtüberlebens (11,9 Monate für G12R-Mutationen, 8,3 Monate für G12D-Mutationen, 7,9 Monate für G12V-Mutationen; $p=0,86$) [106].

NRAS

In den durchgeführten molekularpathologischen Untersuchungen an dem in Abschnitt 3.1 dargestellten Patientenkollektiv von 160 Patienten konnten keine Mutationen im NRAS-Gen gefunden werden. In Exon 2 (Codon 12, 13), Exon 3 (Codon 59, 61) und Exon 4 (Codon 117, 146) zeigten sich ausschließlich NRAS-Wildtypen.

Diese Untersuchungen zeigen, dass NRAS-Mutationen beim PDAC im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten nicht von Relevanz sind. NRAS kommt daher weder als prädiktiver noch als prognostischer Biomarker für das PDAC in Frage.

3.3 Ergebnisse SMAD4

3.3.1 Statistische Datenauswertung

Das gesamte Kollektiv sowie verschiedene Subgruppen des Kollektivs wurden hinsichtlich der Mediane des Gesamtüberlebens (OS: overall survival) sowie des progressionsfreien Überlebens (PFS: progression free survival) in Bezug auf den SMAD4-Status analysiert.

Die Subgruppen unterschieden sich im Herkunftsort der Tumorproben (Primärtumor vs. Tumormetastase) sowie im Schema der palliativen Erstlinienchemotherapie (Fluoropyrimidin-basiert vs. GEM-basiert). Zu den GEM-basierten Chemotherapieschemata zählten GEM-Monotherapie, GEM in Kombination mit Cisplatin sowie GEM in Kombination mit Oxaliplatin. Die Fluoropyrimidin-basierten Chemotherapieschemata bildeten die beiden Regime Capecitabin-Monotherapie sowie Capecitabin in Kombination mit Oxaliplatin.

Zur Berechnung des Gesamtüberlebens wurde die Zeitspanne vom Beginn der palliativen Erstlinienchemotherapie bis zum Eintreten eines Todesereignisses betrachtet. Das progressionsfreie Überleben gab die Zeitspanne vom Beginn der palliativen Erstlinienchemotherapie bis zum Zeitpunkt der Tumorprogression an. Zur Bestimmung des Progresses wurden bildgebenden Verfahren herangezogen. Deren Beurteilung orientierte sich an den RECIST-Kriterien (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) [91].

3.3.2 Verteilung von SMAD4-negativen und SMAD4-positiven Tumoren

Für die immunhistochemischen Untersuchungen des SMAD4-Status (negativ vs. positiv) standen 143 Patientenproben (89,4%) des in Abschnitt 3.1 beschriebenen Kollektivs von 160 Patienten zur Verfügung. Tabelle 10 stellt die Verteilung von SMAD4-negativen und SMAD4-positiven Tumoren des Gesamtkollektivs sowie der betrachteten Subgruppen dar.

Von den 143 Proben konnte bei 92 Tumorschnitten (64,3%) ein Verlust der SMAD4-Expression gefunden werden. 51 Tumorschnitte (35,7%) zeigten eine positive SMAD4-Expression.

Die Proben (n=66), die direkt aus dem Primärtumor stammten, zeigten in 45 Fällen (68,2%) einen SMAD4-Verlust. In 21 Fällen (31,8%) konnte eine positive

SMAD4-Expression nachgewiesen werden. Bei den aus Metastasengewebe gewonnenen Proben (n=71) waren 42 Proben (59,2%) SMAD4-negativ. 29 Proben (40,8%) waren SMAD4-positiv.

Die mit GEM-basierten Chemotherapeutika behandelte Subgruppe (n=99) zeigte einen SMAD4-Verlust in 64 Fällen (64,6%). Eine Expression hingegen wurde bei 35 Tumoren (35,4%) festgestellt. Bei den mit Fluoropyrimidin-basierten Erstliniienchemotherapien behandelten Tumoren (n=25) waren 15 Tumoren (60,0%) SMAD4-negativ und 10 Proben (40,0%) SMAD4-positiv.

	n	SMAD4-negativ	SMAD4-positiv
Gesamtkollektiv	143	92 (64,3%)	51 (35,7%)
Tumorherkunft			
Primärtumor	66	45 (68,2%)	21 (31,8%)
Metastase	71	42 (59,2%)	29 (40,8%)
Erstliniienchemotherapie			
GEM-basiert	99	64 (64,6%)	35 (35,4%)
Fluoropyrimidin-basiert	25	15 (60,0%)	10 (40,0%)

Tabelle 10: Verteilung von SMAD4-negativen und SMAD4-positiven Tumoren

3.3.3 Korrelation des SMAD4-Status mit klinischen Variablen

Mittels Vierfeldertafeln und Qui-Quadrat-Test wurde getestet, ob die Verteilung der Merkmale SMAD4-negativ versus SMAD4-positiv in zwei Gruppen identisch ist. Hierbei wurden die Gruppen Geschlecht (männlich oder weiblich), KPS-Status (≥ 90 oder <90), Tumorstadium (lokal fortgeschritten oder metastasiert) und CA 19-9-Wert (< 1000 U/ml oder ≥ 1000 U/ml) betrachtet. Bei negativem p-Wert im Qui-Quadrat-Test in allen Gruppen liegt hier jeweils eine gleichmäßige Verteilung der Merkmale SMAD4-negativ versus SMAD4-positiv vor (siehe Tabelle 11).

	SMAD4- negativ	SMAD4- positiv	p-Wert (Chi- Quadrat-Test)
Geschlecht (n=143)			
männlich	55	29	0,734
weiblich	37	22	
KPS (n=133)			
≥ 90	53	23	0,315
< 90	35	22	
Tumorstadium (n=137)			
lokal fortgeschritten	11	4	0,442
metastasiert	81	47	
CA 19-9 (n=122)			
< 1000 U/ml	48	22	0,711
≥ 1000 U/ml	34	18	

Tabelle 11: Korrelation des SMAD4-Status mit klinischen Variablen

3.3.4 PFS und OS des gesamten Kollektivs

Es erfolgte zunächst die Berechnung des medianen PFS für das gesamte Kollektiv in Bezug auf den SMAD4-Status. 142 Patientenproben konnten in die Untersuchungen aufgenommen werden. Patienten mit SMAD4-negativen Tumoren zeigten einen statistisch signifikanten Vorteil bezogen auf das mediane PFS im Vergleich zu Patienten mit SMAD4-positiven Tumoren (7,03 vs. 5,85 Monate). Der Log-rank-Test ergab einen p-Wert von 0,038. Mit Hilfe der Cox-Regression konnte eine HR von 0,64 (95%-CI: 0,42-0,98) berechnet werden (Abbildung 16).

