Aus der Abteilung Klinische Pharmakologie (Prof. Dr. med. J. Brockmöller) im Zentrum Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Variabilität des Therapieansprechens von Gemcitabin bei Pankreaskarzinom: Identifizierung relevanter Genpolymorphismen

Retrospektive Studie bei Patienten mit Pankreaskarzinom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Alexander Schaudinn

aus Erfurt

Göttingen 2012

Dekan:

Prof. Dr. med. M. P. Schön

- I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Brockmöller
- II. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. Liersch

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2013

1 Inhaltsverzeichnis

A	ABKÜRZUNGSVERZEICHNISiii					
TA	ABELLE	NVERZEICHNIS	.vii			
A	BBILDU	NGSVERZEICHNIS	viii			
			,			
1	EINI	EITUNG	1			
	1.1	DAS PANKREASKARZINOM	1			
	1.2	THERAPIE DES PANKREASKARZINOMS	3			
	1.3	DAS NUKLEOSIDANALOGON GEMCITABIN	4			
	1.4	DETERMINANTEN DER GEMCITABIN-WIRKUNG	5			
	1.5	TRANSPORT VON GEMCITABIN	7			
	1.5.1	Bedeutung des ENT1	7			
	1.6	METABOLISMUS VON GEMCITABIN	8			
	1.7	HEDGEHOG-SIGNALWEG UND WIRKSAMKEIT VON GEMCITABIN	9			
	1.8	POLYMORPHISMEN IN KANDIDATENGENEN	10			
	1.9	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	11			
2	МАТ	ERIAL	13			
	2.1	Genäte	12			
	2.1		13			
	2.2		14			
	2.5		15 20			
	2.7		20			
	2.5	Kite	20			
	2.0		20			
	2.8	SOFTWARE	21			
	29		21			
•	2.0					
3	MEI	HODEN	23			
	3.1	PATIENTENAUSWAHL UND NACHSORGE	23			
	3.2	GENOTYPISIERUNG	24			
	3.2.1	Isolierung von genomischer DNA	24			
	3.2.2	Quantifizierung von genomischer DNA	24			
	3.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25			
	3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	27			
	3.2.5	Bestimmung von Genotypen mittels Primerextension ($SNaPshot^{TM}$)	29			
	3.2.6	Fragmentlängenanalyse zweier Insertionspolymorphismen	31			
	3.3	STATISTIK	32			
	3.4	BIOINFORMATIK	33			

4 1	PATIENTENKOHORTE MIT VERTEILLING DER ÜRERLERENSZEITEN
4.1	NICHT-GENETISCHE FINELUSSEAKTODEN
4.2	Residenten der Detienten
4.2.1	Basaltionsstatus
4.2.2	Histonathologisches Grading
4.2.5	Gencitabin als Mono- oder Kombinationstheranie
425	Tumorlokalisation und Staging
4.2.6	Hämatotoxizitätsparameter.
4.3	KEIMBAHN-VARIANTEN IN KANDIDATENGENEN FÜR GEMCITABIN.
4.4	GENPOLYMORPHISMEN UND GESAMTÜBERLEBEN
4.4.1	Explorative Analyse mit 109 Kandidatengen-Varianten
4.4.2	Adjustierung auf nicht-genetische Faktoren
4.4.3	Kombiniertes SNP-Modell
4.4.4	Adjustierung auf multiples Testen
4.4.5	Stärkste Effekte für Varianten im Bereich des ENT1-Gens
4.4.6	SNP in SHH mit tendenzieller Beeinflussung der Überlebenszeit
4.5	HÄMATOTOXIZITÄT UNTER GEMCITABIN-THERAPIE
4.5.1	Deskriptiver Verlauf von Leukozyten und Thrombozyten
4.5.2	Variabilität in Ausprägung und Zeitdauer des Nadir-Eintritts
4.5.3	Zytotoxizität nach singulärer Gemcitabin-Gabe
4.5.4	Einfluss von Varianten in Gemcitabin-Kandidatengenen auf Nadir sowie Zytotoxizität nach
	singulärer Gemcitabin-Gabe
4.5.5	Rs747199 beeinflusst gleichsinnig Überleben und Hämatotoxizität
5 DISK	SUSSION
5.1	ENT1-AMINOSÄUREVARIANTE ILE216THR (RS45573936)
5.2	VARIANTEN IN PROMOTORREGION UND INTRON 1 VON ENT1
5.3	WELTWEITE VERTEILUNG DER ENT1-VARIANTEN
5.4	WEITERE GENVARIANTEN ALS MÖGLICHE BIOMARKER FÜR THERAPIEANSPRECHEN
5.5	DETERMINANTEN DER HÄMATOTOXIZITÄT UNTER GEMCITABIN
5.6	Kritische Betrachtung
5.7	AUSBLICK
ZUS	AMMENFASSUNG
, 205	

II Abkürzungsverzeichnis

А	Adenin
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDA	Cytidindeaminase
CMPK1	Cytidinmonophosphatkinase 1
CNT (s)	konzentrativer Nukleosidtransporter (Plural)
CTC	Common Terminology Criteria for Adverse Events, Toxizitätskriterien
dbSNP	database SNP, innerhalb NCBI-Datenbank
(d)CDP	(Desoxy-) Cytidindiphosphat
DCK	Desoxycytidinkinase
DCTD	Desoxycytidilat-Deaminase
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	(doppelt destilliertes) Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
Del	Deletion
dFdU	2',2'-Difluorodesoxyuridin
dFdUMP	Difluorodesoxyuridin-Monophosphat
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen Diamin Tetraacetic Acid
ENT (s)	äquilibrierender Nukleosidtransporter (Plural)
et al.	et alii, und andere
FAM	6-Carboxyfluorescein
FDR	False Discovery Rate
FL	Fragmentlänge

5-FU	5-Fluorouracil
G	Guanin
g	Gramm
Gln	Glutamin
h	hour, Stunde
Het	Heterozygotie
HR	Hazard Ratio
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
Ile	Isoleucin
IL17F	Interleukin 17 F
Ins	Insertion
IPMN	Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
k	Kilo
kbp	Kilobasenpaare
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
KOF	Körperoberfläche
k-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LD	linkage disequilibrium, Kopplungsungleichgewicht
Lys	Lysin
m / m^2	Meter / Quadratmeter
М	Mol
MAF	minor allele frequency, Frequenz des selteneren Allels
MAPRE2	Microtubule-associated protein, member 2
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCI	National Cancer Institut

nm	Nanometer
Notch	Notch-Signalweg
NOX4	NADPH Oxidase-4
NSCLC	Non-small cell lung cancer, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
NTs	Nukleosid-Transporter (Plural)
NT5C/NT5C3 - 5'	Nukleotidase/Isoform 3
OD	optische Dichte
Р	Signifikanzniveau
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells, mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
pН	pondus Hydrogenii
PRB2	proline-rich protein BstNI subfamily 2
Primer-F	Vorwärts-Primer
Primer-R	Rückwärts-Primer
PTCH1	Patched 1
PYCARD	PYD and CARD domain containing
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
r ²	Bestimmtheitsmaß
rho	Spearmans Rangkorrelationskoeffizient
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
RRM1/RRM2(B)	Unterformen der Ribonukleotid-Reduktase
rs-Nummer	Reference SNP-Nummer
S.	Seite
S	Sekunde
Ser	Serin
SHH	Sonic hedgehog
SLC29A1	<i>solute carrier family 29 member 1</i> (Nukleosidtransporter); Synonym zu ENT1-Transporter
SMO	Smoothened
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnukleotid- Polymorphismus
Т	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer

TE	Tris-EDTA-Puffer
TGFβ	Transforming growth factor beta
Thr	Threonin
TNM	Tumor-Klassifikation nach Tumorausbreitung (T), Lymphknotenbefall (N),Metastasierung (M)
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Units (Einheit für Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem/n
UICC	Union internationale contre le cancer
UTR	untranslated region, nicht abgelesener Bereich auf der mRNA
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
Var	Varianten-Allel
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
Wnt	Wnt-Signalweg (Wingless und Int-1)
Wt	Wildtyp-Allel
χ²-Test	Chi-Quadrat-Test
z.B.	zum Beispiel

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Primer zur Genotypisierung 19
Tab. 2 Standard-Bedingungen f ür PCR mit Taq-Polymerase 25
Tab. 3 Pipettierschema für Multiplex-PCR 26
Tab. 4 Pipettierschema für Einzel-PCR im 12-µl-Maßstab
Tab. 5 Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für SNaPshot TM -PCR
Tab. 6 Kandidatengene mit Anzahl untersuchter Genvarianten (SNPs)
Tab. 7 Charakteristika auswertbarer Patienten bezüglich Gemcitabin-Therapie
Tab. 8 Korrelation von Hämatotoxizitätsparametern und Gesamtüberleben
Tab. 9 Charakteristika untersuchter Genpolymorphismen geordnet nach Genen
Tab. 10 Genpolymorphismen und Gesamtüberleben
Tab. 11 Zusammenstellung der mit dem Gesamtüberleben assoziierten SNPs58
Tab. 12 Kombiniertes Cox-Modell der am stärksten mit dem Überleben assoziierten SNPs . 59
Tab. 13 Cox-Regressionsanalyse zur Assoziation von ENT1 rs45573936 und Überleben 60
Tab. 14 ENT1 rs1057985 und nicht-genetische Faktoren im Cox-Modell bezogen auf
Gesamtüberleben
Tab. 15 Einfluss von SHH rs288746 und nicht-genetischer Faktoren auf Gesamtüberleben 63
Tab. 16 Verlaufsdaten für Leukozyten während der ersten 42 Tage Gemcitabin-Therapie 65
Tab. 17 Verlaufsdaten für Thrombozyten in den ersten 42 Tagen der Gemcitabin-Therapie . 65
Tab. 18 SNPs mit Einfluss auf Hämatotoxizität
Tab. 19 Häufigkeit der ENT1-Varianten rs1057985, rs747199 und rs45573936 bezogen
auf Ethnizitäten76

IV Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Strukturformeln von Desoxy-Cytidin und Gemcitabin
Abb. 2 Weg des Gemcitabins bis zu seinem Wirkort
Abb. 3 Gelbild einer Multiplex-Gradienten-PCR
Abb. 4 SNaPshot [™] -Elektropherogramm für zehn Polymorphismen des <i>ENT1</i> -Gens
Abb. 5 Flussdiagramm zur Auswahl der Patientenkohorte
Abb. 6 Kaplan-Meier-Kurve zur Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Resektionsstatus 40
Abb. 7 Überlebenskurven in Abhängigkeit vom histopathologischen Grading
Abb. 8 Überlebenskurven für Gemcitabin in Mono- und Kombinationstherapie
Abb. 9 Korrelation zwischen Überlebenszeit und Grad der Leukopenie unter Gemcitabin 44
Abb. 10 Überlebenskurven in Abhängigkeit des ENTI-SNPs rs45573936 (Ile216Thr) 60
Abb. 11 Architektur des ENTI-Gens und Kopplungsplot der analysierten Varianten
Abb. 12 Einfluss von rs1057985 auf die Überlebenszeit
Abb. 13 Überlebenszeit in Abhängigkeit von SHH-SNP rs28874663
Abb. 14 Häufigkeitsverteilung des Leukozytopeniegrades und des Zeitintervalls bis
Nadireintritt
Abb. 15 Häufigkeitsverteilung des Thrombozytopeniegrades und des Zeitintervalls bis
Nadireintritt
Abb. 16 Verlauf von Leukozyten und Thrombozyten innerhalb der ersten sieben Tage 67
Abb. 17 Effekte von rs747199 auf Hämatotoxizität und Gesamtüberleben
Abb. 18 Sekundärstruktur des ENT1-Transporters
Abb. 19 Gemcitabin-Toxizität in Abhängigkeit von rs45573936 (Ile216Thr)
Abb. 20 Einfluss des Promotor-SNPs rs1057985 auf die basale ENTI-Transkription

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Jedes Jahr erkranken in Deutschland etwa 13000 Personen neu an einem Pankreaskarzinom mit stetig steigender Tendenz (Robert Koch-Institut 2011). Für beide Geschlechter besteht in etwa ein gleich hohes Lebenszeitrisiko von 1,4% zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms (Robert Koch-Institut 2010a). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei 76 Jahren (Frauen) bzw. 69 Jahren (Männer). Innerhalb der Gruppe der Gastrointestinal-Tumore ist das Pankreaskarzinom in Deutschland das dritthäufigste Malignom nach Kolonund Magenkarzinom (in den USA bereits das zweithäufigste). Unter allen neu aufgetretenen malignen Tumoren steht es auf Platz neun (Frauen) bzw. zehn (Männer). Betrachtet man vergleichend die Letalität maligner Tumore in Deutschland, rangiert das Pankreaskarzinom mittlerweile bereits an vierter Stelle (Robert Koch-Institut 2010a). Den beobachteten Effekt von hoher Letalität bei verhältnismäßig niedriger Inzidenz unterstreichen weltweite Zahlen mit einer Letalitätsrate von 3,7 / 100000 zu einer Inzidenzrate von 3,9 / 100000 Personen (Ferlay et al. 2010). Die Aggressivität dieses Karzinoms spiegelt sich auch in der sehr niedrigen 5-Jahresüberlebensrate wider (weltweit unter 5%, Jemal et al. 2010; in Deutschland 8% bei Frauen und 6% bei Männern, Robert Koch-Institut 2010b). Betrachtet man die Gesamtüberlebenszeit aller Patienten von durchschnittlich weniger als einem Jahr, so ist das Pankreaskarzinom eine der Tumorentitäten mit der wohl schlechtesten Prognose überhaupt. Auch bei primär mit kurativer Intention resezierten Patienten liegt die mittlere Gesamtüberlebenszeit bei nur 20-25 Monaten und nur 15% dieser Patienten sind fünf Jahre nach Diagnosestellung noch am Leben (Vincent et al. 2011).

Ein Grund für die schlechte Prognose ist der über lange Zeit klinisch stumme Verlauf. Frühsymptome sind selten und meist unspezifisch im Sinne einer B-Symptomatik (u.a. Gewichtsverlust und Leistungsabfall). Symptome wie Ikterus, Oberbauchbeschwerden mit Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Verdauungsbeschwerden, Thrombosen oder das Neuauftreten eines Diabetes mellitus Typ II können sich erst spät im Krankheitsverlauf zeigen. Zu diesem Zeitpunkt hat der Tumor meist bereits angrenzende Gewebe infiltriert. Es besteht eine Tendenz zu früher Metastasierung (lymphogen; hämatogen in Leber, Peritoneum, Lunge und Knochen). Zudem kommt es nach Resektion sehr häufig zu Rezidiven (Vincent et al. 2011).

Ätiologisch wird von einer multifaktoriellen Genese des Pankreaskarzinoms ausgegangen. Evident ist der maßgebliche Einfluss genetischer Disposition. Dabei werden familiäre Mutationen hoher Penetranz und angeborene Syndrome (z.B. das Peutz-Jeghers-Syndrom) für 5-10% der Pankreaskarzinome verantwortlich gemacht. Eine positive Familienanamnese ist in 7-10% der Fälle bekannt. Zigarettenrauchen verursacht etwa 20-25% der Pankreaskarzinome (Hassan et al. 2007). Ein weiterer nachgewiesener Risikofaktor ist Diabetes mellitus Typ II (2,6-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko). Die Bedeutung der chronischen Pankreatitis für die Karzinogenese wird hingegen aktuell als verhältnismäßig gering betrachtet (Raimondi et al. 2010). Weitere ätiologische Faktoren sind Alter, männliches Geschlecht, Adipositas (BMI > 30 kg/m²), fettreiche Diät, Nickelexposition und Infektionen mit Hepatitis B, C oder Helicobacter pylori. Keine Evidenz ließ sich für den exzessiven Konsum von Alkohol (Hart et al. 2008) bzw. Kaffee (Turati et al. 2012) nachweisen. Das "0"-Allel des AB0-Blutgruppensystems scheint das Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms zu reduzieren (*Risk Ratio* von 0,7 bei Personen mit Homozygotie für dieses Allel; Amundadottir et al. 2009; Wolpin et al. 2010). Protektiv werden außerdem Allergien in der Vorgeschichte bzw. die Einnahme von Acetylsalicylsäure (Aspirin), nicht-steriodalen Antirheumatika (z.B. Ibuprofen) bzw. Metformin erachtet.