Es wurde das mediane OS für das gesamte Kollektiv (n=143) in Bezug auf den SMAD4-Status betrachtet. Hierbei unterschied sich das Gesamtüberleben der beiden Gruppen (SMAD4-positiv vs. SMAD4-negativ) nicht (7,82 vs. 8,48 Monate, p=0,656, HR=0,92, 95%-CI: 0,64-1,33) (Abbildung 17).

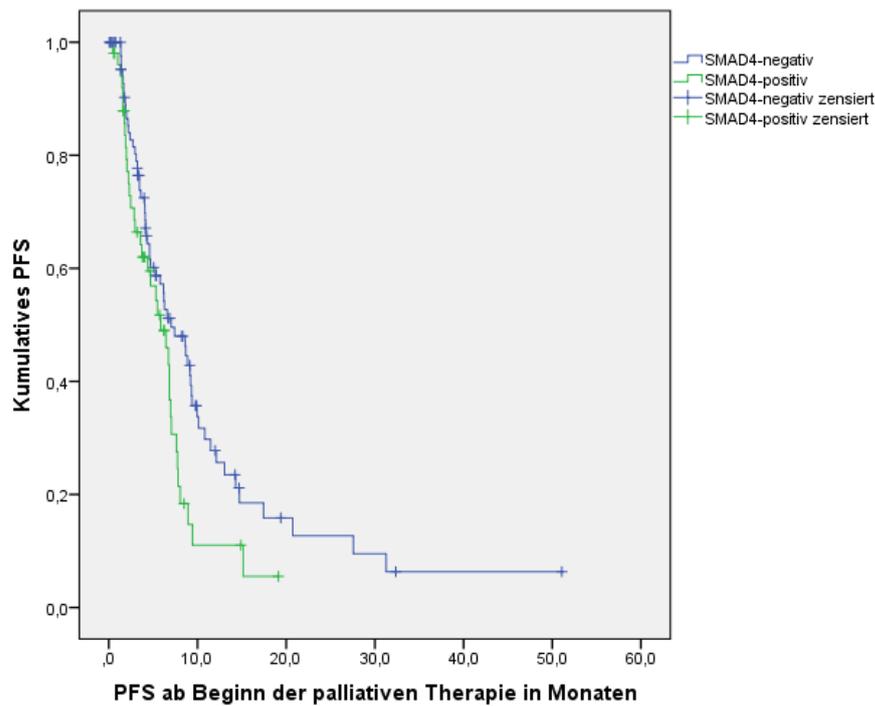


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Schätzer für das PFS des gesamten Kollektivs ab Beginn der palliativen Therapie in Bezug auf den SMAD4-Status; $n=142$; PFS 7,03 vs. 5,85 Monate; $p=0,038$

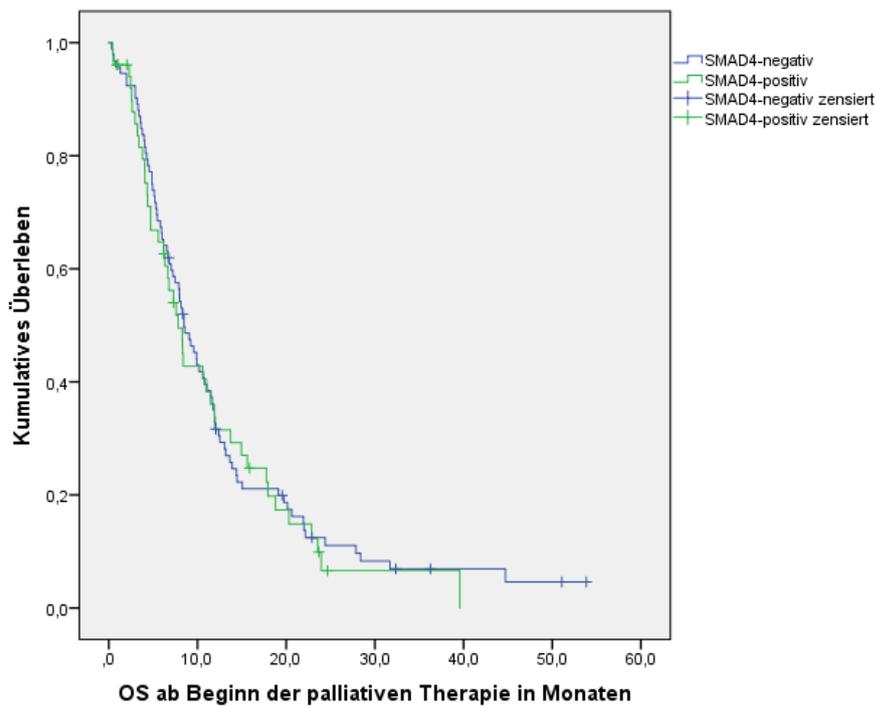


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Schätzer für das OS des gesamten Kollektivs ab Beginn der palliativen Therapie in Bezug auf den SMAD4-Status; $n=143$; OS 8,48 vs. 7,82 Monate; $p=0,656$

3.3.5 PFS und OS der nach Tumorherkunft gegliederten Subgruppen

Proben aus Primärtumor

Bei der Analyse des medianen PFS der Primärtumor-spezifischen Subgruppe (n=65) zeigte sich ein Trend für ein besseres PFS für Patienten mit SMAD4-negativen Tumoren (medianes PFS 9,36 vs. 6,74 Monate; $p=0,077$). Die HR lag bei 0,54 (95%-CI: 0,27-1,08).

Für das mediane OS wurde kein Unterschied in Bezug auf den SMAD4-Status gesehen (11,76 vs. 11,47 Monate). Der mittels Log-rank-Test ermittelte p-Wert lag bei 0,401. Die Cox-Regression ergab folgende Ergebnisse: HR=0,78; 95%-CI: 0,44-1,40.

Proben aus Metastasengewebe

Das mediane PFS in der Metastasen-Subgruppe (n=71) unterschied sich nicht hinsichtlich des SMAD-Status. Das mediane PFS betrug 5,29 Monate für SMAD-negative Tumoren und 5,32 Monate für SMAD-positive Tumoren ($p=0,454$; HR=0,81; 95%-CI: 0,46-1,42).

Die Subgruppe der aus Metastasengewebe gewonnenen Proben (n=71) zeigten keinen signifikanten Unterschied im OS in Bezug auf den SMAD4-Status. Bei der Betrachtung des OS zeigten SMAD4-negative Tumoren einen Median von 7,03 Monaten. Für SMAD4-positive Tumoren betrug dieser Wert 7,82 Monate ($p=0,413$). Die Cox-Regression zeigte eine HR von 1,23 (95%-CI: 0,75-2,04).

3.3.6 PFS und OS der nach Chemotherapieschema gegliederten Subgruppen

GEM-basierte Chemotherapie

Für das mediane PFS der GEM-Subgruppe (n=98) in Bezug auf den SMAD4-Status konnte ein statistisch signifikanter Vorteil für die SMAD4-negativen Tumorproben gesehen werden. Das mediane PFS betrug 8,87 vs. 6,83 Monate ($p=0,037$). Die HR lag bei 0,56 (95%-CI: 0,32-0,97) (Abbildung 18).

Kein Unterschied zeigte sich für das OS der Subgruppe der GEM-basierten Chemotherapien (n=99) in Bezug auf den SMAD4-Status (8,28 vs. 8,28 Monate; $p=0,772$; HR=0,94; 95%-CI: 0,60-1,47).

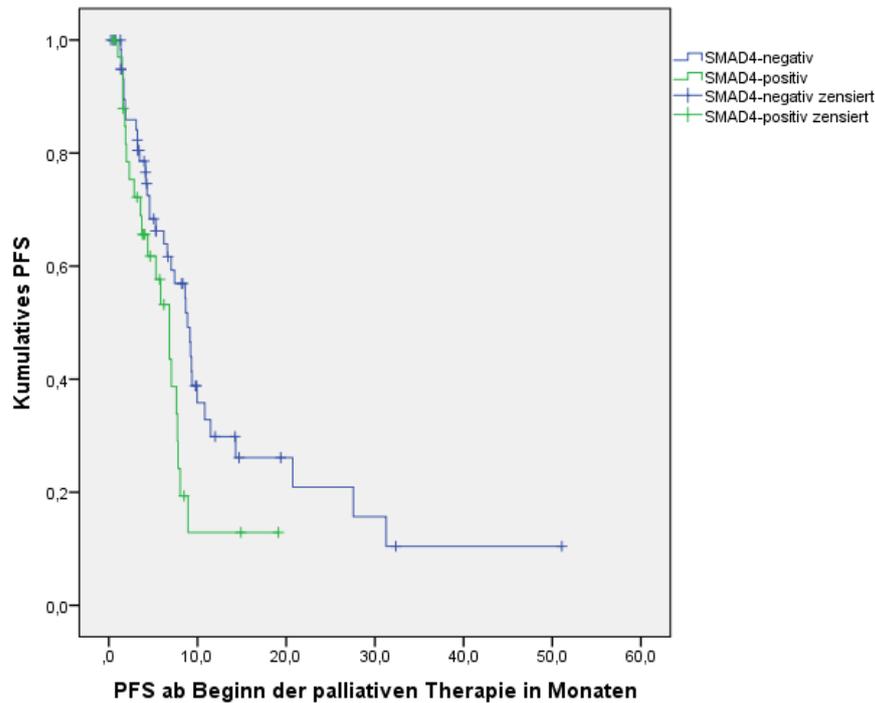


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Schätzer für das PFS der GEM Subgruppe ab Beginn der palliativen Therapie in Bezug auf den SMAD4-Status; $n=98$; PFS 8,87 vs. 6,83 Monate; $p=0,037$

Fluoropyrimidin-basierte Chemotherapie

In der Gruppe der mit Fluoropyrimidin-basierten Chemotherapien behandelten Tumoren ($n=25$) zeigte sich kein Unterschied für SMAD-positive Tumoren und SMAD-negative Tumoren (6,74 vs. 3,61 Monate, $p=0,185$). Die HR lag bei 1,91 (95%-CI: 0,72-5,05) (Abbildung 19).

In der gleichen Subgruppe ($n=25$) lag das mediane OS für SMAD-positive Tumoren bei 11,47 Monaten im Vergleich zu 7,23 Monaten für SMAD4-negative Tumoren, $p=0,104$. Die Cox-Regression ergab folgende Ergebnisse: $HR=2,12$; 95%-CI: 0,84-5,36 (Abbildung 20).

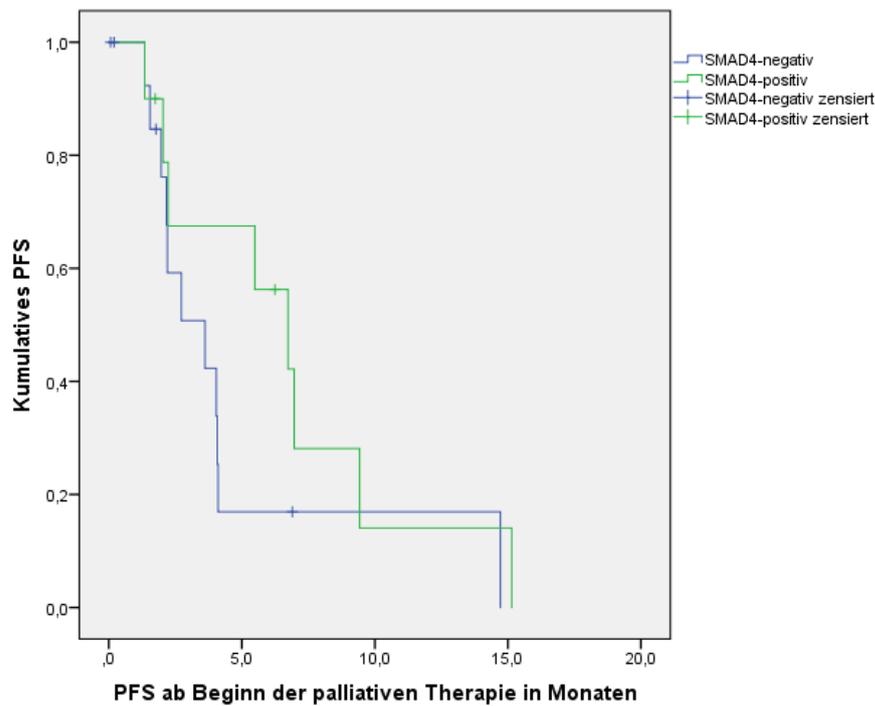


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Schätzer für das PFS der Fluoropyrimidin-Subgruppe ab Beginn der palliativen Therapie in Bezug auf den SMAD4-Status; $n=25$; OS 3,61 vs. 6,74 Monate; $p=0,185$