Durchschnittlich liegen bei einem Pankreaskarzinom 63 somatische Mutationen vor. Diese befinden sich in einer Reihe unterschiedlicher funktioneller Systeme. Praktisch immer betroffen scheinen Gene für Apoptose, Zellzyklus-Regulation, der Hedgehog-Signalweg sowie die Signalkaskaden über k-ras, TGF β und Wnt/Notch zu sein (Jones et al. 2008). Auch für Keimbahn-Polymorphismen wird eine ursächliche Bedeutung für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms vermutet. So wird die oben angeführte Assoziation mit dem AB0-Lokus auch bislang nicht identifizierten, gemeinsam vererbten Markern zugeschrieben (Amundadottir et al. 2009).

Unter den malignen Pankreastumoren bildet das adenoduktale mit über 90% die mit Abstand größte Gruppe. Dieses geht vom exokrinen Anteil des Pankreas aus und ist zumeist (75% der Fälle) im Bereich des Pankreaskopfes lokalisiert. Zum Pankreasschwanz hin nimmt die Häufigkeit ab. Tumorentität, Grading und Resektionsstatus werden histologisch anhand einer Tumorprobe aus Biopsie oder OP-Resektion festgestellt. Therapieentscheidungen richten sich neben dem Resektionsstatus insbesondere nach der Stadieneinteilung der UICC (*Union internationale contre le cancer*). Diese beruht auf der Charakterisierung des Tumors gemäß der TNM-Klassifikation basierend auf der Tumorausbreitung (T), dem Lymphknotenbefall (N) und der Metastasierung (M). Die Einteilung der UICC umfasst fünf Stadien zwischen 0 und 4.

1.2 Therapie des Pankreaskarzinoms

Beim Pankreaskarzinom wird prinzipiell eine Operation im Gesunden angestrebt. Dies ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jedoch nur bei einer Minderheit der Patienten möglich. Darüber hinaus gelingt häufig zumindest noch eine R1-Resektion (Absetzungsrand nur mikroskopisch noch Tumor-befallen). Bei kurativer Operationsintention (Stadium UICC 0-IIB) ist die Prognose besser (Wagner et al. 2004). R0-resezierte Patienten überleben im Mittel 20-25, R1-resezierte hingegen nur 8-18 Monate. Für die Chemotherapie wurde zunächst 5-Fluorouracil (5-FU) verwendet. Später wurde dann in der palliativen Situation ein Benefit von Gemcitabin gegenüber 5-FU hinsichtlich des Gesamtüberlebens (5,7 *versus* 4,4 Monate) nachgewiesen (Burris et al. 1997). Auch in adjuvanter Intention hat sich Gemcitabin als Standardtherapeutikum etabliert (Oettle et al. 2007), wobei hier offenbar kein Überlebensvorteil, wohl aber ein günstigeres Nebenwirkungsprofil gegenüber 5-FU vorliegt (Neoptolemos et al. 2010). Borderline-resektable Patienten (UICC Stadium III) können, unter Abwägung des Zeitverzugs bis zur Operation, von einer neoadjuvanten Radiochemotherapie profitieren. Angestrebt wird in diesen Fällen das Downstaging des Tumors, um eine spätere R0-Resektion möglich zu machen (Gillen et al. 2010).

Mehrere Gemcitabin-basierte Kombinationstherapien wurden auf eine Beeinflussung des Gesamtüberlebens von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom getestet. Von diesen ist eine Verlängerung der Überlebenszeit am besten für die Kombination von Gemcitabin mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib belegt (Moore et al. 2007). Hierfür ließen sich Vorteile gegenüber der Monotherapie mit Gemcitabin nachweisen (Gesamtüberleben 6,2 *versus* 5,9 Monate; 1-Jahresüberleben 23% *versus* 17%). Aktuelle Studien prüfen den Benefit weiterer Kinase-Inhibitoren wie Sorafenib oder Masatinib. Letztgenanntes führte im Mausmodell in Kombination mit Gemcitabin zu einer deutlichen Wachstumshemmung des Tumors (Humbert et al. 2010). Der Zusatz des Angiogenesehemmers Bevacizumab zeigte in klinischen Studien jedoch keine Verbesserung des Gesamtüberlebens (Kindler et al. 2010). Eine Kombination mit Capecitabin, einem oral bioverfügbaren Prodrug von 5-FU, scheint Metaanalysen zufolge mit einem leichten Gewinn an Überlebenszeit verbunden (Cunningham et al. 2009). Wurde Gemcitabin zusammen mit Cisplatin gegeben, war zwar ein deutlicher Vorteil in Bezug auf die Progression der Tumorerkrankung erkennbar, der Effekt auf die Überlebenszeit war jedoch nur schwach (Heinemann et al. 2006).

Die Einführung von Folfirinox 2011, einer Kombination der bei Darmkrebs bewährten Substanzen Leucovorin (Fol), 5-FU (F), Irinotecan (Irin) und Oxaliplatin (Ox), wurde als Alternative zur Gemcitabin-basierten Chemotherapie bei Pankreaskarzinom geprüft. Für Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom war Folfirinox gegenüber Gemcitabin mit einem deutlichen Überlensvorteil verbunden (Gesamtüberleben 10,4 *versus* 6,8 Monate; 1-Jahresüberleben 48,4% *versus* 20,6; Conroy et al. 2011). Aufgrund der ausgeprägten Toxizität dieser Medikamentenkombination bleibt ihre Anwendbarkeit jedoch auf Patienten mit gutem Allgemeinzustand beschränkt und gilt nur unter diesen Voraussetzungen als *First-line*-Therapie. Abgesehen davon bleibt Gemcitabin bis auf Weiteres Standard in der Therapie des Pankreaskarzinoms. Insgesamt ist das Therapieansprechen bei den meisten Patienten nur kurzfristig. Von einer Heilbarkeit dieser Erkrankung ist man noch weit entfernt.

1.3 Das Nukleosidanalogon Gemcitabin

Gemcitabin ist ein Nukleosid und wirkt als phasenspezifisches Zytostatikum als Antimetabolit während der Nukleinsäure-Synthese. Es ist ein Derivat des natürlichen Desoxy-Cytidins und unterscheidet sich von diesem lediglich in zwei Fluor-Substituenten am C2-Atom des Zuckerrings (siehe Abb. 1). Aus dem Nukleosid wird in der Zelle durch Phosphorylierung das entsprechende Nukleotid, die kleinste Einheit des DNA-Strangs. Es fungiert als falscher Bausteine der DNA-Synthese, verursacht Strangbrüche und hemmt kompetitiv Enzyme der Synthese von Nukleinsäuren. In Folge dessen kommt es zu Störungen der zellulären Funktion und schließlich zur Einleitung des Zelltodes.



Abb. 1 Strukturformeln von Desoxy-Cytidin (links) und Gemcitabin (2',2'-Difluorodesoxycytidin) (rechts).

Ursprünglich als Virostatikum entwickelt, wird Gemcitabin heute nur zur Therapie solider Malignome eingesetzt. Sowohl an Krebszellinien als auch im Mausmodell war für Gemcitabin ein umfassendes Spektrum antitumoraler Aktivität nachweisbar (Hertel et al. 1990; Braakhuis et al. 1991). Diese Ergebnisse fanden auch in klinischen Studien Bestätigung (Abbruzzese et

1991). Heute erfährt Gemcitabin als First-line-Therapeutikum Anwendung bei al. Pankreaskarzinom, nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (Sandler et al. 2000) und Harnblasenkarzinom (von der Maase et al. 2000). In Kombination mit Paclitaxel wird es ebenfalls bei fortgeschrittenem Mammakarzinom eingesetzt (Albain et al. 2008). Weitere Indikationen stellen Ovarialkarzinom, Gallengangskarzinom, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphom dar. Dosislimitierende Nebenwirkung von Gemcitabin ist zumeist die Myelosuppression mit Depletierung aller drei Blutzellreihen. Leukozytound Thrombozytopenie stehen jedoch im Vordergrund. Daher ist vor jeder Gemcitabin-Applikation standardmäßig eine Blutbildkontrolle obligat. Mögliche Optionen im Falle ausgeprägter Zytopenien wären eine Dosisreduktion, der Verzicht der geplanten Einzelgabe oder als ultima ratio der Abbruch der Therapie. Weitere mögliche Nebenwirkungen von Gemcitabin sind Übelkeit, Erbrechen, allergische Reaktionen, Grippe-ähnliche Symptome (Fieber, Kopf-/Muskelschmerz), Hämaturie/Proteinurie, Dyspnoe, periphere Ödeme und Haarausfall.

Es wird angestrebt, soweit möglich und vom Patient vertragen, Gemcitabin in adjuvanter und palliativer Indikation für eine Zeitspanne von mindestens sechs Monaten zu verabreichen. Am häufigsten kommt der 3/4-Takt zur Anwendung. Dabei erfolgt in einem Zyklus eine Gabe an den Therapietagen 1, 8 und 15, worauf sich eine Woche Therapiepause anschließt (Tag 22). Weitere gängige Verabreichungschemata stellen der 2/3- und 6/8-Takt dar. Als Applikation hat sich eine Kurzinfusion über 30 min mit einer Dosis von 1000-1250 mg/m² Körperoberfläche (KOF) durchgesetzt (Abbruzzese et al. 1991).

1.4 Determinanten der Gemcitabin-Wirkung

Entscheidend für die Wirkung von Gemcitabin ist seine Aufnahme in die Zelle über spezifische Nukleosidtransporter und seine extra- bzw. intrazelluläre enzymatische Metabolisierung. Darüber hinaus sind für den Hedgehog-Signalweg Effekte auf die Wirksamkeit von Gemcitabin beschrieben worden. Für alle diese Determinanten ist denkbar, dass sie eine Variabilität des Ansprechens von Tumorzellen auf Gemcitabin bedingen können. Die genannten Faktoren werden in den folgenden Kapiteln 1.5 - 1.7 besprochen und sind zur besseren Übersicht in Abb. 2 schematisch dargestellt.



Abb. 2 Weg des Gemcitabins bis zu seinem Wirkort. CDA - Cytidindeaminase, CMPK1 - Cytidinmonophosphatkinase 1, CNT1/3 – konzentrative Nukleosidtransporter 1/3, (d)CDP – (Desoxy-) Cytidindiphosphat, DCK – Desoxycytidinkinase, DCTD – Desoxycytidilat-Desaminase, dCTP – Desoxycytidintriphosphat, dFdU – 2',2'-Difluorodesoxyuridin, dFdUMP – Difluorodesoxyuridin-Monophosphat, ENT1 – äquilibrierender Nukleosidtransporter 1, NT5C/NT5C3 – 5'-Nukleotidase/ Isoform 3, PTCH1 – *Patched 1*, RRM1/RRM2(B) – Unterformen der Ribonukleotid-Reduktase, SHH – Sonic hedgehog, SMO – Smoothened.

1.5 Transport von Gemcitabin

Zur Aufnahme von Gemcitabin werden spezifische Nukleosid-Transporter (NTs) benötigt (Baldwin et al. 1999). Beim Menschen wurden bislang sieben dieser Transporter beschrieben (Mackey et al. 1998). Drei davon sind konzentrativ (CNTs, Gray et al. 2004) und vier äquilibrierend (ENTs, Baldwin et al. 2004). CNTs sind in polaren Zellen apikal lokalisiert (Hamilton et al. 2001) und finden sich hauptsächlich in Epithelien von Niere, Leber und Gastrointestinaltrakt (Mangravite et al. 2001). ENTs dagegen kommen in polaren Zellen überwiegend basolateral, in geringerem Maße aber auch apikal vor. Sie sind auch in unpolaren Zellen vorhanden, wobei der ENT1 (SLC29A1) ubiquitär – u.a. auch in Blutzellen – exprimiert ist (Griffiths et al. 1997).

In-vitro-Studien an Zelllinien aus menschlichem Pankreasgewebe zeigten, dass die Gemcitabin-Aufnahme vorrangig über ENT1, in geringerem Umfang auch über CNT1 und CNT3 erfolgt (siehe Abb. 2; Garcia-Manteiga et al. 2003, Ritzel et al. 2001, Mackey et al. 1999, Mackey et al. 1998).

1.5.1 Bedeutung des ENT1

Auf Basis immunhistochemischer Analysen retrospektiver klinischer Studien konnten Assoziationen zwischen der Anwesenheit des **ENT1-Transporters** und dem Therapieansprechen auf Gemcitabin bei Patienten mit Pankreaskarzinom nachgewiesen werden. Eine hohe ENT1-Expression in den Karzinomzellen war mit einer besseren Prognose verknüpft (Spratlin et al. 2004; Morinaga et al. 2011). Diese Befunde konnten auf mRNA-Ebene bestätigt werden (Giovannetti et al. 2006). Analoge Effekte für das ebenfalls mit Gemcitabin behandelte nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom fanden sich sowohl für mRNA-Expression (Achiwa et al. 2004) als auch in immunhistochemischen Analysen (Oguri et al. 2007). Die Bedeutung des ENT1 für die Wirksamkeit von Gemcitabin konnte mittlerweile auch in einer prospektiven Studie bestätigt werden. Eine immmunhistochemisch nachgewiesene hohe Expression von ENT1 im Tumorgewebe war signifikant mit einem längeren Gesamtüberleben korreliert (Farrell et al. 2009). Interessant ist, dass eine hohe ENT1-Expression bei nicht-chemotherapierten Malignomen eher ein prognostisch ungünstiger Faktor zu sein scheint, wie für Karzinome des Magens und der Ampulle gezeigt (Santini et al. 2008; Santini et al. 2010).

1.6 Metabolismus von Gemcitabin

Neben der Route des Gemcitabins und dem Transport ist in Abb.2 auch dessen Metabolismus schematisch dargestellt. Für die rasche Inaktivierung von Gemcitabin nach intravenöser Applikation ist die Cytidindeaminase (CDA) verantwortlich. Diese ist vor allem in Leber, Blutplasma und Niere exprimiert und setzt etwa 90% der applizierten Substanzmenge in den inaktiven Metaboliten 2',2'-Difluorodesoxyuridin (dFdU) um (Storniolo et al. 1997). Intrazellulär bedarf es einer enzymatischen Phosphorylierung, um Gemcitabin in seine aktive Form, das Gemcitabin-Triphosphat, zu überführen. Die initiale Phosphorylierung zum Geschwindigkeits-bestimmender Monophosphat wird als Schritt des Gemcitabin-Metabolismus betrachtet und erfolgt durch die Desoxycytidinkinase (DCK) (Shewach et al. 1992). Im phosphorylierten Zustand kann Gemcitabin die Zelle nicht mehr verlassen. Nukleotidasen (NT5C, NT5C3) überführen jedoch einen Teil des Monophosphats wieder in die Ausgangssubstanz und wirken somit antagonistisch zur DCK. Auch intrazellulär kann nicht-phosphoryliertes Gemcitabin durch die CDA degradiert werden. Darüber hinaus kann Gemcitabin-Monophosphat mittels Desoxycytidilat-Desaminase (DCTD) zu dFdUMP inaktiviert werden. Der nächste Phosphorylierungsschritt zum Diphosphat wird durch die Cytidinmonophosphatkinase 1 (CMPK1) bewerkstelligt.

Gemcitabin unterliegt einem intrazellulären Mechanismus der Selbstpotenzierung. Dabei entscheidend ist die Hemmwirkung des Gemcitabin-Diphosphats und -Triphosphats auf die Ribonukleotid-Reduktase und ihrer Unterformen RRM1, RRM2 und RRM2B. Dadurch verkleinert sich der Pool an physiologischem Desoxycytidintriphosphat (dCTP), welches mit Gemcitabin-Triphosphat um den Einbau in DNA konkurriert (Heinemann et al. 1990). Niedrige dCTP-Spiegel führen ihrerseits zu einer Enthemmung der DCK und damit zu einer verstärkten Phosphorylierung von Gemcitabin. Anderseits ist bei niedrigen dCTP-Konzentrationen die DCTD weniger aktiv, sodass der Abbau von Gemcitabin-Monophosphat vermindert ist. Hinzu kommt noch, dass Gemcitabin in seiner Triphosphat-Form ebenfalls hemmend auf die DCTD wirkt. Zusammen genommen resultieren aus diesen Effekten höhere Konzentrationen von aktiven Gemcitabinmetaboliten in der Zelle (Plunkett et al. 1996; Heinemann et al. 1992).

Die eigentliche Gemcitabinwirkung besteht zum einen in der kompetitiven Hemmung der DNA-Polymerase durch Gemcitabin-Triphosphat und zum anderen in der als "maskierte Termination" bezeichneten Initiierung von DNA-Strangabbrüchen (Gandhi und Plunkett 1990). Hierbei wird Gemcitabin-Triphosphat als Substrat der DNA-Polymerase- α in den

DNA-Strang eingebaut (Huang et al. 1991), worauf genau ein weiteres Desoxynukleotid folgen kann. Gegenüber Reparaturmechanismen und Entfernung aus der DNA ist das Gemcitabin-Triphosphat nach dieser non-terminalen Inkorporierung unempfindlich (Plunkett et al. 1995). Die DNA-Polymerisation stoppt und Apoptose wird induziert (Huang und Plunkett 1995).

1.7 Hedgehog-Signalweg und Wirksamkeit von Gemcitabin

Der Hedgehog-Signalweg vermittelt Interaktionen zwischen Zelle und Extrazellulärraum. Benannt ist der Signalweg nach seinem Liganden-Protein Hedgehog (Hh), welches an den Rezeptor Patched bindet, der wiederum eine negative Regulation auf das Smoothened-Protein ausübt (siehe Abb. 2). Ursprünglich wurde dieser Signalweg in Zusammenhang mit der frühen Embryonalentwicklung an *D. melanogaster* beschrieben, wofür der Nobelpreis verliehen wurde (Nusslein-Volhard und Wieschaus 1980). Mittlerweile wurden je drei Homologe des Hedgehog- und des Patched-Proteins in Vertrebraten identifiziert, wobei beim Menschen Sonic Hedgehog (SHH) und Patched 1 (PTCH1) die größte Rolle spielen.

Für den Hedgehog-Signalweg ist eine Bedeutung für die Entstehung von menschlichen Tumoren nachgewiesen, so etwa für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) (Yuan et al. 2007), das Melanom (Stecca et al. 2007) und gastrointestinale Tumore einschließlich des Pankreaskarzinoms (Berman et al. 2003; Thayer et al. 2003). Aufgrund der Überexprimierung von SHH durch Pankreaskarzinomzellen (Berman et al. 2003) kommt es zu einer Verminderung des inhibitorischen Effekts von Patched auf Smoothened. Dies bewirkt eine verstärkte Expression von Genen (Robbins et al. 1997; Nybakken und Perrimon 2002) mit daraus resultierender desmoplastischer Reaktion, einem verstärkten Wachstum des peritumoralen Bindegewebes (Bailey et al. 2008). Die desmoplastische Reaktion wird als für verminderte Vaskularisierung des Tumors betrachtet. Damit ist es Faktor Chemotherapeutika wie Gemcitabin erschwert, in ausreichender Konzentration an ihre Zielzelle zu gelangen. Wurde am Mausmodell der Hedgehog-Signalweg inhibiert, zeigten Pankreastumore eine verstärkte Vaskularisierung, höhere intratumorale Gemcitabinkonzentrationen und einen verminderten Tumorprogress (Olive et al. 2009). Ein weiteres Indiz für die Bedeutung des Hedgehog-Signalwegs beim Pankreaskarzinom war der Nachweis von somatischen Mutationen in diesem System (Jones et al. 2008).

1.8 Polymorphismen in Kandidatengenen

Im Keimbahn-Genom des Menschen finden sich ca. zehn Millionen genetische Varianten, wobei es sich bei den meisten um Einzelbasen-Austausche (engl. single nucleotid polymorphisms, SNPs) handelt. Von einem Polymorphismus in der Allgemeinbevölkerung spricht man dann, wenn die Frequenz des selteneren Allels mindestens 1% beträgt. Neben den somatischen Mutationen des Tumors können Keimbahn-Polymorphismen einen Einfluss auf Entstehung einer Krebserkrankung sowie auf Ansprechen und Nebenwirkungen haben. Es kann davon ausgegangen werden, dass in einer Tumorzelle in der Regel dieselben Allele der Keimbahn-Polymorphismen vorliegen.

Zu Beginn meiner Dissertation im Jahr 2009 war über einen Einfluss von Polymorphismen auf das Therapieansprechen von Patienten mit Pankreaskarzinom noch kaum etwas bekannt. Lediglich war 2008 auf dem jährlichen Treffen der American Society of Clinical Oncology (ASCO) eine Studie über 17 Keimbahn-Polymorphismen in Kandidatengenen für Gemcitabin im Hinblick auf das Therapieansprechen bei operablem Pankreaskarzinom vorgestellt worden, ein klarer Zusammenhang singulärer Varianten auf die Überlebenszeit fand sich dabei nicht (Tagungsreport von Saif 2008). Diese Daten wurden später auch publiziert (Okazaki et al. 2010). Dieselben Genvarianten wurden anschließend auch noch bei nicht-operablem Pankreas-Karzinom analysiert, wo sich ebenfalls keine klare Assoziation singulärer SNPs mit dem Gesamtüberleben zeigte (Tanaka et al. 2010). Jedoch schien die ENTI-Intronvariante A201G (rs760370) das radiologisch erfassbare Therapieansprechen des Tumors zu beeinflussen. Zudem wirkten sich hier vier der 17 SNPs auf die Therapie-bedingte Neutropenie aus. Ein schon mehrfach untersuchtes Kandidatengen für die Hämatotoxizität unter Gemcitabin ist die auch in Blutzellen exprimierte CDA. Für den CDA-Polymorphismus 79 A>C (Lys27Gln) ist weder klar, ob das Gln27-Variantenallel die Enzymaktivität steigert (Giovannetti et al. 2008) oder senkt (Gilbert et al. 2006), noch ob Gln27 für das Risiko schwerer Neutropenien prädisponiert (Tanaka et al. 2010; Farrell et al. 2011) oder nicht (Sugiyama et al. 2007). In RRM1 waren zwei SNPs mit progressionsfreiem Überleben bei Pankreaskarzinom in der bereits erwähnten Studie assoziiert (Tanaka et al. 2010). Weiterhin gibt es Hinweise auf einen Einfluss der genetischen Variabilität von RRM1, RRM2 bzw. CMPK1 auf das Gesamt- und progressionsfreie Überleben bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (Li et al. 2012; Ryu et al. 2011; Dong et al. 2010) sowie für die Hämatotoxizität bei Mammakarzinom unter Gemcitabin-Therapie (Rha et al. 2007). Im Hedgehog-Signalweg sind bislang keine Genpolymorphismen hinsichtlich einer Assoziation mit dem Therapieansprechen auf Gemcitabin von Patienten mit Pankreaskarzinom beschrieben.

Aktuelle genomweite Studien berichten über Assoziationen von Polymorphismen der Gene *IL17F* und *PRB2* bzw. *PYCARD*, *MAPRE2* und *NOX4* mit dem Gesamtüberleben (Innocenti et al. 2012 bzw. ASCO-Report von Xu et al. 2011).

Weiterhin gibt es Untersuchungen, welche für einige SNPs der oben aufgeführten Gemcitabin-Kandidatengene (Transport, Metabolismus, Hedgehog-Signalweg) eine Funktionalität vermuten lassen. Die genetische Variabilität in den kodierenden Bereichen des *ENT1* ist sehr gering (Leabman et al. 2003). Eine funktionelle Bedeutung der wenigen seltenen Aminosäurevarianten konnte bei Transportmessungen nicht bestätigt werden (Osato et al. 2003). Polymorphismen im Promotorbereich des *ENT1*-Gens könnten die Expression dieses Gens modulieren (Myers et al. 2006; Preuß 2009). Für *NT5C3*-SNPs liegen *in vitro* Hinweise auf eine Beeinflussung der Expression dieses Gens vor (Aksoy et al. 2009). Reportergen-Untersuchungen zu Folge scheint auch die Expression der DCK durch Genpolymorphismen in der Promotorregion (Shi et al. 2004) bzw. die Stabilität des mRNA-Transkripts durch Varianten im 3'-Bereich reguliert (Lamba et al. 2007).

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Patienten mit Pankreaskarzinom haben trotz optimaler Therapie mit Resektion des Tumors und Gemcitabin-basierter Chemotherapie zumeist eine schlechte Prognose. Für nichtgenetische Faktoren wie Resektionsstatus, histopathologisches Grading, Tumorausbreitung und Metastasierung ist der Einfluss auf den Therapieerfolg bekannt. Ein Großteil der interindividuellen Variabilität des Therapieansprechens wird dadurch jedoch nicht erklärt. Als weitere relevante Parameter werden Genvarianten der Keimbahn diskutiert, insbesondere in Genen mit Bezug zur Gemcitabinwirkung. Jedoch gibt es gegenwärtig noch keine Daten dazu, welche überzeugend die Bedeutung eines Genpolymorphismus in diesem Zusammenhang belegen. Bei Kenntnis solcher genetischer Parameter könnten diese - prätherapeutisch bestimmt - als Biomarker für das Therapieansprechen von Patienten mit Pankreaskarzinom unter einer Gemcitabin-Therapie eingesetzt werden. Im Sinne einer personalisierten Medizin wäre es dann möglich, Wirkung und Nebenwirkung einer Gemcitabin-Therapie zu antizipieren. Dem einzelnen Patienten könnte eine nicht Erfolg versprechende, nebenwirkungsreiche Therapie erspart bleiben, sollte dieser nicht die genetischen Voraussetzungen dafür aufweisen. In diesen Fällen könnte auf alternative Therapiemodalitäten zurückgegriffen werden.

Vor diesem Hintergrund war es Ziel dieser Arbeit, gemäß dem Kandidatengenansatz Gene des Gemcitabin-Metabolismus, des Gemcitabin-Transports und des Hedgehog-Signalwegs auf therapeutisch relevante Varianten zu überprüfen. Als Kandidatengene wurden CDA, CMPK1, DCK, DCTD, ENT1, NT5C3, PTCH1, RRM1, RRM2, SHH und SMO gewählt. Für jedes dieser Gene waren SNPs zu analysieren, welche die genetische Variabilität aller Positionen mit einer Mindestallelfrequenz von 5% repräsentieren. Die Analysen sollten an DNA von Patienten mit der Diagnose eines duktalen Adenokarzinoms des Pankreas durchgeführt werden, die eine Gemcitabin-basierte Chemotherapie erhalten hatten. Dazu war aus einem Pool von über 500 wegen eines Pankreasprozesses zwischen 2003 und 2010 in der Allgemeinchirugie der Universitätsmedizin Göttingen behandelten Patienten eine möglichst homogene Patientenkohorte in Bezug auf Lokalisation und histologische Entität (adenoduktales Karzinom) zu ermitteln. Für diese Patienten sollte dann das Gesamtüberleben, der Verlauf der Chemotherapie sowie mögliche Hämatotoxizitäten unter Therapie erfasst werden. Die Gegenüberstellung der klinischen Nachsorgedaten und der Genanalysen wurde unter folgenden Fragestellungen vorgenommen:

- In welchem Ausma
 ß beeinflussen nicht-genetische Faktoren (Alter, Geschlecht, Resektionsstatus, histologisches Grading, Modalit
 äten der Gemcitabin-basierten Chemotherapie) das Gesamt
 überleben?
- 2. Wie verhalten sich die Werte der Zellzahlen von Leukozyten und Thrombozyten unter der Gemcitabin-Therapie? Besteht ein Zusammenhang mit dem therapeutischen *Outcome*?
- 3. Zeigen die untersuchten Genvarianten Assoziationen zum Gesamtüberleben der Patienten?
- 4. Zeigen die untersuchten Genvarianten einen Einfluss auf die Hämatotoxizitäten?
- 5. Lassen sich Effekte von klinisch als relevant identifizierten Genvarianten an funktionellen Daten aus einer *ex-vivo*-Studie mit Gemcitabin-inkubierten Leukozyten bestätigen?

2 Material

2.1 Geräte

Autoklav	Tecnorama, Fernwald
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau
BioRobot [®] EZ1	Qiagen, Hilden
Elektrophorese-Kammer (ComPhor L Mini)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Elektrophorese-Netzteil	Biometra, Göttingen
(Standard Power Pack P25)	
Feinwaage BL 610	Sartorius, Göttingen
Fluor-S TM MultiImager (für Gelfotografie)	BioRad, Hercules USA
Magnetrührer (IKAMAG RET)	IKA, Staufen
Labofuge 400 R	Heraeus, Hanau
Mehrkanal-Pipette (8er) 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Mini-Centrifuge, Model GMC-060	LMS, Tokyo, Japan
Mikroliter-Küvette für Photometer (LabelGuard™)	Implen, München
Mikrowelle MWS 2820	Bauknecht, Schorndorf
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gradienten-Cycler (384-Well und 96-Well), Typ Master-Cycler	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gradienten-Cycler (96-Well), Typ PTC-200 Peltier	MJ Research/BioRad, Hercules, USA
Photometer (Biophotometer 6313)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), Typen Research and Reference	Eppendorf, Hamburg
Rahmen und Septen für Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierer 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierplatten	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank VIP Series –86°C	Sanyo Electric Co Ltd., Japan
UV-Küvetten 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Vertikal-Autoklav KSG 40/60	KSG, Olching

Vertikal-Autoklav: FV für Sterilgut	Tecnorama, Fernwald
Vortexer (MS 2 Minishaker)	IKA, Staufen
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.2 Chemikalien

Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Anodenpuffer (für Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
CIAP	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Größenstandard 100 bp	Rapidozym, Berlin
DNA-Größenstandard 1 kb	Rapidozym, Berlin
dNTP-Set	ABgene, Epsom
Ethanol	J. T. Baker, Phillipsburg, USA
Ethidiumbromid (1% in H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Exonuklease I	USB, Staufen
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
GeneScan TM LIZ [®] 120 Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
GeneScan [™] LIZ [®] 400 HD [ROX] Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
HiDi-Lösung (enthält Formamid)	Applied Biosystems, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (SAP Puffer)	Merck, Darmstadt
Polymer POP6 (für Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt
Polymer POP7 (für Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt
Primer (Design nach gewünschter Sequenz, siehe Kapitel 2.3)	MWG-Biotech, Ebersberg
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	USB, Staufen
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen
Tris	Roth, Karlsruhe
Q-Solution	Qiagen