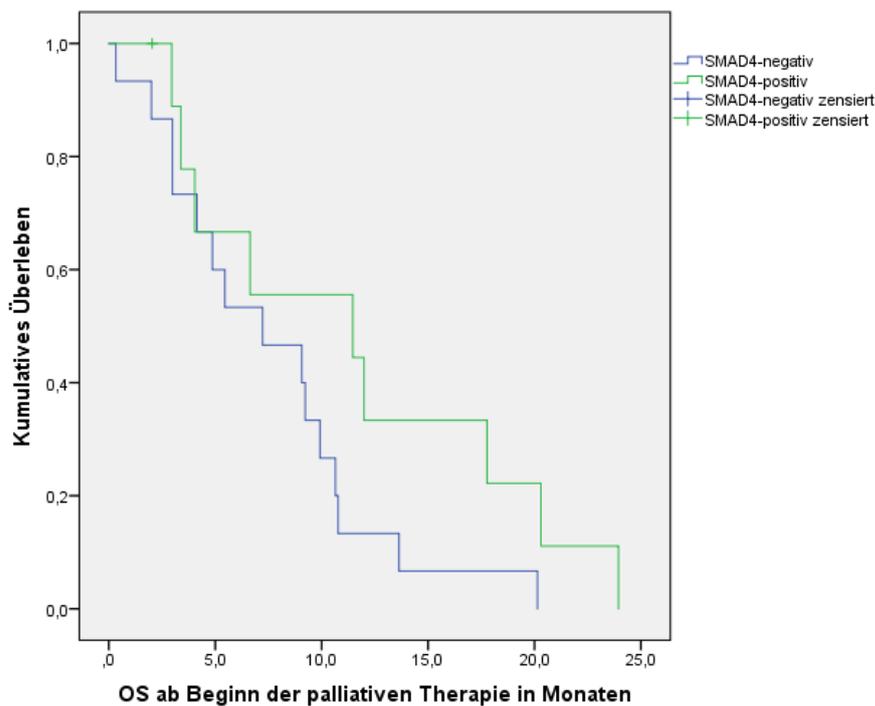


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Schätzer für das OS der Fluoropyrimidin-Subgruppe ab Beginn der palliativen Therapie in Bezug auf den SMAD4-Status; $n=25$; OS 7,23 vs. 11,47 Monate; $p=0,104$

3.3.7 Tabellarische Zusammenfassung medianes PFS und OS

	Medianes PFS SMAD4-negativ	Medianes PFS SMAD4-positiv	p-Wert
Gesamtkollektiv	7,03	5,85	0,038
Tumorherkunft			
Primärtumor	9,36	6,74	0,077
Metastasen	5,29	5,32	0,454
Erstlinienchemotherapie			
GEM-basiert	8,87	6,83	0,037
Fluoropyrimidin-basiert	3,61	6,74	0,185

Tabelle 12: Zusammenfassung medianes PFS in Monaten

	Medianes OS SMAD4-negativ	Medianes OS SMAD4-positiv	p-Wert
Gesamtkollektiv	8,48	7,82	0,656
Tumorherkunft			
Primärtumor	11,76	11,47	0,401
Metastasen	7,03	7,82	0,413
Erstlinienchemotherapie			
GEM-basiert	8,28	8,28	0,772
Fluoropyrimidin-basiert	7,23	11,47	0,104

Tabelle 13: Zusammenfassung medianes OS in Monaten

4. Diskussion

4.1 RAS

In dieser Arbeit wurde der RAS-Mutationsstatus an einem Patientenkollektiv mit fortgeschrittenem PDAC betrachtet. Keiner der Patienten wurde mit EGFR-Inhibitoren therapiert. Es wurden also keine Substanzen verwendet, die auf durch Proteine der RAS-Familie gesteuerte Signalwege einwirken. So konnte gezielt der Frage nachgegangen werden, ob RAS als prognostischer Biomarker für das PDAC geeignet ist. Insbesondere für NRAS wurden nach derzeitigem Wissensstand bislang keine vergleichbaren Betrachtungen beim fortgeschrittenen PDAC durchgeführt.

Das Interesse am prognostischen und prädiktiven Charakter von NRAS resultierte aus Forschungen am kolorektalen Karzinom. Dabei wurde die RAS-Mutation als negativ prädiktiver Faktor für das Ansprechen von anti-EGFR-gerichteter Therapie beschrieben. Dieser Zusammenhang beim kolorektalen Karzinom konnte zunächst für KRAS-Mutationen gezeigt werden. Ein signifikant besseres Ansprechen auf eine gegen EGFR gerichtete Therapie mit Panitumumab wurde hier für KRAS-Wildtypen im Gegensatz zu KRAS-mutierten Tumoren nachgewiesen [58], [59], [61]. Der RAS-Status hat hier also eine prognostische und prädiktive Relevanz.

KRAS

Bezüglich der Rolle von KRAS als Biomarker beim fortgeschrittenen PDAC beschäftigt sich die Dissertation von Frau Sibylle Bächmann sowie die zugehörige Publikation von Haas et al. [106]. Die Tumoren mit KRAS-Wildtypen und die KRAS-mutierten Tumoren unterschieden sich hier nicht signifikant in Bezug auf das Gesamtüberleben. KRAS wird nicht als prognostischer Biomarker vorgeschlagen.

Im Zuge der AIO-PK0104-Studie aus dem Jahr 2013 kamen Boeck et al. [62] und Heinemann et al. [64] zu dem Ergebnis, dass ein KRAS-Wildtypstatus mit einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben einherging (7,9 vs. 5,7 Monate, $p=0,005$). Allerdings hatten hier im Gegensatz zu dem Kollektiv der vorliegenden Arbeit alle Patienten eine Therapie mit Erlotinib erhalten. Die Frage nach der Rolle von KRAS als prädiktiver oder prognostischer Biomarker blieb in in der AIO-PK0104-Studie also offen.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen der AIO-PK0104-Studie und der hier vorliegenden explorativen Studie kann KRAS eine eher prädiktive Rolle in Bezug auf das Ansprechen von Erlotinib zugewiesen werden.

NRAS

In dieser Arbeit wurden keine Mutationen im NRAS-Gen gefunden. Daher konnte hier schlussendlich NRAS sowohl als prognostischer als auch als prädiktiver Biomarker für das PDAC ausgeschlossen werden.

4.2 SMAD4

Beim PDAC ist eine Inaktivierung des SMAD4-Gens in 55% der Fälle beschrieben [70], [107]. Dies betrifft alle Erkrankungsstadien. Bei der Betrachtung der SMAD4-Status beim PDAC sollten jedoch drei Erkrankungsstadien unterschieden werden: resektable lokal begrenzte Tumoren, lokal fortgeschrittene aber nicht resektable Tumoren und metastasierte Tumoren.

Für das resektable PDAC liegen kontroverse Studienergebnisse bezüglich der prognostischen Aussagekraft des SMAD4-Status vor. Tascilar et al. [70], Oshima et al. [73] und Blackford et al. [74] schlugen eine SMAD4-Negativität als negativen prognostischen Biomarker für das resektable PDAC vor. Im Gegensatz hierzu veröffentlichten Biankin et al. eine Studie über Vorteile eines SMAD4-Verlustes in Hinblick auf das Gesamtüberleben. Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen SMAD4-Verlust und Tumorsektabilität hergestellt werden. 58% dieser Tumoren waren resektabel. Bei den Tumoren mit SMAD4-Positivität lag dieser Anteil nur bei 17% [108].

Die kontroverse Diskussion über SMAD4 als prognostischer Biomarker beim PDAC war auch Bestandteil einer Metaanalyse von 14 Studien an überwiegend resektablem PDAC. An 1762 Patienten mit PDAC untersuchten Shugang et al. 2016 die Diskrepanzen über die prognostische Bedeutung von SMAD4 für das PDAC. Dabei konnten sie einen SMAD4-Verlust mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziieren. Die zusammengefasste univariate HR betrug 1,20 (95% CI: 1,03-1,40). Die multivariate HR lag bei 1,88 (95% CI: 1,31-2,70). Sie identifizierten einen SMAD4-Verlust also als negativen prognostischen Biomarker [109]. Die große

Patientenanzahl dieser Metaanalyse spricht dafür, SMAD4-Positivität eher als positiv prognostischen Biomarker für das resektable PDAC in Betracht zu ziehen.