2.3 Primer zur Genotypisierung

<i>Gen</i> rs-Nummer	PCR-Primer, vorwärts (5'->3')	PCR-Primer, rückwärts (5'->3')	FL (bp)	PP	SNaPshot [™] -Primer (5'->3')	SP
CDA						
rs540282	CCCGGGGATACCACTGGTGATAAGTAG	GGCTCTCATCCATCCCAGAATTCATAG	128	1	(TGAC) $_5$ TGGAGGAGCCAGTATAATGGATGG	A
rs532545	TTAATTCTGGGCTAGGGCAAAGAGAAG	GTGACTGTAGGGGCAGTAGGCTGACT	651	1	GTTCATGCCTCCTGCCT	A
rs603412	"	n	"	1	(TGAC) 6TTCAGCAGGTGTGGTGTAAGACA	A
rs602950	"	"	"	1	CTGCAGGGACACCCCA	A
rs2072671	"	"	"	1	GTGACTGTAGGGGCAGTAGGCTGACT	A
rs818202	CCTGCAACCCTGAAAGGCAGAGAAG	CAGCTTTTGGAGTCAGGGGAAGTCTG	105	1	(GACT) 2CCAATCCCAGCTCTGTGATTT	A
rs10916824	CCCCTGGTTGTGAGGCTTTAAATGAG	CCTCCACAATCTGCCTCCAGATAATAAG	151	1	CACAATCTGCCTCCAGATAATAAG	A
rs577042	AGCTGTGGCACCCAGTAGTGTCTAATG	TGCCCAGCCTACACCTCCTTTTATAAGTC	252	1	CAACTCTGGACATGAATGCCTG	A
rs818194	CCCTGGGATGAGTGCTGAGGATAAG	CGCTTTATGTTTCAATGCTGCCTTTC	191	1	(GACT) $_5$ GTGATACAGACTCCTGTCCTACAAGAT	A
rs10916827	GCTCTGGCCCTAGACTCAGTGGTTTC	TCCCATGTCATTTTTTTTGCATCATTAAC	166	1	TGTGGTTTCAGGATCCAAGCAC	A
rs580032	CCAAGGAGACCCAGCTTAATTTGTTTC	TCTGATGTTAACAAGGGAGCTGGTACTTC	582	1	A_4 TGTTCTCAGCACAGCGTC	A
rs11579252	"	"	"	1	(CTGA) 4CTTCAGGGAAACTGAGCTGAATACC	A
rs527912	"	"	"	1	ACTGACTCGCACTCATGATTTGTTAAATTGAGA	A
rs1689924	CTCTCTCTTGGCAGGAACGTTGAGTAAG	TTACATACCCTGTGTCAGGAACTTTACAG	205	1	(CTGA) 2CTCTGTAACAGACCAGTCTCCTCCA	A
rs12404655	GCACGGTGGAAATGTCGAAGGTC	TCCCGGGCACACTCAATCTTCTG	348	1	(ACTG) $_2$ ACTTCTTATCATTTGCATTTGGTTTCAGT	A
rs12072405	"	"		1	CTTGACAGGCTGTGCCTAAGGGTAGGTAC	A
rs1048977	TGTACATGACCAAGCCGGATGGTAC	GCTGATGGGGAAGCAGTCCAGACTAG	368	1	(TGAC) 4TGCATTCTCTGGCTGTCACTG	A
rs1614627	AGTGTGAGGACAGGGAGGGACTGTTTC	TGTTGTGGCAAAGCCATTCTCATCAG	317	1	TAGGTCAGGACTGAATAAGGAAGGAG	A
CMPK1						
rs11211517	TGGACCTTGGCATCATCAGAAACTC	TGGGGAAAGGGACCAATGTCTTAGAG	156	2	A ₂₈ CCACTCAGACCAGCAGCATC	В
rs7543016	AGGGCGCAGGATAAAATATCTGCAGTC	FAM-CCAGGACGTGGAGCAGCC[G/C]	314	F_{LA}		
rs12132521	GGGATGCCCATTAAGCAAAAAGTCAC	TACATGGGCCTCTTGGTTCTTGATTAGAG	173	2	A ₁₉ TGTCATGACTACACAATAGAAAAAGCACT	В
rs35687416	GTGATGAAAGGAAGAACCCAGATTCACA	GGTTTGAACTGGTTGGCATTCACACTC	139	2	GTGATGAAAGGAAGAACCCAGATTCACA	В

<i>Gen</i> rs-Nummer	PCR-Primer, vorwärts (5'->3')	PCR-Primer, rückwärts (5'->3')	FL (bp)	PP	SNaPshot [™] -Primer (5'->3')	SP
rs6660321	CCCGATTCCCTGAATCTTCATCCTC	CTCCATCTCCAAACAGGGTCACACAC	425	2	CTCACCTCTATACAAAGTGTCAATGGAT	В
rs7534571	AAGCCATGAATGTGAGCTTTGGGTATG	GTCCTCAAAGGGCTGCAAAGTCTTAGAC	198	2	$\mathtt{A_{15}}\mathtt{GGAAGATATGTACTCTCAGTAGCTAT_{3}}\mathtt{CTATGAC}$	В
rs12039726	CGCCACTGCACTCCTACCTGAGAT	CTGGCACTTAAAATCTAGAGGGGAAATCAAC	233	2	CGCCACTGCACTCCTACCTGAGAT	В
DCK						
rs6446982	GCGCTTGCCTGTTGTCCCAGT	AGAAAACGGGGTACAGAAGCCATCA	577	4	(GACT) 4CTTTACACACAATAAATGAATAACAG	С
rs2306744	ACACAGTGCCTTCTCCCCAGATGAG	GACCTGCCGGGTCAGCTAGTGAG	481	E_1	T ₃ GAGGAGGGCGGGGCCGC	С
rs12648166	CAGGATTTCACTCTGTTGCCCAGGTAAAG	CATGTATGCGGGTGAATTTATGTTCACAG	418	3	GGACAAACAGTGATAGACGAATAAAATTAAATACTA	D
rs10805074	GGGGTCAGCTGTCAGTGCAGTTATC	AACGGACCTTAAATGGAGGTCACCTAGTC	128	3	(CTGA) 3CTCTCTGGTTTAATCTGGTTAGTTTCTGTCTAC	D
rs11544786	ATGGTGGGAATGTTCTTCAGATGATG	ATCCCCAGCTCAGCCATTCATTATTAC	287	4	(TGAC) $_4$ TGGTCTTTTACCTTCCAAACATATGC	D
DCTD						
rs5016499	GGCCGGTGCTCTTTCTCTCATGAC	TGAGACCTGTGACTGGGGAAACAGAG	90	2	A ₁₁ GCCACCTTCCTGACTCCTTG	В
rs13111117	GCATTTTAGGCATCACGTGTGCATTTC	ACCCCTGGTTCTGCCTGTCTTCTCTG	613	2	A ₁₆ TGGAAATAGCTGTACTGCATCCAC	В
rs10016530	"	"	"	2	(TGAC) $_2$ TAAGAAGATGCTTGACTGGTAGGTTG	В
rs10520543	AGGCCCCAGTAGTTCCTGTCACA	TCCATCCCTGGTTAGATTTAAGAGTTCA	250	2	A ₂₀ TCCCTGGTTAGATTTAAGAGTTCAGC	В
rs13148414	CCCATGCCGTCAGGGTTTATGAG	CTCAGTCCTGCCTAAAACTGAGCAATCTC	171	2	(GACT) 5GGCATGGCTCTGGTCACT	В
rs6834019	"	CTCAGTCCTGCCTAAAACTGAGCAATCTC	171	2	TCACTGACCACAGCCCATCAGAGAAT	В
rs4742	CACGTGGGCCTCATTTGGTATTCTTAG	GATGATGAGCTTAGCGCATTCATTACAAG	276	2	A ₂₃ CGATGTGAAAGGCTGTAGTATGTATGT	В
rs1960207	ACTGTAAAGTTTTCCAGCGCTTCATGGT	ATGGGGTGGTGTGGTTTGTATGTTTTC	571	2	GGTCCCACTGCTGCTGAAC	В
rs2515683	"	"	"	2	(ACTG) $_2$ ACTCTTTTTAATTGTTGTAGAAGAAATGAGGAAC	В
rs10017797	"	"	"	2	ACTGACTAGCTGACTTGTTAGAAATCCTTTGACT	В
rs7278	AGCACTGTTGGTGTTCGGAGCTCTTC	ATCCATAAAGCAGCCCCAGACATCAAC	423	2	A ₁₉ CAGCCACACGCTCCCC	В
rs3924787	GAAACCCATCCGATTAGTGGATTTCTTG	CCTGCAGCCTCCTCTATCGAATGTG	676	2	A ₄ GAATGCTTTCTGTTGTAGGAGTTCTGTAT	В
rs4073676	"	"	"	2	(TGAC) 3TGAAGTTTTTGACAAAACAAGCCTGA	В
rs4073675	"	"	"	2	CAGAAGCCCCAGCAAGTATTCT	В
NT5C3						
rs6946062	TGGCTGGATTCCTTGCTTCTGTGTC	GGAGTAGCACCCATCATGTCCATAATCAG	120	4	ACTGACTAACCCAGTCAACATCATATAGTTGGA	С
rs7795860	CAAGTGCTTAGAGGCATCTGGCACATAG	AGGGCCACAAAGGGCTCCATTTC	510	4	ACTGCTTATTCACCTCTTCTGTATTAGTGAACATTT	D

16

2 Material

Gen	PCR-Primer, vorwärts (5'->3')	PCR-Primer, rückwärts (5'->3')	FL	PP	SNaPshot [™] -Primer (5'->3')	SP
rs-Nummer	"	, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	(bp)	Δ		
rs12668520	ͲϪϪͲϹϹϪϹϪͲͲϹͲϹϹͲϹϹͲϹϹͲϹϪϹ	ϪϹϪͲͲϪϹͲϹϹͲϹͲϹϪͲͲϹϪϹϹϹϹͲϪͲϪϹϪ	599	т Д		ם
rs17170218	"		"	т Д		C
ro2750117			511	1		
153730117			J14	4		D
rs1/1/0153				4	(TGAC) ₂ TAGAGAGATTAGATAATTAGAGCTCATTTTGTTATTC	D
rs4394301	TGACATGCCTGTGAGACGTACAAGAGAAG	GGTCAGGCAATTTCTTCCAGCTTACACTG	152	4	(CTGA) ₃ CTTTCCTGCTCAGATTTCTCCTTTG	С
RRM1						
rs1561876	CACCTCTGGGGTTCAGCTTCTGTC	ATCTGAGGCACACATGTCAGAAGCTACTC	162	3	(GACT) $_4$ GGTTTCTTGTTTCTGTCTCTTGCTTTC	С
rs1465952	TCCTTTGCCCAGGGAAAATGAAAC	GGTAACCCTGCCCACAGAGCTTCT	64	3	(CTGA) 4CTGGAAAATGAAACTTGAATGCACAT	D
rs11030918	GCCACCATCCACTGAAGAACCCTAAAAG	CGGGGTTCGAATGACGTTACTCGAC	596	3	GACTTGACCCTGCCTGCTTAAAAT	С
rs12806698	u.	"	"	3	GTCGCCTGTCAGTCTGTGAAG	D
rs10835613	CCACCCATATTTCCGTCTCCTTATTTAG	CTGCAACATTCTTGCGCTCTAAAATGTA	512	3	CCACCCATATTTCCGTCTCCTTATTTAG	С
rs7932702	u.	"	"	3	TCTAGGGGAGGACAAAGATC	D
rs10498198	n	"	"	3	CTGCAACATTCTTGCGCTCTAAAATGTA	С
rs183484	TGGGCATTTTTCCAAAGCAGAAGTAG	CCTTGTTCCCACCTTGATCCACATATC	244	3	CCTTGTTCCCACCTTGATCCACATATC	D
rs9937	GGGTTTGAAGACTGGGATGTATTATTTAAGGAC	GCTGCTGTGTTCCTCTCCTTCTCTTC	138	4	(TGAC) ₂ TATTGGATTAGCCGCTGGTCT	D
rs1042858	u.	"	"	4	(ACTG) 3ACTTTAGAGTGAACTGGATTGGATTAGC	С
rs1042919	CCTGTTGCAGGCAAAAGGAGTAATTG	CTTACTTAACCACTCCCTGTATGCAAGATGAC	201	4	GGAGTAATTGATTTAAAGTACTGTTAATGATG	D
RRM2						
rs7574663	CAGGGGTCAGGAAAACAAGTTCATTGAC	CTTCTTTTCCCCACGACATTGACTTTGAA	121	3	(CTT) ₂ TTCCCCACGACATTGACTTTGAA	D
rs1130609	CGGGAGATTTAAAGGCTGCTGGAG	GACACGGAGGGAGAGCATAGTGG	115	4	GACACGGAGGGAGAGCATAGTGG	D
rs6741290	TTAGGAAATCGAGCGCTCACAAATC	TACTGGCAGCATCGCACTCTTTGTAC	160	4	TGACTAAGTTGAGCATATGACATAAAATATCAAAGAA	С
rs4668664	AATGGGACTGAGCTTGCCTTGGT	CTCAGCCATACTGAGAGCACTTGAACTC	98	3	AATGGGACTGAGCTTGCCTTGGT	С
rs1138729	GGGATTGCAGGCGTGATAAACAAATATTC	GCCTGTACCTCACAATGCAAGACAAAG	343	4	(GACT) 4CAGTATTTGAACGTCGTCCTGTTT	С
ENT1						
rs9357436	CAACCCTACAATAGCACATGGTCATC	TAAAGGAAGCAGAAGAGAGGAGCTAGAGAG	111	5	(TGAC) 3TTTCCTCTCCTTCCAGTTGCTTC	Ε
rs2297393	AGGCAAATCCAGCCAGAGACTGATTC	GCTGGCTGAGAATGAACAGCAGACAG	726	5	CCTACCCCACCAATCC	F

<i>Gen</i> rs-Nummer	PCR-Primer, vorwärts (5'->3')	PCR-Primer, rückwärts (5'->3')) (bp)	PP	SNaPshot [™] -Primer (5'->3')	SP
rs3734701	"	"	"	5	(GACT) 4GCTTCGATTGCTGCTGTCC	F
rs1057985	CCAGTGCTTAACTGAGGGACAAGTG	TGCCAGGCCAGGTTAAACTGTT	242	5	(ACTG) 5CAGGTCTGCCTCCATA	E
rs66872347	CATCGGTTTCCTTCGGGAGTCTTC	GCCCCTAGTTCTCTCCCTCCTCATCTC	385	5	CTGACTCGCAGCCCGCGCCG	F
rs67057732	"	u,	"	5	(GACT) ₄ CCATAGCCACAGCTGGAGA	F
rs6914414	CACTTGGCATCATGGAGTCTTGATTTG	CAACAGAGCAAGACCTTGTCTGAAAACAC	445	5	(TGAC) 5TAGGCGTGAGCCACCAC	F
rs9462977	CAATGGCAGGATGATGGCTCACTGA	GGCCTTGTGACAGGGCTGGGACTAG	354	5	(CTGA) 6CTTAGAGCCCGGGAGGAC	F
rs11274220	FAM-GATCCCCATCGATCTGGTCGGTATC	CTCCTGGTAAGCAAAGCCGAGGACTG	271	F_{LA}		
rs693955	GACGGGTGATCCCCATCGATC	CTCCTGGTAAGCAAAGCCGAGGACTG	278	E ₂	(ACTG) 5ACTTAAGCAAAGCCGAGGACTGT	E
rs1886884	GGCTGAGCTGCCTGACACTCAAG	AGAGCTGGTGAGTGGAGGAGCTAGAATC	195	5	ACTGACTAAGTCAGGCTGGGAATGATCT	F
rs747199	TCTTGGAAAACCGGCCAGCAACTAG	AGGCCCCTCTCTGCAAGTCTGGTCT	181	5	(ACTG) $_4$ ACTTGGCTGGAAAGAAAGGTTAAG	Е
rs9394992	CCTCCTGTGCCAAAGGCTATGAAAC	TGGGAAATGACTGAGCTGTGCAATAAG	315	5	GCAGTTCCCTGAAGGCCT	E
rs324148	TGCCCTGGGTGGTATGAACTACAAAG	TCCCAGACCCAGCATGAAGAAGATAAG	640	5	GAAGAGAGGGCCTTAGAGCC	E
rs324149	"	u,	"	5	ACTGACTCCCATAAGAGGACACATGCAAA	E
rs45573936	TCAGAAAGTGCCTTCGGCTACTTTATC	CCCAGGTAACAGATGATGGTCAAAATG	71	5	(TGAC) 5TCAGGTAACAGATGATGGTCAAAATG	E
rs1128930	GACCCAGAGAGGGAACCCAAGAAAG	ACGTGTATGGTGGGGTTGTCTTTCACTC	768	5	(ACTG) $_4$ GGCAGGTATGTGTATATACATATATTCAT	E
rs760370	"	IT.	"	5	(TGAC) ₂ TGGAGGTGGAGACAGGTTTGC	E
PTCH1						
rs71366293	AGCAGCAGCGGCTGGTCTGTC	FAM-CGTTACCAGCCGAGGCCATGTTG	190	\mathbf{F}_{LA}		
rs10512249	CTTTTCTCGTTATGCTTTGGTGGTTGA	GCGGGTGTAACTGCAAAATTATTAGCAC	306	6	ACTGACTCATGAAGTGAGCCCAGTGAGAG	G
rs473902	"	11	"	6	(GACT) 5TTCCCATGGCAACACGC	G
rs574688	GGCCACACTCTGCCAATCATTGC	GCATTAGACATGCGAGATGCAATTCA	255	6	TGCATTAGACATGCGAGATGCAATTCA	Н
rs2066836	TGCCACGTATCTGCTCACACAGTC	GTTCAGGATCACCACAGCCTTCATC	101	6	TCACAGCCTTCTTCATGGC	G
rs2236407	GCACCCCCAACCCAAGACAGTATTAAG	GGACCCTGCAGGAAATTCTCCAC	247	6	GGACCCTGCAGGAAATTCTCCAC	G
rs357564	ATTGGCTCCCCAGGGTTGACTGAG	CTGGGTTCCGAGGGTTGTGAGAAC	371	6	GTCTCTGCGCGGTCTGTAG	Н
rs357565	TGGAGCCATCAGAAACTGTTGTTTCATC	TGGCCATATTTTTCTCCATGCCTATGATG	510	6	(CTGA) 2CTGCTTTTAGTGTGATCATCACCCAAATA	G
rs16909856	CCCAGGCCAGGAGCTTGACTGTTA	GGGGCTGTCCAATTCTCACTCAGA	343	6	CCCAGGCCAGGAGCTTGACTGTTA	Н
rs357563	TI II	"	"	6	GGGGCTGTCCAATTCTCACTCAGA	G

<i>Gen</i> rs-Nummer	PCR-Primer, vorwärts (5'->3')	PCR-Primer, rückwärts (5'->3')	FL (bp)	PP	SNaPshot [™] -Primer (5'->3')	SP
SHH						
rs288746	CACCGAGTCTTGTTAACGCTCAGCCTCT	GTTTCCAGAAGTTCCCTTTGCAGATCAAC	122	6	CACCGAGTCTTGTTAACGCTCAGCCTCT	Н
rs872723	CTCACCCCTGGCTCTGCACTTTG	CCTCTGTGGACCGAGGATAATTATGAGTG	380	6	ACTGTGCCTTAGAAAAATGTAAAAATACTGCT	G
rs756884	AATCCCCCTCCCACAAACATGAAG	GCCTCCTGGCTTTTCCAGTTGAG	180	6	(ACTG) 2ACTCTACGTTCGTTCGTTCGTACAGT	Н
rs9333596	"	"	"	6	(ACTG) 3ACTCACCTCCCCACCAAAGAAT	Н
rs1233556	GCCCTCTGCAGAAGTCACCTTG	GCACTGACTTGCTTCCTGGATGTTTAC	156	6	(TGAC) 4TCAGTTCCCCCTCTTTAAATCCC	Н
rs1233571	GCTGGAGAAACCTCAGCTCTGTTTG	GGCTTACACATCAGGCTTTGCTAGTTAAG	138	6	(CTGA) $_3$ CTGTTTGTATTTATTGTGTGAAGCTCTTTCTAC	G
rs1233560	CAGGCTTAGGGAACAGGAGTGAACAGAC	AACCATCGCACTTCCTCCGAGATTG	277	6	GGCTCCAGAGGCCCTGC	G
SMO						
rs6962740	AACCCTTTAAACAATCCTCGTGAGAACTC	AGGTGGGTTTTGAATCCAGGACTAAAG	376	6	(CTGA) 5ATGGTTTAGCACCATCCTCCT	G
rs11762252	CCAGCTCAAGTCTTCAATTTTGCTTCAG	GAGGGGGATGTGACTAGACAAGACACAG	191	6	(GACT) $_4$ CATCTGGGTCAATAACTAGACCACAGT	Н
rs2718107	CGCCCAACCAGTACCATGCTCTATAGAC	TGTGTCATCAGGCAATGTCATCTTTGTGT	398	6	TGTGTCATCAGGCAATGTCATCTTTGTGT	Н
rs4731562	CGCACTGGACAGAGCCTCTTCTGTTC	CCCCTCCTCACTCTGACCCACAGAC	743	6	(ACTG) 3ACTAGAACCCTTGTTCCTCTTACCAAG	Н
rs2566871	"	"	"	6	TCACTCTGACCCACAGAC	Н
rs2228617	CCTCTCTCGGGCAAGACCTCCTAC	CGGTAGTTCTTGTAGCCCACAAAACAAAT	234	6	CGGTAGTTCTTGTAGCCCACAAAACAAAT	G

Tab. 1 Primer zur Genotypisierung. Die Primer für Polymeraseketten-Reaktion (PCR) und SNaPshot[™]-PCR sind mit ihrer rs-Nummer gemäß der NCBI-Datenbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/) angegeben und nach Genen geordnet. Zu jedem Primerpaar (vorwärts und rückwärts) ist die entsprechende Fragmentlänge (FL) des PCR-Produktes in Basenpaaren (bp) und die Zuteilung in die sechs Multiplex-PCR-Pools (PP) angeführt. Es wurden zwei Einzel-PCRs (E_{1/2}) und zwei Fragmentlängenanalysen (F_{LA)} durchgeführt. Unter "SP" ist die Zugehörigkeit der Primer zu den acht SNaPshot[™]-Primerpools (SP) von A bis H aufgelistet.

2.4 Verbrauchsmaterial

2,7-ml-K-EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Labortücher	Kimberly-Clark, Surrey, UK
Mikroschraubröhrchen (2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
NaCl-Lösung, isoton 0,9%	Braun, Melsungen
PCR-Folien (Adhesive PCR Foil Seals)	Abgene, Epsom
Pipettenspitzen (10 µl), extended length	Starlab, Ahrensberg
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Platten, Thermo fast 384-Well	Abgene, Epsom
Platten, Thermo fast 96-Well	Abgene, Epsom
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spitzen für Multipipette plus (Combitip plus 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,5, 5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterile Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Streifen, Flat cap strips (8er) für PCR-Platten	Abgene, Epsom

2.5 Wiederverwendbare Materialien

Rahmen und Septen für Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierplatten	Applied Biosystems, Darmstadt

2.6 Kits

EZ1 DNA Blood Kit zur DNA-Isolierung aus Gesamtblut, vollautomatisch	Qiagen, Hilden
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
SNaPshot TM - Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

2.7 Lösungen und Puffer

Probenpuffer für Gelelektrophorese	Bromphenolblau	0,25 % (v/v)
	Ficoll Puffer Typ 400	15 % (v/v)
	in 1 % TBE	
Restriktionsenzym-Puffer	Tris	200 mM
	MgCl ₂	100 mM
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer),	Tris	1 M
als 10x konzentriert hergestellt, mit HCl	Borsäure	1 M
uu pii 0,0 emgestem	EDTA	30 mM
TE-Puffer,	Tris	10 mM
pH 7,5, eingestein mit HCI	EDTA	1 mM

2.8 Software

Adobe Illustrator CS3 (Version 13.0.0)

Bildbearbeitung

Adobe Photoshop CS2 (Version 9.0.2)

Bildbearbeitung

3100 Data Collection Software Version 1.0 (Applied Biosystems)

Datenerhebung mit dem 3100 Genetic Analyser Sequenzierer

GeneScan Analysis (Version 3.5.1) (Applied Biosystems)

Auswertung von DNA-Fragment-Analysen im Sequenzierer

<u>HaploView-Software</u> (http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview)

Software zur grafischen Aufbereitung von Daten aus den Genotyp-Datenbanken.

Microsoft Office

Programme für Textverarbeitung, Präsentationen und Tabellenkalkulation

<u>OLIGO</u> (http://www.oligo.net)

Software zum Primer-Design

Quantity One S Version 4.2.1 (BioRad)

Grafische Darstellung und Auswertung von Gelbildern unter Bestimmung von Fragmentlängen

SPSS (Version 12.0) und R (Version 2.13.1)

Statistische Testung auf Korrelation und Grafische Darstellung von Messdaten

2.9 Datenbanken

NCBI (http://www.nih.gov/)

Aus dieser Datenbank wurden Informationen zu Genen und deren Poloymorphismen gewonnen (Sub-Datenbank dbSNP, http://www.ncbi.nlm.gov/SNP). Weiterhin fand sich dort die Literatur-Datenbank PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

HapMap-Projekt (http://www.hapmap.org/index.html.en)

Zu Beginn meiner Dissertation war die HapMap-Datenbank die weltweit umfangreichste und detaillierteste zur genetischen Variabilität in unterschiedlichen ethnischen Gruppen. Auf Basis dieser Daten wurde für die Kandidatengene meiner Arbeit über das paarweise Kopplungsungleichgewicht (engl. *linkage disequilibrium, LD*) jeweils der Satz an Genpolymorphismen bestimmt, welcher die Variabilität des betrachteten Gens umfassend repräsentiert (so genannte *tagging SNPs*, mit Algorithmus der Software HaploView).

1000 humane genome-Projekt (http://www.1000genomes.org/)

Zum Ende meiner Dissertation konnten auf Basis der genomweiten Daten des "1000 *humane genome*-Projekts" Häufigkeiten einzelner Genvarianten zwischen unterschiedlichen Ethnizitäten verglichen werden.

3 Methoden

Nachfolgend werden zunächst die Auswahl der Patienten, dann die Genotypisierung auf 109 Marker in Kandidatengenen für die Gemcitabin-Empfindlichkeit und schließlich die statistischen Verfahren beschrieben.

3.1 Patientenauswahl und Nachsorge

Als Teilnehmer der klinischen Studie kamen 552 Personen in Betracht, die zwischen 2003 und 2010 in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen wegen des Verdachts eines malignen Pankreasprozesses behandelt wurden. Die Patienten hatten im Rahmen des Therapieaufenthalts in DNA-Analysen eingewilligt. Aus EDTA-Blutproben oder asservierten Leukozyten-Pellets wurde später DNA isoliert.

Für meine Studie kamen schließlich nur histopathologisch gesicherte duktale Adenokarzinome des Pankreas in Frage, bei denen eine Gemcitabin-haltige Chemotherapie durchgeführt wurde. Unter Sichtung von Arztbriefen, OP-Berichten und Pathologiebefunden wurde dies überprüft. Nicht weiter berücksichtigt wurden in diesem Zusammenhang benigne Prozesse des Pankreas (z.B. chronische Pankreatitis, zystische Prozesse), Tumore abweichender Entität wie neuroendokrine Tumore, IPMN (intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien), Tumore mit adenosquamösen bzw. zystischen Anteilen sowie alle Tumore, deren Ursprungslokalisation nicht im Pankreas selbst lag (z.B. Karzinome der Papilla Vateri). Aufgrund der *per se* besseren Prognose von Patienten mit histopathologischem Tumorgrading G1 blieben auch diese Fälle von den weiteren Betrachtungen ausgeschlossen. Patienten, die postoperativ nicht mit Gemcitabin behandelt wurden, sowie Patienten, für die es nicht möglich war, Daten zur Nachsorge zu erheben, blieben ebenfalls unberücksichtigt. Einschränkungen hinsichtlich des Alters der Patienten gab es nicht.

Zur Nachsorge der Therapieverläufe der Studienpatienten wurden ca. 90 Hausarztpraxen und 40 onkologischen Praxen bzw. Ambulanzen im Raum Südniedersachsen und Nordhessen kontaktiert. So konnten Informationen zur Hauptzielgröße Überlebenszeit der Patienten ab Beginn der Gemcitabin-Therapie erfasst werden. Weiterhin wurden Art und Dauer der dokumentiert. Chemotherapie Hierzu gehörten Angaben zu möglichen Kombinationspräparaten, Zyklenzahl und Dosis der einzelnen Gemcitabingaben. Gründe für die Beendigung der Therapie wurden ebenfalls erfragt. Um den Aspekt der Hämatotoxizität der Gemcitabin-Therapie als Nebenzielgröße in die Auswertungen einbeziehen zu können, wurde der Verlauf der hämatologischen Kumulativbefunde für die ersten 42 Therapietage verfolgt.

3.2 Genotypisierung

Als Untersuchungsmaterial diente genomische Keimbahn-DNA aus Zellen des peripheren Blutes. Die gewünschten Genabschnitte wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) im Einzel- und Multiplex-PCR-Verfahren vervielfältigt (siehe Kapitel 3.2.3). Hierbei waren Gradienten-PCR und Gelelektrophorese (3.2.4) entscheidend zur Etablierung der Reaktion. Die meisten Genvarianten wurden mit dem Primerextensionsverfahren (SNaPshotTM) typisiert (siehe Abschnitt 3.2.5). In zwei Fällen war eine Fragmentlängenanalyse erforderlich (siehe Kapitel 3.2.6).

3.2.1 Isolierung von genomischer DNA

Das EDTA-Blut der Studienpatienten hatte zur Konservierung bei -20°C gelagert. Unter Zuhilfenahme des Bio Robots EZ1 (Qiagen) und des EZ1 DNA Blood Kits (Qiagen) konnte aus den zuvor auf Zimmertemperatur gebrachten Blutproben die DNA extrahiert werden. Dabei wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren. Aus 350 µl Vollblut eines Patienten wurden 200 µl DNA-Eluat gewonnen. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch (siehe Abschnitt 3.2.2). In einer Endkonzentration von 10 ng/µl wurden die gewonnenen DNA-Proben in destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst und zur Lagerung bei -20°C auf 96-Well-Platten übertragen.

3.2.2 Quantifizierung von genomischer DNA

Die Bestimmung der DNA-Menge erfolgte durch Ermittlung der optischen Dichte (OD) im Photometer (Eppendorf) unter Einsatz von UV-durchlässigen Küvetten (UVetten 50-1000 µl, Eppendorf). Ein spezieller Adapter der Firma Implen machte die Messung kleiner Mengen unverdünnter Nukleinsäureproben im Mikroliterbereich möglich. So konnte aus jeder isolierten Nukleinsäureprobe jeweils 3 µl auf die Messzelle (LabelGuardTM, Firma Implen) aufgetragen werden. War die Messung erfolgt, wurden Messfenster und Deckel des Mikroliteradapters mit Ethanol gereinigt. Als Leerwert wurde ddH₂O genutzt.

Eine OD von 1, bei einer Wellenlänge von 260 nm, entspricht einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml. Dabei beruht die Konzentrationsbestimmung von DNA auf dem bekannten Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm. Verunreinigungen der Proben durch Proteine können aufgrund ihres abweichenden Absorptionsmaximums von 280 nm erkannt werden. Der Quotient aus Extinktion₂₆₀ / Extinktion₂₈₀ dient als Maßstab für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung. Werte zwischen 1,8 und 2,0 lassen auf Proben mit hohem Reinheitsgrad der Nukleinsäure schließen und machen eine Verunreinigung unwahrscheinlich.