Bei Betrachtung von ausschließlich fortgeschrittenen Tumoren (lokal fortgeschritten aber nicht resektable Tumoren und metastasierte Tumoren) könnten die Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit zugunsten der SMAD4-negativen Tumoren ausfallen. Denn der prognostische Wert von SMAD4 unterscheidet sich möglicherweise für das resektable und das fortgeschrittene PDAC.

Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv von Patientin mit fortgeschrittenem PDAC beinhaltetete größtenteils Patientin mit metastasierten Tumoren (91%). Nur 9% der Tumoren waren nicht metastasiert, aber lokal fortgeschritten und nicht resektabel. Hier lag der prozentuale Anteil der Tumoren ohne immunhistochemische SMAD4-Expression bei 64,3%. Auch Iacobuzio-Donahue et al. fanden in ihrer Studie an Patienten mit fortgeschrittenem PDAC 63% Tumoren mit SMAD4-Verlust [72]. Insbesondere beim fortgeschrittenen PDAC scheint es daher etwas häufiger zu einem Verlust von SMAD4 zu kommen.

In der vorliegenden Arbeit an überwiegend metastasierten Tumoren konnte für SMAD4-negatives PDAC kein statistisch signifikanter Vorteil beim medianen OS festgestellt werden (8,48 vs. 7,82 Monate; $p=0,656$). Dagegen zeigten sich für das mediane PFS Vorteile für einen SMAD4-Verlust (7,03 vs. 5,85 Monate; $p=0,038$). Diese Ergebnisse für das PFS waren statistisch signifikant. Eine fehlende SMAD4-Expression könnte hinsichtlich dieser Resultate also als positiv prognostischer Biomarker hinsichtlich des PFS bei fortgeschrittenem PDAC in Betracht gezogen werden. Die Relevanz von SMAD4 als prognostischer Biomarker für das fortgeschrittene PDAC sollte noch weiter evaluiert werden.

Zudem bleibt noch die Rolle von SMAD4 als prädiktiver Biomarker für das fortgeschrittene PDAC zu evaluieren. In dieser Arbeit zeigte sich unter einer GEM-basierten Erstlinienchemotherapie kein Unterschied im medianen OS hinsichtlich des SMAD4-Status (8,28 vs. 8,28 Monate; $p=0,772$). SMAD4 spielte hier keine Rolle als prädiktiver Biomarker. Allerdings wiesen SMAD4-positive Tumoren ein schlechteres medianes PFS unter einer GEM-basierten Therapie auf (8,87 vs. 6,83 Monate). Bei einem p-Wert von 0,037 ist dieses Ergebnis statistisch signifikant. SMAD4-Verlust könnte also als prädiktiver Marker hinsichtlich des PFS unter einer GEM-basierten Chemotherapie bei fortgeschrittenem PDAC angesehen werden.

Auch Bachet et al. assoziierten SMAD4-Negativität mit einem verbesserten Ansprechen auf eine GEM-basierte Therapie. In einer multivariaten Analyse profitierten SMAD4-negative Patienten von einer Therapie mit GEM (HR=0.59; 95%-CI: 0.42-0.82; p=0,002). Sie sahen einen SMAD4-Verlust demnach als positiven prädiktiven Biomarker für eine adjuvante GEM-basierte Chemotherapie an [75].

In der vorliegenden Arbeit lag das mediane OS bei 11,47 Monaten für SMAD4-positive Tumoren unter einer Fluoropyrimidin-basierten Therapie. SMAD4-negative Tumoren zeigten ein OS von 7,23 Monaten (p=0,104). Für SMAD4-positive Tumoren zeigte sich ein medianes PFS von 6,74 Monaten. Für SMAD4-negative Tumoren lag das mediane PFS bei 3,61 Monaten (p=0,185). Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht gezeigt werden. Dies liegt wahrscheinlich an der geringen Fallzahl (n=25) der Fluoropyrimidin-Gruppe und damit der fehlenden statistischen Power dieser Subgruppenanalyse.

Es bleibt also offen und noch in Studien mit größeren Fallzahlen zu eruieren, ob SMAD4-Positivität als prädiktiver Biomarker für eine Fluoropyrimidin-basierte Chemotherapie hinsichtlich des OS und des PFS bei fortgeschrittenem PDAC betrachtet werden kann.

Zusammenfassend zeigten in dem hier betrachteten Kollektiv SMAD4-negative Tumoren ein längeres medianes Gesamtüberleben unter Einsatz von GEM-basierten Chemotherapien im Vergleich zum Einsatz von Fluoropyrimidin-basierten Chemotherapien. Das mediane OS lag bei 7,23 Monaten vs. 8,28 Monaten. Auch für das mediane PFS der SMAD4-negativen Tumoren zeigten sich Vorteile für eine GEM-basierte Therapie (8,87 vs. 3,61 Monate). SMAD4-positive Tumoren profitierten hinsichtlich des medianen OS von einer Fluoropyrimidin-basierten Therapie im Gegensatz zu einer GEM-Therapie (11,47 vs. 8,28 Monate). Für das PFS zeigten sich diese Unterschiede nicht. Hier war das PFS minimal länger unter einer GEM-Therapie (6,83 vs. 6,74 Monate). Bei negativem SMAD4-Status wirkte sich eine GEM-basierte Therapie also eher günstig auf das OS und PFS aus, bei positivem SMAD4-Status war eine Fluoropyrimidin-basierte Therapie von deutlichem Vorteil hinsichtlich des OS aber von minimalem Nachteil hinsichtlich des PFS.

4.3 Personalisierte Therapie als Behandlungskonzept der Zukunft

Die oben erwähnte ausgeprägte genetische Heterogenität beim PDAC bietet zahlreiche vielversprechende Ansatzpunkte für eine personalisierte Tumorthherapie. So kann die Vielzahl an molekularen Angriffspunkten zur Anwendung von individualisierten Therapien genutzt werden. Mit Ausnahme des Tyrosinkinaseinhibitors Erlotinib sind derzeit jedoch noch keine molekulargerichteten Behandlungskonzepte für das PDAC zugelassen. Zytotoxische Chemotherapien bilden derzeit den Goldstandard in der Behandlung des fortgeschrittenen PDAC [110]. Allerdings werden innovative Behandlungskonzepte für das PDAC dringend benötigt.