3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine in-vitro-Methode zur enzymatischen Vervielfältigung von doppelsträngigen Nukleinsäuren. Sie ermöglicht die Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente in Größenordnungen bis zu > 10 Milliarden. Dabei wird im Optimalfall von einer Verdopplung der kopierten DNA-Stränge während eines Reaktionszyklus ausgegangen. Ein PCR-Zyklus besteht aus den drei Schritten Denaturierung, Hybridisierung (Annealing) und Elongation. Diese sich stetig wiederholende Abfolge (z.B. 35 Mal) stellt das Hauptprinzip der PCR dar. Hierbei kommt es initial zur Trennung der komplementären DNA-Stränge durch Erhitzung des Reaktionsansatzes auf 95°C (Denaturierung). Der Reaktionsansatz besteht klassischerweise aus Reaktionspuffer, unterschiedlichen Basen. Nukleotiden mit den vier den beiden spezifischen Oligonukleotidprimern, einer DNA-Polymerase und dem DNA-Template. Zur Verbesserung der Amplifikation von GC-reichen Regionen kann zusätzlich Q-Solution der Firma Qiagen verwendet werden. Während des sich anschließenden Reaktionsschritts der Hybridisierung wird es den Oligonukleotidprimern durch Senkung der Temperatur auf 57 - 70°C ermöglicht sich an die vorliegenden DNA-Einzelstränge anzulagern. Der einmal gebundene Primer dient der DNA-Polymerase als Startpunkt für den Einbau von Nukleotiden (dNTPs). Hierbei erfolgt die Anlagerung der dNTPs in den entstehenden Strang komplementär zum jeweiligen Nukleotid der DNA-Matrize (Elongination). Dieser Vorgang startet stets am 3'-Ende des Primers. Die verwendete Taq-DNA-Polymerase ist thermostabil und kann so die initialen Denaturierungsschritte bis 95°C überdauern. Mit der Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 72°C wird ihr Temperaturoptimun erreicht. Zusätzlich wird ein Bindungsbruch zwischen nicht vollständig komplementären Primer-DNA-Komplexen erzeugt, was die unerwünschte Entstehung von Nebenprodukten vermeidet. Der gesamten Reaktion ist initial ein Denaturierungsschritt bei 95°C vorgeschaltet. Zum Ende der Reaktion folgt ein einmaliger, 10-minütiger Elongationsschritt in dem nicht komplett synthetisierte Fragmente vervollständigt werden sollen. Die Standard-PCR-Bedingungen sind in Tab.2 aufgeführt.

Phase	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	
Anlagerung	50-70 °C	30 s	35 Zyklen
Verlängerung	72 °C	1 min/kb	
Terminale Elongation	72 °C	10 min	
Lagerung	8°C	×	

Tab. 2 Standard-Bedingungen für PCR mit Taq-Polymerase.

Entscheidend für die Spezifität der PCR-Reaktion ist die Sequenz der einzelnen Primer, welche die zu amplifizierende Zielregionen der DNA-Matrize flankieren. Für diese Arbeit wurden Primer mit Hilfe des Programms OLIGO ausgewählt. Die Länge der Primer lag meist zwischen 20 und 30 Nukleotiden. Eine Auflistung aller verwendeten PCR-Primer zeigt Tab. 1 im Materialteil dieser Arbeit (siehe Kapitel 2.3).

Zur Etablierung idealer PCR-Bedingungen (optimale Annealing-Temperatur, mit oder ohne Q-Solution) wurde jeweils eine Gradienten-PCR durchgeführt. Damit sollte die Amplifizierung einer möglichst hohen Kopienzahl der gewünschten DNA-Fragmente gewährleistet und das Auftreten von Nebenprodukten minimiert werden. Hierfür wurden stets zwei Reaktionsansätze (mit und ohne Q-Solution) auf eine 96-Well-Platte vorgelegt und mit DNA versetzt. Um mehrere Temperaturen gleichzeitig zu testen, wurden die Proben dann im Heizblock entlang eines Temperaturgradienten (57 - 70°C) angeordnet. Der Reaktionsansatz, wie auch die Reaktionsbedingungen im Thermocycler, entsprachen hierbei dem Protokoll des Herstellers. Nach Ablauf der Reaktion konnten die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und ausgewertet werden (siehe Kapitel 3.2.4, Abb. 3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde standardmäßig das Multiplex-Verfahren (M-PCR) verwandt. Es ermöglicht die Vervielfältigung von bis zu 25 PCR-Fragmenten gleich mehrerer DNA-Abschnitte. Sechs Multiplex-PCR's mit neun bis maximal 18 Fragmenten konnten im Rahmen der Genotypisierung der Kandidatengene *CDA*, *CMPK1*, *DCK*, *DCTD*, *ENT1*, *NT5C3*, *PTCH1*, *RRM1*, *RRM2*, *SHH* und *SMO* etabliert werden. Ein Standard-Reaktionsansatz für eine Multiplex-PCR ist in Tab. 3 aufgeführt. Die einzelnen Primer waren in TE-Puffer gelöst und innerhalb der sechs Primer-Pools (siehe Tab. 1 in Kapitel 2.3) auf eine Konzentration von 2 µM gebracht worden.

	Volumen/Reaktion
Multiplex-Mastermix (Qiagen)	6 µl
Q-Solution (5x)	1,2 µl
Primer-Pool	1,2 µl
ddH ₂ O	2,8 µl

Tab. 3 Pipettierschema für Multiplex-PCR.

Ein DNA-Fragment im *ENT1*-Gen und ein Fragment im *DCK*-Gen konnten mit der Multiplex-Methode nicht zufriedenstellend vervielfältigt werden. In diesen Fällen kam jeweils eine Einzel-PCR zur Anwendung. Das Pipettierschema hierfür findet sich in Tab. 4. Es wurde angestrebt, den Reaktionsansatz auf ein Gesamtvolumen von $12 \mu l$ je Probe zusammenzustellen.
	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10 x PCR Puffer	1,2 µl	1 x
Q-Solution (5x) (optional)	2,4 µl	1 x
dNTP (10mM each))	0,24 µl	0,2 mM
Primer-F (100 μM)	0,12 µl	1 μM
Primer-R (100 μM)	0,12 µl	1 μM
Taq Polymerase (5U/µl)	0,06 µl	0,025 U/µl
ddH ₂ O	5,86 µl	
Total	10 µl	
Genomische DNA (10 µg/ml)	2 µl	

Tab. 4 Pipettierschema für Einzel-PCR im 12-µl-Maßstab.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Der Begriff Elektrophorese steht für die Wanderung geladener Teilchen durch ein Trägermaterial in einem elektrischen Feld. Je nach Größe und Ladung besitzen Teilchen eine bestimmte elektrophoretische Beweglichkeit. Substanzgemische lassen sich dahingehend auftrennen. Die Gelelektrophorese mit Agarose bietet die Möglichkeit zur Auftrennung von Nukleinsäuren. Das Bild einer solchen Gelelektrophorese einer Multiplex-Gradienten-PCR zeigt Abb. 3. Unter Einfluss des elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren entsprechend ihrer Fragmentlänge unterschiedlich schnell zur Anode.

Bei dem Polysaccharid Agarose handelt es sich um ein Polymer, bestehend aus verschieden gekoppelten Galactoseeinheiten. Die Polymere vernetzen sich proportional zur eingesetzten Menge an Agarose und steigern damit die Geldichte. Diese beeinflusst die Geschwindigkeit, mit der sich die Nukleinsäuren im Trägermedium zur Anode bewegen. Im Rahmen meiner Arbeit wurde dementsprechend die Agarose-Menge zur Herstellung eines Gels in Abhängigkeit der Länge der aufzutrennenden Nukleinsäuren gewählt. Bei kleinen DNA-Fragmenten, bis maximal 1 kb, lag der Agarosegehalt relativ hoch (2 - 3%). Zur Auftrennung von größeren DNA-Stücken kamen niedrig-prozentige Agarosegele (0,8 - 1%) zur Anwendung. Ein zwei-prozentiges Agarosegel wurde durch Resuspendierung von 1 g Agarose in 50 ml TBE-Puffer hergestellt. Das Gemisch wurde so weit aufgekocht, bis sich keine Schlieren mehr zeigten und die Flüssigkeit klar war. Nach leichter Abkühlung und unter stetem Rührvorgang wurde dann 1 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Die interkalierende Substanz Ethidiumbromid lagert sich in doppelsträngige DNA ein und bindet zwischen den Nukleinbasen. Fluoreszierend in UV-Licht ermöglicht sie später das Sichtbarwerden der DNA-Banden im Gel. War das Gemisch auf ca. 50 - 60°C abgekühlt, konnte es in einen vorbereiteten Gelträger mit Kamm eingebracht werden. Der Kamm hinterlässt nach Abkühlung und Aushärtung des Gels Taschen. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit Ladepuffer versehen und in Volumina von 15 μ l (12 μ l PCR-Produkt und 3 μ l Ladepuffer) in diese Taschen hineingegeben. Ein Längenstandard diente jeweils als Referenz. Er wurde unter Berücksichtigung der Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente gewählt und in eine äußere Geltasche eingebracht. Kurze Fragmente (bis 1 kb) liefen zusammen mit einer 100 bp Leiter, längere Fragmente parallel zu einer 1 kb Leiter.

Die Elektrophorese erfolgte in einer Kammer, die zuvor mit einem Gemisch aus TBE-Puffer und Ethidiumbromid (0,5 μ g/ml) befüllt worden war. Bei einer konstanten Spannung von 120 V variierten die Auftrennungszeiten bedingt durch Unterschiede in den betrachteten Fragmentlängen im Bereich von 50 - 80 Minuten. Unter Zuhilfenahme des Fluor-STM MultiImagers und der Software Quantity One[®] S konnten die DNA-Banden bei einer Wellenlänge von 302 nm des applizierten UV-Lichts sichtbar gemacht und ausgewertet werden.



Abb. 3 Gelbild einer Multiplex-Gradienten-PCR. Es wurden fünf Annealing-Temperaturen mit Q-Solution (rechts) und vier ohne (links) gewählt. Die Temperaturen sind im unteren Teil der Abbildung angegeben. Der Längenstandard (LS) befand sich in der linken äußeren Spur und ist mit der jeweiligen Größe in Basenpaaren (bp) gekennzeichnet. In aufsteigender Fragmentlänge sind am rechten Bildrand die 13 erwarteten PCR-Banden gezeigt. Das Gelfoto entstand im Rahmen der Etablierung der Multiplex-PCR zur Genotypisierung des *CDA*-Gens. Optimale Reaktionsbedingungen (markiert mit "*") fanden sich bei 66,6°C, ohne die Verwendung von Q-Solution.

Die Methode der Primerextension (SNaPshot[™]) bietet die Möglichkeit, mehrere genetische Polymorphismen (engl. single nucleotid polymorphismen, SNPs) in einer Reaktion zu bestimmen. Insgesamt 109 SNPs der elf Kandidatengene (CDA, CMPK1, DCK, DCTD, ENT1, NT5C3, PTCH1, RRM1, RRM2, SHH und SMO) wurden im Rahmen dieser Arbeit an 142 Patientenproben mittels SNaPshotTM-Methode bestimmt. Weitere 153 Proben vorangegangener Probandenstudien Abteilung Klinische Pharmakologie der der Universitätsmedizin Göttingen (Preuß 2009; Kuschel 2011) kamen hinzu.

Das Prinzip der Primerextension beruht darauf, dass zunächst der Genombereich, der den gesuchten Polymorphismus flankiert, durch PCR amplifiziert wird. Das PCR-Produkt wird danach durch Zugabe der Restriktionsenzyme Exonuklease 1 (Exo1) und SAP (*shrimp alkalic phosphatase*) enzymatisch aufgereinigt. Exo1 baut einzelsträngige Primer-DNA ab und verhindert so deren spätere Extension. SAP dephosphoryliert ihrerseits alle nicht gebundenen dNTPs am 5'-Ende, die damit in folgenden Reaktionsschritten nicht mehr als Substrate für weitere Kettenverlängerungen zur Verfügung stehen. Für die Aufreinigung wurden je Probe 5 µl-Aliquots eines Verdau-Mixes (1 µl SAP-Puffer (10x), 2,82 µl Exo1 und 1,18 µl SAP) auf eine 384-Well-Platte vorgelegt und mit je 10 µl PCR-Produkt versetzt. Dieser Ansatz kam für 3 h bei 37°C zur Inkubation. Die Enzyme wurden danach bei 80°C für 15 min inaktiviert.

Darauf folgte die eigentliche SNaPshotTM-Reaktion. Hierbei findet eine Einzelbasenverlängerung am 3'-Ende eines direkt neben der polymorphen Stelle bindenden spezifischen Primers statt. Am 3'-Ende des Primers lagern sich farbmarkierte Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) an. Im Gegensatz zu den Desoxribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) der klassischen PCR fehlt ddNTPs eine Hydroxylgruppe an ihrem 3'-Ende. Ein strangverlängernder Einbau weiterer Nukleotidbausteine über das ddNTP hinaus ist somit unmöglich. Die Anlagerung jeweils eines ddNTPs, komplementär zum vorliegenden Allel des Polymorphismus, wird gewährleistet. Die Markierung der ddNTPs mit Fluoreszenzfarbstoff (FS) richtet sich dabei nach der jeweiligen Base: Adenin, grün (FS: dR6G); Thymin, rot (FS: dROXTM); Cytosin, schwarz (FS: dTAMRATM) und Guanin, blau (FS: dR110). Über diese farbliche Markierung kann das vorliegende Allel bei der späteren Auswertung im Elektropherogramm bestimmt werden. Die vorbekannte Länge (Anzahl an Nukleotidbausteinen) der Primer ermöglicht es, mehrere polymorphe Stellen in einer Reaktion nachzuweisen, wenn die zu extendierenden Primer hierdurch mittels Kapillarelektrophorese getrennt werden können. Die für diese Arbeit verwendeten SNaPshotTM-Primer sind mit ihren Sequenzen und in ihrer Zugehörigkeit zu einem der neun Primer-Pools in Tab. 1 (Kapitel 2.3) aufgelistet. Es wurden diejenigen Primer in einem Pool zusammengefasst, die gemeinsam in einem Elektropherogramm analysiert werden sollten. Die Konzentration der Primer innnerhalb der Pools variierte zwischen 2 und 15 μ M und wurde jeweils der Signalstärke angepasst.

Der Reaktionsansatz der SNaPshot[™]-Reaktion beinhaltete den SNaPshot[™]-Mastermix (ABI PRISM SNaPshot[™]-Multiplex-Kit), einen gepoolten Primermix (10-fach konzentriert) und ddH₂O (siehe Tab. 5). Für jede Probe wurden 3 µl des Ansatzes auf eine 384-Well-Platte ausgebracht. Waren 2 µl PCR-Produkt je Well hinzugegeben, erfolgte die SNaPshot[™]-Reaktion gemäß der Angaben des Herstellers in einem 384-Well-Thermocycler. Die Reaktionsbedingungen sind in Tab. 5 veranschaulicht.

Reaktionsansatz	μl	Reaktionsbedingungen			
SNaPshot [™] -Mastermix	0,5	Phase	Temperatur	Zeit	
Primermix	0,5	Denaturierung	96 °C	10 s	
ddH ₂ O	2,0	Annealing	50 °C	5 s	26 Zyklen
aufgereinigtes PCR- Produkt	2,0	Elongation	60 °C	30 s	

Tab. 5 Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für SNaPshot[™]-PCR.

Zur Eliminierung überschüssiger ddNTPs, die bei der späteren Analyse im Sequenzierer durch Bildung von Nebenprodukten zu erheblichen Störsignalen führen könnten, wurde der Reaktionsansatz im Anschluss wiederum mit SAP versetzt. Hierzu wurde je Probe 1 µl einer 1:1-Mischung aus SAP-Puffer (10x) und SAP (1 U/µl) zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Auf die Hitzeinaktivierung des Enzyms konnte verzichtet werden, war die Weiternutzung der Proben am gleichen Tag gewährleistet.

Für die anschließende Auftrennung der markierten Primer im Sequenzierer wurde pro Probe 10 µl einer 1:100-Mischung aus Gene-Scan-120-Längenstandard und HIDI-Formamid auf eine 96-Well-Sequenzierplatte vorgelegt. Anschließend wurde 1 µl des aufgereinigten SNaPshot[™]-PCR-Produkts hinzugegeben und der Ansatz gut durchmischt. Schließlich erfolgte die Denaturierung der extendierten Primer durch Erhitzung des Reaktionsansatzes auf 95°C für 10 min im 96-Well-Thermocycler. Die Renaturierung der Primer sollte durch die Zugabe von Formamid vermieden werden. Zusätzlich wurden die Proben sofort nach Beendigung der Inkubationszeit auf Eis überführt. Einer 10-minütigen Abkühlung folgte das Einfügen der 96-Well-Platte in einen Sequenzierplattenträger. Die so stabilisierte Platte konnte in den Sequenzierer verbracht und mittels GeneScan Analysis Software (Version 3.5.1) analysiert werden. Ein Beispiel für ein Elektropherogramm ist in Abb. 4 illustriert.



Abb. 4 SNaPshotTM-Elektropherogramm für zehn Polymorphismen des *ENT1*-Gens. Zu allen Polymorphismen sind rs-Nummer und Basenaustausch unterhalb der Abbildung aufgeführt. Die Genotypenkonfiguration der gezeigten Probe ist oberhalb des jeweiligen Signalpeaks angegeben. Hinsichtlich der Peakfarbe entspricht blau - Guanin (G), schwarz - Cytosin (C), grün - Adenin (A) und rot - Thymin (T). Homozygote Allelausprägung besteht bei singulärem Signalpeak, Heterozygotie bei zwei zusammenhängenden Peaks unterschiedlicher Farbe. Der Längenstandard ist mit "*" gekennzeichnet.

3.2.6 Fragmentlängenanalyse zweier Insertionspolymorphismen

Für zwei Insertionspolymorphismen der Gene ENT1 und PTCH1 war es mittels SNaPshotTM-Methode nicht möglich gewesen, die jeweiligen Allelkonfigurationen exakt zu differenzieren. In diesen Fällen wurde jeweils eine Fragmentlängenanalyse durchgeführt. Bei dem ENTI-SNP rs11274220, lokalisiert auf Intron 1, handelt es sich um eine 20 Basenpaar-messende Insertionsvariante (Del > Ins 20bp). Der PTCH1-SNP rs71366293 ist seinerseits ein drei Basenpaar messender Insertionspolymorphismus und befindet sich im 5'UTR-Bereich des Gens (Del > Ins CGG). Ausgangspunkt der Reaktion war die PCR-basierte Amplifizierung der DNA-Fragmente von Chromosom 6 (ENT1) bzw. 9 (PTCH1), welche die Insertionen flankierten. Die Etablierung von optimalen Reaktionsbedingungen erfolgte mit je einer Gradienten-PCR analog zum Vorgehen bei der PCR (siehe Kapitel 3.2.3). Auch Reaktionsbedingungen und Reaktionsansatz entsprachen dem der Einzel-PCR (siehe Tab. 2 und Tab. 4 in Kapitel 3.2.3). Entscheidender Unterschied zur Einzel-PCR-Reaktion war, dass der Vorwärtsprimer an seinem 5'-Ende mit einer Fluoreszenz-Markierung (6Carboxyfluorescein/FAM) versehen wurde. Damit sollte in der späteren Auswertung die Unterscheidung der jeweiligen Allelkonfigurationen gewährleistet sein. Zur Vorbereitung des PCR-Produkts auf die folgende Kapillarelektrophorese im Sequenziergerät wurde eine 1:200-Verdünnung des ROX-400HD-Längenstandards in Formamid (HIDI) hergestellt und je Probe 10 µl des Ansatzes auf eine 96-Well-Sequenzierplatte vorgelegt. Dieser Ansatz wurde dann mit 1 µl des PCR-Produkts versetzt. Das Ganze kam zur Denaturierung für 5 min bei 95°C in den Thermocycler, um im Anschluss direkt für 10 min auf Eis überführt zu werden. Danach wurde die Platte mit einem Rahmen fixiert und zur Kapillarelektrophorese in den Sequenzierer verbracht. Die Auswertung erfolgte mit der Software GeneScan Analysis (Version 3.5.1).

3.3 Statistik

Zur Auswertung der erhobenen Daten wurden deskriptive und analytische statistische Verfahren verwandt.

Deskriptive Statistik

Die deskriptive Statistik ermöglicht die ordnende und zusammenfassende Darstellung von Messdaten. Anhand grafischer Umsetzung und tabellarischer Auflistung sowie der Berechnung ihrer zentralen Tendenz (Lagemaß) und Streuung lassen sich Daten bezüglich ihrer Verteilung charakterisieren. Verteilungen, welche durch einen mathematischen Parameter dargestellt werden können, werden als parametrisch bezeichnet; zumeist sind das normal verteilte Datensätze. Nicht-parametrische Verteilungen hingegen erfüllen diese Vorgabe nicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Histogramme zur Verdeutlichung von bibzw. multimodalen Häufigkeitsverteilungen genutzt. Zur Zusammenfassung des Lage- bzw. Streuungsmaßes eines Messparameters dienten Boxplots als nicht-parametrische Darstellungsform. Mit Kaplan-Meier-Plots wurden Überlebensraten in Abhängigkeit von genetischen und nicht-genetischen Faktoren veranschaulicht.

Analytische Statistik

Die Testverfahren der analytischen Statistik vergleichen zwei oder mehrere Datensätze bezüglich signifikanter Unterschiede. Die Auswahl des adäquaten Tests richtet sich nach der Art der Daten. In meiner Arbeit standen Überlebenszeitanalysen in Abhängigkeit zumeist kategorieller Faktoren (Genotypen, Resektionsstatus, Grading, Alter, Geschlecht) im Vordergrund. Hierfür wurde – bei Betrachtung eines singulären Faktors – der Log-rank-Test verwendet. Dabei wurde bei den Genotypen auch ein Alleldosis-abhängiger Effekt berücksichtigt. Mit dem *Cox-proportional-hazard*-Modell wurde für jede Genvariante das

über die Zeit konstante Sterberisiko der heterozygoten und – wenn möglich – der homozygoten Variantenallel-Konfiguration bestimmt. Mit einem Cox-Regressionsmodell wurde der Einfluss mehrerer Faktoren als unanhängige Variablen analysiert.

Für die kontinuierlichen Variablen der Hämatotoxizität orientierte sich die Auswahl des statistischen Testverfahrens daran, ob es sich um verbundene (abhängige) oder unverbundene (unabhängige) Stichproben handelt und welcher Verteilungstyp (normal oder nicht-normal) vorlag. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Ausprägung des Nadirs und der Zeitdauer bis dessen Eintreten wurde mit dem nicht-parametrischen zu Spearman-Rangkorrelationskoeffizient (unverbundene Variablen) durchgeführt; dieser Test fand Anwendung auch bei der Prüfung eines möglichen Einflusses der Hämatotoxizitätsparameter auf das Gesamtüberleben. Für Entwicklung der Leukozyten und Thrombozyten innerhalb der ersten sieben Tage der Therapie wurde jeweils der paarweise Wilcoxon-Rangsummentest für verbundene Stichproben angewandt. Eine Abhängigkeit der Hämatotoxizität von den untersuchten Genvarianten wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bei zwei bzw. dem Jonkheere-Terpstra-Test bei drei Genotyp-Konfigurationen geprüft. Letzterer berücksichtigt auch die so genannte Alleldosis, d.h. ob das Variantenallel einmal (heterozygot) oder zweimal vorlag. Hier liegt die Annahme zu Grunde, dass ein relevanter Effekt einer Genvariante bei homozygotem Variantenallel-Status mindestens so stark sein sollte wie bei heterozygoter Ausprägung.

Als nominal statistisch signifikant galten Analyseergebnisse mit einem *P*-Wert < 0,05. Multiples Testen wurde berrücksichtigt. Sämtliche Analysen und Berechnungen erfolgten mit der SPSS-Software (Version 12.0), ausgenommen das *Cox-proportional-hazard*-Modell und die Berechung der *False Discovery Rate*, welche mit dem Statistik-Paket R durchgeführt wurden (R Version 2.13.1).

3.4 Bioinformatik

Das humane Keimbahn-Genom birgt nach Schätzungen ca. zehn Millionen genetische Varianten. Die meisten dieser Varianten (> 90%) sind Einzelbasen-Austausche (engl. single nucleotid polymorphisms, SNPs). Diese sind durch eine Mindestfrequenz des selteneren Allels von > 1% in der Normalbevölkerung definiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe des Kandidatengen-Ansatzes die Bedeutung von SNPs für das Therapieansprechen von Gemcitabin bei Pankreaskarzinom untersucht werden.

Auswahl der Kandidatengene

Als Kandidaten wurden Gene ausgewählt, für die auf Grund von Literaturdaten und funktionellen Überlegungen ein Zusammenhang mit der Wirksamkeit von Gemcitabin belegt oder sehr wahrscheinlich ist. Dies schloss Gene für Metabolismus und Transport von Gemcitabin sowie den Hedgehog-Signalweg ein; letzterer hat – wie in der Einleitung (Kapitel 1.7) dargelegt – Einfluss darauf, ob Gemcitabin durch das umgebende Stroma an die Tumorzellen gelangt. Insgesamt wurden elf Gene ausgewählt, in denen zusammen 109 Polymorphismen bestimmt wurden. Die elf Kandidatengene mit der Anzahl der jeweils untersuchten Varianten sind in Tab. 6 aufgelistet.

Gen	Anzahl der Genvarianten (SNPs)
Gemcitabin-Metabolismus	
CDA	18
CMPK1	7
DCK	5
DCTD	14
NT5C3	8
RRM1	11
RRM2	5
Gemcitabin-Transport	
ENT1	18
Hedegehog-Signalweg	
PTCH1	10
SHH	7
SMO	6
Gesamt	109

Tab. 6 Kandidatengene mit Anzahl untersuchter Genvarianten (SNPs).

Analysierte Genvarianten

Für die Auswahl der 109 Polymorphismen zur umfassenden Darstellung der Variabilität in den elf genannten Genen kamen folgende Kriterien zur Anwendung:

1. Alle Varianten mit einer in der Literatur beschriebenen funktionellen Bedeutung mit einer Frequenz des selteneren Allels (MAF) $\geq 2\%$, 2. alle kodierenden Varianten mit einer MAF \geq 5%, 3. alle übrigen Genvarianten aus der HapMap-Datenbank für die kaukasische Bevölkerung mit einer MAF $\geq 5\%$, welche zur vollständigen Repräsentation der genetischen Variabilität des betreffenden Gens ± 5 kb auf Grund der Analyse des *Linkage disequilibrium* (LD) nötig waren. Das sogenannte LD beschreibt das Kopplungsungleichgewicht, in dem zwei Genpolymorphismen zueinander stehen. Je höher dieses ist, desto weniger unabhängig sind zwei genetische Varianten. Für meine Studie wurde eine Stringenz von r² = 0,8 festgelegt. Hatten zwei Varianten zueinander ein LD von $r^2 > 0,8$, war nur eine der beiden zu genotypisieren, da diese den Informationsgehalt der anderen hinreichend abdeckte. Diejenigen Genvarianten, die unter diesem Kriterium zur Repräsentation der Variabilität eines betreffenden Gens erforderlich waren, werden als *tagging* SNPs bezeichnet. Die visuelle Darstellung des LD und die Berechnung der *tagging* SNPs erfolgten mit der Software HaploView.

Die zur Genotypisierung erforderlichen Primer für PCR- und SNaPshot[™]-Reaktionen wurden unter Verwendung der Software OLIGO ausgewählt.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob vererbte Polymorphismen in den Genen des Gemcitabin-Transports, des Gemcitabin-Metabolismus und des Hedgehog-Signalwegs den Therapieerfolg von Gemcitabin bei Patienten mit Pankreaskarzinom beeinflussen. Dazu waren die Überlebenszeiten, gerechnet vom Beginn der Therapie mit Gemcitabin, zu ermitteln. Zunächst wurden allgemeine Parameter wie Alter und Geschlecht der Patienten, Resektionsstatus und histopathologisches Grading im Hinblick auf eine Beeinflussung des Überlebens untersucht; anschließend dann in einer explorativen Weise insgesamt 109 Genpolymorphismen in den oben genannten Gruppen an Kandidatengenen. Diese Genvarianten wurden auch in Bezug zu den erhobenen Hämatotoxizitätsparametern Leuko-und Thrombozytopenie während der Chemotherapie gesetzt. In dieser Reihenfolge sind die nachfolgenden Abschnitte gegliedert.

4.1 Patientenkohorte mit Verteilung der Überlebenszeiten

Zunächst war es meine Aufgabe, aus dem ursprünglichen Pool von 552 mit Verdacht auf einen malignen Pankreas-Prozess behandelten Patienten eine nach Tumorentität und Behandlung möglichst homogene Kohorte zu ermitteln. Dazu habe ich eine sorgfältige Überprüfung des histopathologischen Befundes und der durchgeführten Chemotherapie vorgenommen. Die methodischen Details sind in Kapitel 3.1 (S. 23) beschrieben. Infrage kamen nur Patienten mit einem histologisch gesicherten duktalen Adenokarzinom des Pankreas. Aufgrund der *per se* besseren Prognose von Patienten mit histopathologischem Tumorgrading G1 wurden diese Fälle von den Betrachtungen ausgeschlossen. Darüber hinaus nicht weiter berücksichtigt werden konnten Patienten, die postoperativ keine Gemcitabin-Therapie erhalten hatten sowie Patienten, für die eine Erhebung von Daten zur Nachsorge unmöglich war. Schließlich resultierte eine Gruppe von 142 Patienten, die bezüglich der Hauptzielgröße Überlebenszeit ausgewertet wurde (siehe Flussdiagramm in Abb. 5). Die Nebenzielgröße Hämatotoxizität ist im Abschnitt 4.5 beschrieben.



Abb. 5 Flussdiagramm zur Auswahl der Patientenkohorte. Hinsichtlich histologischer Kriterien wurden ausgeschlossen: Benigne Prozesse des Pankreas (z.B. chronische Pankreatitis, zystische Prozesse), abweichende Tumorentität (z.B. Adenome des Pankreas, Neuroendokrine Tumore), abweichende Tumorlokalisation (z.B. Papilla Vateri des Duodenum) und Pankreaskarzinome mit einem niedrigen, d.h. weitgehend differenzierten Grading von G1.

Die basalen Charakteristika zu den 142 Patienten sind in Tab. 7 zusammengestellt. Innerhalb der Patientenkohorte waren Frauen und Männer zu gleichen Teilen repräsentiert. Das Alter bei Beginn der Gemcitabin-Therapie betrug im Median 68 Jahre. Bei 99 Patienten war im Vorfeld der Chemotherapie eine Resektion des Tumors möglich. Von diesen entfielen jeweils etwa die Hälfte auf R0- und R1-Resektionsstatus.

Im Rahmen des Tumorstaging zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war anhand der TNM-Klassifikation jeder Tumor hinsichtlich Ausbreitung (T-Stadium), Lymphknotenbefall (N-Stadium) und Metastasierung (M-Stadium) eingestuft worden. Die Klassifikation erfolgte nach der für Pankreaskarzinome üblichen Einteilung. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war bei der Mehrheit der Patienten der Tumor bereits über die Organgrenzen hinaus gewachsen (T3 + T4, n = 129 von 138 klassifizierten) und hatte lymphogen gestreut (N > 0, n = 107 von 128). Eine Fernmetastasierung war im Rahmen des Primärstagings bereits in 46 Fällen (von 73) sicher nachweisbar. Der Primärtumor war wie folgt lokalisiert: nur Pankreaskopf (n = 108), nur -korpus (n = 14), nur -schwanz (n = 11). In neun Fällen fand sich eine über zwei der drei anatomischen Regionen erstreckende Lokalisation. Bezüglich des histopathologischen Gradings musste als Einschlusskriterium mindestens ein G2-Anteil vorhanden sein. Die größte Gruppe bildeten hier die als ausschließlich G2 klassifizierten Tumore. Die meisten Patienten (n = 90) erhielten Gemcitabin als Monotherapie. Die mediane Gesamtdauer der Gemcitabin-Therapie betrug 5,5 Monate. Die mediane Gesamtüberlebenszeit nach Therapiebeginn belief sich auf elf Monate. Der Beobachtungszeitraum der einzelnen Patienten lag im Median bei 41 und betrug im Maximum 127 Monate.