Genomsequenzierung und die Analyse von Kopiezahlvariationen ermöglichen die Identifizierung von genetischen Veränderungen beim PDAC. Diese wachsenden Erkenntnisse über die an der Karzinogenese beteiligten Gene bilden die Basis der personalisierten Therapie [111]. Campbell et al. konnten 2010 mit Hilfe von next-generation sequencing Techniken an 13 PDAC-Patientenproben zeigen, dass sich Art und Anzahl der Mutationen von Patient zu Patient unterschieden. Über 50% der Genveränderungen konnten dabei schon zu Beginn der Tumorgenese identifiziert werden und waren sowohl im Primärtumor als auch im Metastasengewebe zu finden [112]. Derartige frühe und individuell verschiedene Genveränderungen bieten mögliche Angriffspunkte für die Pharmakotherapie.

Allerdings ergeben sich Schwierigkeiten in einer rechtzeitigen Diagnose dieser genetischen Alterationen beim individuellen Patienten. Diese betreffen unter anderem die Probengewinnung und –verarbeitung. Beim nicht operablen fortgeschrittenen PDAC spielen die Erreichbarkeit und Größe des Tumorgewebes eine entscheidende Rolle für den Biopsieerfolg. Zudem weist das PDAC ein sehr heterogenes Tumorwachstum mit zahlreichen Stroma- und Entzündungszellen und damit eines hypozellulären Tumoranteils im Gewebe auf, wodurch die Gewinnung von ausreichend Tumor-DNA erschwert ist. Auch liegt oft eine Zeitspanne von mehreren Wochen von der Probengewinnung bis zum Vorliegen der Ergebnisse der molekularen Analysen vor. Der Beginn einer personalisierten Therapie kann dadurch verzögert werden. Insbesondere in Anbetracht der raschen Tumorprogredienz stellt dieser Zeitfaktor einen erheblichen Nachteil dar [113].

5. Zusammenfassung

Das Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) geht seit Jahrzehnten mit einer beinahe unverändert schlechten Prognose einher. Die Inzidenz- und Mortalitätsraten halten sich nahezu die Waage. Bislang konnten noch keine relevanten prädiktiven oder prognostischen Biomarker etabliert werden. Sie könnten in Zukunft vielversprechende und dringend benötigte prognoseverbessernde Ansatzpunkte für zielgerichtete molekulare Therapien bieten.

Diese Arbeit beschäftigte sich in einer explorativen Analyse mit der Rolle des Onkogens NRAS und des Tumorsuppressorgens SMAD4 bei fortgeschrittenem PDAC. Es wurden hierbei vorwiegend metastasierte Tumoren betrachtet (91%), der Rest der Tumoren war lokal fortgeschritten und nicht resektabel. Es stellte sich die Frage inwieweit sie als prognostische oder prädiktive Biomarker für das fortgeschrittene PDAC von Bedeutung sind.

Die Analyse des NRAS-Mutationsstatus zeigte in allen untersuchten Exonsequenzen ausschließlich NRAS-Wildtypen. Damit kann NRAS sowohl als prognostischer als auch als prädiktiver Biomarker für das fortgeschrittene PDAC ausgeschlossen werden.

Bei der immunhistochemischen Bestimmung der SMAD4-Expression zeigte sich ein SMAD4-Verlust bei 64,3% der untersuchten Tumorproben (n=143). Nach Auswertung der Ergebnisse zeigte sich ein statistisch signifikant verlängertes PFS für Patienten mit SMAD-negativen Tumoren (7,03 vs. 5,85 Monate, p=0,038). Ein SMAD-Verlust könnte also als prognostischer Biomarker für das PFS bei fortgeschrittenem PDAC in Erwägung gezogen werden.

In der behandlungsbezogenen Subgruppenanalyse wurde bei den mit GEM therapierten Patienten ein signifikant längeres PFS (8,87 vs. 6,83 Monate, p=0,037) festgestellt, wenn ein SMAD4-Verlust vorlag. Dieser Zusammenhang wurde bei mit Fluoropyrimidinen therapierten Patienten nicht gefunden. SMAD4-Verlust könnte damit als positiv prädiktiver Marker für eine GEM-basierte Therapie bei fortgeschrittenem PDAC angesehen werden.

Aufgrund des explorativen Charakters der Analyse und der zum Teil kleinen Fallzahlen können die vorliegenden Ergebnisse nur als hypothesengenerierend betrachtet werden und müssen daher prospektiv validiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* 2014;64:9-29
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2010;127:2893-2917
3. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011;378:607-620
4. Herold G. *Innere Medizin: Gerd Herold, Köln; 2011*
5. Blackford A, Parmigiani G, Kensler TW, et al. Genetic mutations associated with cigarette smoking in pancreatic cancer. *Cancer research* 2009;69:3681-3688
6. Fendrich V, Langer P, Bartsch DK. Familial pancreatic cancer--status quo. *International journal of colorectal disease* 2014;29:139-145
7. Morris JPt, Wang SC, Hebrok M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature reviews Cancer* 2010;10:683-695
8. Amundadottir L, Kraft P, Stolzenberg-Solomon RZ, et al. Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nature genetics* 2009;41:986-990
9. Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2009;6:699-708
10. Wolpin BM, Chan AT, Hartge P, et al. ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2009;101:424-431
11. Hart AR, Kennedy H, Harvey I. Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2008;6:275-282
12. Li D, Yeung SC, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese JL. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2009;137:482-488
13. Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 2012;491:399-405
14. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development* 2006;20:1218-1249

15. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2000;6:2969-2972
16. Yachida S, Jones S, Bozic I, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 2010;467:1114-1117
17. Costello E, Greenhalf W, Neoptolemos JP. New biomarkers and targets in pancreatic cancer and their application to treatment. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2012;9:435-444
18. Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008;321:1801-1806
19. Bahra M, Neumann U. Surgical techniques for resectable pancreatic cancer. Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 2008;177:29-38
20. Clancy TE, Ashley SW. Pancreaticoduodenectomy (Whipple operation). *Surgical oncology clinics of North America* 2005;14:533-552, vii
21. Traverso LW, Longmire WP, Jr. Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy. *Surgery, gynecology & obstetrics* 1978;146:959-962
22. Oettle H, Post S, Neuhaus P, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2007;297:267-277
23. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2013;310:1473-1481
24. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 2017;389:1011-1024
25. Heinemann V, Haas M, Boeck S. Neoadjuvant treatment of borderline resectable and non-resectable pancreatic cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013;24:2484-2492
26. Heinemann V, Haas M, Boeck S. Systemic treatment of advanced pancreatic cancer. *Cancer treatment reviews* 2012;38:843-853
27. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced

- pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1997;15:2403-2413
28. Colucci G, Labianca R, Di Costanzo F, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with single-agent gemcitabine as first-line treatment of patients with advanced pancreatic cancer: the GIP-1 study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;28:1645-1651
 29. Heinemann V, Boeck S, Hinke A, Labianca R, Louvet C. Meta-analysis of randomized trials: evaluation of benefit from gemcitabine-based combination chemotherapy applied in advanced pancreatic cancer. *BMC cancer* 2008;8:82
 30. Sultana A, Smith CT, Cunningham D, et al. Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:2607-2615
 31. Cunningham D, Chau I, Stocken DD, et al. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:5513-5518
 32. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England journal of medicine* 2013;369:1691-1703
 33. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:1960-1966
 34. Ng SS, Tsao MS, Nicklee T, Hedley DW. Effects of the epidermal growth factor receptor inhibitor OSI-774, Tarceva, on downstream signaling pathways and apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Molecular cancer therapeutics* 2002;1:777-783
 35. Tobita K, Kijima H, Dowaki S, et al. Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis. *International journal of molecular medicine* 2003;11:305-309
 36. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* 2011;364:1817-1825
 37. Cartwright TH, Cohn A, Varkey JA, et al. Phase II study of oral capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer. *Journal of clinical*

- oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2002;20:160-164
38. Xiong HQ, Varadhachary GR, Blais JC, et al. Phase 2 trial of oxaliplatin plus capecitabine (XELOX) as second-line therapy for patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer* 2008;113:2046-2052
 39. Oettle H, Riess H, Stieler JM, et al. Second-line oxaliplatin, folinic acid, and fluorouracil versus folinic acid and fluorouracil alone for gemcitabine-refractory pancreatic cancer: outcomes from the CONKO-003 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2014;32:2423-2429
 40. Pelzer U, Schwaner I, Stieler J, et al. Best supportive care (BSC) versus oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (OFF) plus BSC in patients for second-line advanced pancreatic cancer: a phase III-study from the German CONKO-study group. *European journal of cancer* 2011;47:1676-1681
 41. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? Current opinion in HIV and AIDS 2010;5:463-466
 42. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2001;69:89-95
 43. Ballman KV. Biomarker: Predictive or Prognostic? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015;33:3968-3971
 44. Kruger S, Haas M, Ormanns S, et al. Translational research in pancreatic ductal adenocarcinoma: current evidence and future concepts. *World journal of gastroenterology : WJG* 2014;20:10769-10777
 45. Khleif SN, Doroshow JH, Hait WN, Collaborative A-F-NCB. AACR-FDA-NCI Cancer Biomarkers Collaborative consensus report: advancing the use of biomarkers in cancer drug development. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16:3299-3318
 46. Vujic I, Posch C, Sanlorenzo M, et al. Mutant NRASQ61 shares signaling similarities across various cancer types - potential implications for future therapies. *Oncotarget* 2014;5:7936-7944
 47. Schafer R, Schramme A, Tchernitsa OI, Sers C. Oncogenic signaling pathways and deregulated target genes. Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 2007;176:7-24
 48. Peyssonnaud C, Eychene A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2001;93:53-62

49. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature reviews Cancer* 2007;7:295-308
50. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent progress in hormone research* 2001;56:127-155
51. Rasso J, Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. *Biochemie: Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 2008*
52. Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 1988;332:644-646
53. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;296:1655-1657
54. Neel NF, Martin TD, Stratford JK, et al. The RalGEF-Ral Effector Signaling Network: The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery. *Genes Cancer* 2011;2:275-287
55. Gyorffy B, Stelnic-Klotz I, Sigler C, et al. Effects of RAL signal transduction in KRAS- and BRAF-mutated cells and prognostic potential of the RAL signature in colorectal cancer. *Oncotarget* 2015;6:13334-13346
56. Fernandez-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2011;2:344-358
57. Eser S, Schnieke A, Schneider G, Saur D. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *British journal of cancer* 2014;111:817-822
58. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:1626-1634
59. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;28:4697-4705
60. Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, et al. KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007;13:2890-2896

61. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2011;22:1535-1546
62. Boeck S, Jung A, Laubender RP, et al. EGFR pathway biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: translational results from the randomised, crossover phase 3 trial AIO-PK0104. *British journal of cancer* 2013;108:469-476
63. Sinn BV, Striefler JK, Rudl MA, et al. KRAS mutations in codon 12 or 13 are associated with worse prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2014;43:578-583
64. Heinemann V, Vehling-Kaiser U, Waldschmidt D, et al. Gemcitabine plus erlotinib followed by capecitabine versus capecitabine plus erlotinib followed by gemcitabine in advanced pancreatic cancer: final results of a randomised phase 3 trial of the 'Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie' (AIO-PK0104). *Gut* 2013;62:751-759
65. Tao LY, Zhang LF, Xiu DR, et al. Prognostic significance of K-ras mutations in pancreatic cancer: a meta-analysis. *World journal of surgical oncology* 2016;14:146
66. Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, et al. Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* 1996;87:173
67. Inman GJ. Linking Smads and transcriptional activation. *The Biochemical journal* 2005;386:e1-e3
68. Kang JS, Liu C, Derynck R. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends in cell biology* 2009;19:385-394
69. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *European journal of biochemistry / FEBS* 2000;267:6954-6967
70. Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, et al. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2001;7:4115-4121
71. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996;271:350-353
72. Iacobuzio-Donahue CA, Fu B, Yachida S, et al. DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:1806-1813

73. Oshima M, Okano K, Muraki S, et al. Immunohistochemically detected expression of 3 major genes (CDKN2A/p16, TP53, and SMAD4/DPC4) strongly predicts survival in patients with resectable pancreatic cancer. *Annals of surgery* 2013;258:336-346
74. Blackford A, Serrano OK, Wolfgang CL, et al. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15:4674-4679
75. Bachet JB, Marechal R, Demetter P, et al. Contribution of CXCR4 and SMAD4 in predicting disease progression pattern and benefit from adjuvant chemotherapy in resected pancreatic adenocarcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2012;23:2327-2335
76. Yao SY, Ng AM, Cass CE, Baldwin SA, Young JD. Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *The Journal of biological chemistry* 2011;286:32552-32562
77. Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D, et al. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004;10:6956-6961
78. Greenhalf W, Ghaneh P, Neoptolemos JP, et al. Pancreatic cancer hENT1 expression and survival from gemcitabine in patients from the ESPAC-3 trial. *Journal of the National Cancer Institute* 2014;106:djt347
79. Poplin E, Wasan H, Rolfe L, et al. Randomized, multicenter, phase II study of CO-101 versus gemcitabine in patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: including a prospective evaluation of the role of hENT1 in gemcitabine or CO-101 sensitivity. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013;31:4453-4461
80. Ormanns S, Heinemann V, Raponi M, et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1 is not predictive for gemcitabine efficacy in advanced pancreatic cancer: translational results from the AIO-PK0104 phase III study with the clone SP120 rabbit antibody. *European journal of cancer* 2014;50:1891-1899
81. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 2009;324:1457-1461
82. Guweidhi A, Kleeff J, Adwan H, et al. Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells. *Annals of surgery* 2005;242:224-234

83. Infante JR, Matsubayashi H, Sato N, et al. Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:319-325
84. Ormanns S, Haas M, Baechmann S, et al. Impact of SPARC expression on outcome in patients with advanced pancreatic cancer not receiving nab-paclitaxel: a pooled analysis from prospective clinical and translational trials. *British journal of cancer* 2016;115:1520-1529
85. Sinn M, Sinn BV, Strieler JK, et al. SPARC expression in resected pancreatic cancer patients treated with gemcitabine: results from the CONKO-001 study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2014;25:1025-1032
86. Frese KK, Neesse A, Cook N, et al. nab-Paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer discovery* 2012;2:260-269
87. Von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ, et al. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:4548-4554
88. Hidalgo M, Plaza C, Musteanu M, et al. SPARC Expression Did Not Predict Efficacy of nab-Paclitaxel plus Gemcitabine or Gemcitabine Alone for Metastatic Pancreatic Cancer in an Exploratory Analysis of the Phase III MPACT Trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015;21:4811-4818
89. Heinemann V, Quietzsch D, Gieseler F, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006;24:3946-3952
90. Boeck S, Hoehler T, Seipelt G, et al. Capecitabine plus oxaliplatin (CapOx) versus capecitabine plus gemcitabine (CapGem) versus gemcitabine plus oxaliplatin (mGemOx): final results of a multicenter randomized phase II trial in advanced pancreatic cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2008;19:340-347
91. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer* 2009;45:228-247
92. QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook: Qiagen GmbH, Hilden; 2010

93. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262:56-61, 64-55
94. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 1987;155:335-350
95. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical biochemistry* 1996;242:84-89
96. *Affinity Chromatography - Principles and Methods*: GE Healthcare Bio-Sciences AB; 2007
97. *PyroMark® Gold Q24 Reagents Handbook*: Qiagen GmbH, Hilden; 2009
98. *Pyrosequencing - the synergy of sequencing and quantification*: Qiagen GmbH, Hilden; 2009
99. *PyroMark® Q24 User Manual*: Qiagen GmbH, Hilden; 2012
100. Wilentz RE, Su GH, Dai JL, et al. Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas : a new marker of DPC4 inactivation. *The American journal of pathology* 2000;156:37-43
101. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association* 1958;53:457-481
102. Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research* 1967;27:209-220
103. Peto R, Peto J. Asymptotically Efficient Rank Invariant Test Procedures. *Journal of the Royal Statistical Society* 1972;135:185-207
104. Cox DR. Regression Models and Life-Tables *Journal of the Royal Statistical Society* 1972;34:187-220
105. Pearson K. On the criterion that a given system of derivations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Journal of Science* 1900
106. Haas M, Ormanns S, Baechmann S, et al. Extended RAS analysis and correlation with overall survival in advanced pancreatic cancer. *British journal of cancer* 2017;116:1462-1469
107. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer research* 1997;57:1731-1734
108. Biankin AV, Morey AL, Lee CS, et al. DPC4/Smad4 expression and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2002;20:4531-4542
109. Shugang X, Hongfa Y, Jianpeng L, et al. Prognostic Value of SMAD4 in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Translational oncology* 2016;9:1-7

110. KM OH, Brody JR. Personalized therapy for pancreatic cancer: Do we need better targets, arrows, or both? *Discov Med* 2016;21:117-123
111. Waddell N, Pajic M, Patch AM, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015;518:495-501
112. Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 2010;467:1109-1113
113. Chantrill LA, Nagrial AM, Watson C, et al. Precision Medicine for Advanced Pancreas Cancer: The Individualized Molecular Pancreatic Cancer Therapy (IMPACT) Trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015;21:2029-2037

7. Danksagung

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Volker Heinemann (Oberarzt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der LMU München, Großhadern) möchte ich mich recht herzlich für die Überlassung des Themas und die Annahme dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stefan Böck (Oberarzt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der LMU München, Großhadern) für die stets kompetente und freundliche Betreuung. Seine ständige Erreichbarkeit für Fragen aller Art war wesentlich für das Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. Michael Haas (Arzt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der LMU München, Großhadern) danke ich recht herzlich für seine hervorragende und unverzichtbare Hilfestellung während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Arbeit. Dies gilt insbesondere für die Datenauswertung und die Durchsicht dieser Arbeit.

Ein ebenso großer Dank gilt Herrn Dr. med. Steffen Ormanns (Arzt am Pathologischen Institut der LMU München) für seine immerwährende Unterstützung bei der Laborarbeit. Seine kompetente Beantwortung meiner Fragen, seine Hilfsbereitschaft und pathologische Fachkenntnis waren mir stets eine große Hilfe.

Zudem danke ich Frau Sibylle Bächmann (Ärztin am Pathologischen Institut der LMU München) für ihr freundschaftliches und einzigartiges Engagement bei der Einarbeitung in die Labortechniken und für die großzügige Überlassung ihrer Mikrotomschnitte.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der LMU München für die freundliche Überlassung ihrer Arbeitsplätze, für ihre Hilfestellung bei der Laborarbeit sowie für die Färbung der Mikrotomschnitte.

Ein ganz persönlicher und herzlicher Dank geht an meine Eltern für ihre immer fortwährende Unterstützung während meines Medizinstudiums, die das Erstellen dieser Arbeit überhaupt erst ermöglichte.

8. Publikationen

Ormanns S, Haas M, Remold A, Kruger S, Holdenrieder S, Kirchner T, Heinemann V and Boeck S. *The impact of SMAD4 loss on outcome in patients with advanced pancreatic cancer treated with systemic chemotherapy*. International Journal of Molecular Sciences 2017; 18(5).

Baechmann S, Ormanns S, Haas M, Kruger S, Remold A, Modest DP, Kirchner T, Jung A, Werner J, Heinemann V, Boeck S. *Switch in KRAS mutational status during an unusual course of disease in a patient with advanced pancreatic adenocarcinoma: implications for translational research*. BMC Cancer 2017; 17(1):374.

Haas M, Ormanns S, Baechmann S, Remold A, Kruger S, Westphalen CB, Siveke JT, Wenzel P, Schlitter AM, Esposito I, Quietzsch D, Clemens MR, Kettner E, Ruediger P, Laubender⁸, Jung A, Kirchner T, Boeck S, Heinemann V. *Extended RAS Analysis and Correlation with Overall Survival in Advanced Pancreatic Cancer*. British journal of cancer 2017; 116(11):1462-1469.

Ormanns S, Haas M, Baechmann S, Altendorf-Hofmann A, Remold A, Quietzsch D, Clemens MR, Bentz M, Geissler M, Lambertz H, Kruger S, Kirchner T, Heinemann V, Boeck S. *Impact of SPARC expression on outcome in patients with advanced pancreatic cancer not receiving nab-paclitaxel: a pooled analysis from prospective clinical and translational trials*. British journal of cancer 2016; 115:1520-1529.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Anna Remold, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema *NRAS und SMAD4 als Biomarker bei fortgeschrittenem Pankreaskarzinom* selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Anna Remold

München, 12.07.2018