Geschlecht [Zahl der Patienten] Weiblich 68 Männlich 74 Alter bei Beginn der Gemcitabin-Therapie [Jahre] 68 Median 61 - 73 Interguartilabstand Bereich 44 - 88 **Resektionsstatus** 99 Reseziert **R**0 45 R1 52 R2 2 nicht reseziert (RN) 43 Histopathologisches Grading¹ G1-G2 7 G2 94 G2-G3 13 G3 27 Art der Gemcitabin-Therapie [Zahl der Patienten] Gemcitabin-Monotherapie 90 52 Gemcitabin-Kombinationstherapie² Gesamtdauer der Gemcitabin-Therapie [Monate]³ Median 5,5 Interguartilabstand 3,3 - 8,8 Bereich 1 - 49 Überlebenszeit von Beginn der Gemcitabin-Therapie an [Monate] Median 10.9 Interguartilabstand 6,0 - 17,0 1 - 114,0 **Bereich** Nachbeobachtungszeit von Beginn der Gemcitabin-Therapie an [Monate] Median 41 Interguartilabstand 23 - 64 2 - 127 Bereich

Tab. 7 Charakteristika auswertbarer Patienten bezüglich Gemcitabin-Therapie. ¹Einer Probe konnte kein Grading zugeordnet werden. ²Als Kombinationspräparat erhielten 23 Patienten Sorafenib, 13 Erlotinib, elf Patienten 5-Fluorouracil bzw. Capecitabin und fünf Platinverbindungen (Oxali-/Cisplatin). ³Die Gesamtdauer der Gemcitabin-Therapie bezieht sich auf den Zeitraum von der ersten bis zur letztmaligen Gabe von Gemcitabin, gleich ob als Mono- oder Kombinationstherapie verabreicht.

4.2 Nicht-genetische Einflussfaktoren

Im Folgenden sollte geprüft werden, inwiefern nicht genetische Faktoren wie Geschlecht, Alter, Resektionsstatus, histopathologisches Tumorgrading, Art der Gemcitabin-Chemotherapie und Hämatotoxizitätsparameter Auswirkungen auf das Gesamtüberleben der 142 Pankreaskarzinompatienten hatten.

4.2.1 Basisdaten der Patienten

Als Basisdaten der Patienten wurden Geschlecht und Alter bei Therapiebeginn der Patienten hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf das Gesamtüberleben untersucht.

Eine Abhängigkeit des Gesamtüberlebens vom Geschlecht der Patienten ließ sich nicht nachweisen. Unter Log-rank-Testung zeigte sich mit P = 0,4 keine statistische Signifikanz. Eine nicht-parametrische Korrelationsanalyse ergab auch keine Abhängigkeit vom Alter der Patienten (rho = -0,06, bei P = 0,8).

4.2.2 Resektionsstatus

Eine nach Diagnosestellung zeitnah durchgeführte Resektion des Primarius bringt, wie in der Literatur beschrieben (Wagner et al. 2004), im Gegensatz zu abwartendem Verhalten und/oder alleiniger Chemotherapie einen nachweisbaren Überlebensvorteil mit sich.

Innerhalb meiner untersuchten Kohorte mit 142 Patienten konnte diese Annahme bestätigt werden (siehe Abb. 6). Die histopathologischen Diagnosen zum Resektionsstatus wurden von der kooperierenden Abteilung Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. Ein Überlebensvorteil war hier insbesondere für resezierte Patienten im Vergleich zu den nicht-resezierten Patienten nachweisbar. Auch innerhalb der Gruppe der resezierten Patienten zeigten sich, mit der Güte der Resektion korrelierend, Unterschiede im Gesamtüberleben. Mit der Güte der Resektion besserte sich auch die Prognose.

Die statistische Testung dieser Befunde wurde mit dem Log-rank-Test durchgeführt. Der Einfluss des Resektionsstatus auf das Gesamtüberleben war unter Berücksichtigung aller in Abb. 6 genannten Ausprägungen mit P = 0,0002 hoch signifikant. Wurden zwei Gruppen (reseziert *versus* nicht-reseziert) gebildet, ergab sich nach Log-rank-Test ein *P*-Wert von 0,001. Auch zwischen R0- und R1-resezierten Patienten war eine Tendenz zu Gunsten von R0 erkennbar, jedoch wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Aufgrund der deutlichen Auswirkungen des Resektionsstatus auf das Gesamtüberleben wurden für die Testung des

Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von Genvarianten (siehe Kapitel 4.4) nur R0- und R1resezierte Patienten berücksichtigt (n = 97).



Kaplan-Meier-Kurve Abb. 6 zur Überlebenszeit in Abhängigkeit vom **Resektionsstatus.** sind Es für vier Resektionsgrade die Uberlebenskurven von Beginn der Gemcitabin-Therapie dargestellt. Unterhalb des Graphen sind für Zeitpunkte im 10-Monats-Intervall die Anzahl der verbliebenen Patienten unter Beobachtung aufgelistet. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem Log-rank-Test, wobei ein linearer Trend zwischen Resektionsgraden den R0 (Absetzungsränder mikroskopisch tumorfrei), **R1** (Absetzungsränder mikroskopisch nicht. aber makroskopisch tumorfrei), **R**2 (Absetzungsränder makroskopisch nicht tumorfrei) sowie RN (=nicht reseziert) angenommen wurde. Der Befund zeigte sich mit P = 0,0002 deutlich statistisch signifikant.

4.2.3 Histopathologisches Grading

Mittels der G-Klassifizierung wird histopathologisch die Differenzierung der Tumorzellen beschrieben. Gut differenzierte Tumore haben in der Regel eine bessere Prognose als weniger differenzierte. Unterschieden werden G1-Tumore (gut differenziert), G2-Tumore (mäßig G3-Tumore (schlecht differenziert) differenziert), und G4-Tumore (undifferenziert/anaplastisch). In der vorliegenden Arbeit wurden die wenigen Patienten (n = 5) mit G1-Tumoren aufgrund der *per se* weitaus besseren Prognose von vornherein aus den Betrachtungen ausgeschlossen und waren nicht in dem 142 Personen umfassenden Kollektiv enthalten. Eingeschlossen wurden alle Tumore, in denen sich mindestens Anteile eines G2-Status fanden, somit die Grade G1-2, G2, G2-3 und G3. G4-Tumore waren innerhalb des Studienkollektivs nicht zu verzeichnen. Die Diagnosen wurden in der kooperierenden Abteilung der Pathologie des Universitätsklinikum Göttingen gestellt und standen dieser Arbeit zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob zwischen Gesamtüberleben und dem beschriebenen, histopathologischen Grading ein Zusammenhang besteht. Dies ist in Abb. 7 in einer Kaplan-Meier-Grafik dargestellt. Das Grading wirkte sich gemäß der Reihenfolge seiner

Einteilung auf das Überleben der Patienten aus: Patienten mit gut bis mäßig differenzierten Tumoren (G1-2) hatten einen deutlichen Überlebensvorteil im Vergleich zu den übrigen; eine statistische Signifikanz wurde hier aber nicht erreicht (P = 0,2 nach Log-rank-Test). G2differenzierte Tumore wiesen eine etwas bessere Prognose als solche mit G3 auf (P = 0,02). Das Grading (linearer Trend zwischen den vier betrachteten Stufen) hatte einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate (P = 0,002 nach Log-rank-Test). In der Untergruppe der R0-R1-Resezierten wies das Grading weiterhin eine statistische Signifikanz in Bezug zum Gesamtüberleben auf (P = 0,001).



Abb. 7 Überlebenskurven in Abhängigkeit vom histopathologischen Grading. Es sind für die Differenzierungsgrade G1-2, G2, G2-3 und G3 die Überlebensraten nach Beginn der Gemcitabin-Therapie dargestellt. Die jeweiligen Anzahlen der Patienten unter Beobachtung sind in **10-Monats-**Abständen unterhalb des Graphen aufgeführt. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem Log-rank-Test. Dabei wurde ein linearer Trend innerhalb der unabhängigen Variablen "Grading" angenommen. Der zeigte sich Befund mit P = 0.002statistisch signifikant. In einem Fall konnte kein Grading-Status zugeordnet werden.

4.2.4 Gemcitabin als Mono- oder Kombinationstherapie

Die Mehrzahl der in dieser Arbeit untersuchten 142 Patienten war mit Gemcitabin als Monotherapie behandelt worden (n = 90). Eine Kombinationstherapie erhielten 52 Patienten. Die häufigsten Kombinationspartner waren Tyrosinkinaseinhibitoren wie Erlotinib oder Sorafenib. Als weitere Kombinationspräparate wurden 5-Fluorouracil bzw. Capecitabin und Platinverbindungen (Oxaliplatin, Cisplatin) eingesetzt. In Abb. 8 ist das Gesamtüberleben der Studienpatienten in Abhängigkeit des Therapieregimes (Mono- *versus* Kombinationstherapie) in einer Kaplan-Meier-Grafik dargestellt, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte (P = 0,2 nach Log-rank-Test). Es wurde weiterhin geprüft, ob eine Korrelation zwischen der Dauer der Gemcitabin-Therapie und dem Überleben vorlag. Hier ergab sich unter non-parametrischer Testung mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten ein statistisch signifikanter Einfluss auf das Überleben mit rho = 0,64 (P = 0,01). Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da etliche Patienten noch vor Beendigung der vorgesehenen Chemotherapiezyklen verstarben. Neben dem Versterben unter Therapie war für die Beendigung der Therapie zumeist eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit Tumorprogress oder Metastasierung verantwortlich. Nicht selten wurde auch dem Patientenwunsch auf Therapieabbruch entsprochen.



Abb. 8 Überlebenskurven für Gemcitabin in Mono- und Kombinationstherapie. Darstellungsweise analog zu Abb. 6 und Abb. 7.

4.2.5 Tumorlokalisation und Staging

Für den Einfluss der Tumorlokalisation (Pankreas-kopf, -korpus und -schwanz) ließ sich kein Einfluss auf die Überlebenszeit (P = 0,4) feststellen. Ein höheres T-Stadium ging erwartungsgemäß mit einer schlechteren Prognose einher. Dieser Effekt war jedoch nur mäßig ausgeprägt (P = 0,05). Nodal-positive Patienten hatten tendenziell eine kürzere Überlebenszeit (P = 0,08), wobei der Unterschied sich erst nach etwa zwei Jahren bemerkbar machte. Dahingegen zeigte sich im Kaplan-Meier-Plot (nicht gezeigt) von Beginn an ein Vorteil für Patienten ohne Fernmetastasen (P = 0,03).

4.2.6 Hämatotoxizitätsparameter

Bei einer Zytostatikatherapie profitieren häufig diejenigen Patienten, die besonders schwere Nebenwirkungen erfahren. Es sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen Veränderungen im Blutbild während der Gemcitabin-Therapie und der Überlebenszeit der Patienten besteht. Von den 142 Patienten mit Daten zur Überlebenszeit konnten für 116 die Blutbildverläufe für Leukozyten und Thrombozyten innerhalb der ersten 42 Tage erfasst werden. Es wurde jeweils der Wert des Nadirs sowie die Zeitdauer bis zu dessen Eintreten bestimmt. Der Nadirwert wurde sowohl als Intervall-skalierte Variable, wie auch als diskrete entsprechend den CTC-Toxizitätsgraden bewertet. Diese Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTC) beschreiben den Grad der (Hämato-) Toxizität einer Therapie auf einer Skala von 1 (leicht) bis 4 (schwer). Weiterhin wurde die Gemcitabin-Intensität vor Nadir und die prozentuale Veränderung der Absolutwerte vom prätherapeutischen Ausgangswert bis zum Therapietag 7 betrachtet. Der Grund für die Erhebung des letztgenannten Parameters besteht darin, dass nach sieben Tagen die beste Vergleichbarkeit der in-vivo-Reaktion des Blutbildes besteht. Praktisch alle Patienten waren während der ersten Woche derselben Gemcitabin-Dosis unabhängig der Chemotherapie-Taktung exponiert. Die Verwendung des Nadirwertes würde außer Acht lassen, dass diesem inter-individuell unterschiedliche Gemcitabin-Dosen vorangegangen sind. Tab. 8 fasst die Beziehung zwischen diesen fünf Parametern und der Überlebenszeit zusammen.

Hämatotoxizitäts- parameter	Statistischer Test	Leukozyten	Thrombozyten
Absoluter Nadir	Spearman- Rangkorrelation	rho = -0,3; <i>P</i> = 0,8	rho = 0,02; <i>P</i> = 0,9;
Toxizitätsgrad (CTC)	Log-rank	<i>P</i> = 0,9	<i>P</i> = 0,7
Zeit bis Nadir	Spearman- Rangkorrelation	rho = 0,07; <i>P</i> = 0,5	rho = 0,19; <i>P</i> = 0,05
Intensität bei Nadir	Spearman- Rangkorrelation	rho = 0,07; <i>P</i> = 0,4	rho = 0,22; <i>P</i> = 0,02
% Blutzellen Therapietag 7 bezogen auf Tag 0	Spearman- Rangkorrelation	rho = 0,04; <i>P</i> = 0,7	rho = 0,03; <i>P</i> = 0,75

Tab. 8 Korrelation von Hämatotoxizitätsparametern und Gesamtüberleben. Betrachtet wurden 116 Patienten. Die mit dem Überleben in Beziehung gesetzten Hämatotoxizitätsparameter sind in der linken Spalte aufgelistet. Die Charakteristika der Werte entsprechen denen aus Kapitel 4.5. Für Intervallskalierte unabhängige Variablen wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient, für diskrete der Logrank-Test verwendet. Beziehungen mit einer nominalen statistischen Signifikanz (*P*-Wert < 0,05) sind fett gedruckt.

Zwischen den aufgeführten Hämatotoxizitätsparametern und dem Gesamtüberleben ließen sich für Leukozyten keinerlei Beziehungen darstellen. Beispielhaft ist in Abb. 9 die

Überlebenszeit in Abhängigkeit des Leukozyten-Nadirs – eingeteilt in Grade nach CTC – veranschaulicht. Hinsichtlich Thrombozyten war lediglich für die Zeit bis Nadir und Gemcitabin-Intensität bei Nadir ein leichter Bezug zum Gesamtüberleben erkennbar: Je länger die Zeit bzw. je größer die Gemcitabin-Intensität bis zum Thrombozyten-Nadir, desto länger war tendenziell das Überleben. Diese Befunde entsprechen nicht der eingangs formulierten Hypothese.



Abb. 9 Korrelation zwischen Überlebenszeit und Grad der Leukopenie Die unter Gemcitabin. Gradeinteilung der Leukopenie wurde entsprechend dem CTC-Score anhand des beobachteten Nadirwerts (innerhalb der ersten 42 Tage der Chemotherapie) vorgenommen. Die Darstellungsweise entspricht Abb. 6 und Abb. 7

4.3 Keimbahn-Varianten in Kandidatengenen für Gemcitabin

Wie oben dargelegt, zeigten sich der Resektionsstatus und das Grading als Prädiktoren für die Überlebenszeit, eine *Add-on-*Chemotherapie jedoch nicht. Weitere Marker, welche eine prognostische Aussage über den Therapieverlauf erlauben, wären klinisch sehr wertvoll, insbesondere wenn diese schon vor Beginn der Behandlung bestimmbar sind. Als solche kommen Keimbahn-Polymorphismen in Betracht. In dieser Arbeit wurde der Kandidatengen-Ansatz verfolgt. Die analysierten Genotypen wurden hinsichtlich eines Einflusses auf Wirkung (Gesamtüberleben) und Nebenwirkung (Hämatotoxizität) von Gemcitabin bei Pankreaskarzinom-Patienten untersucht.

Die Auswahl der Kandidatengene mit den untersuchten Polymorphismen ist im Methodenteil unter Kapitel 3.4 beschrieben. Einen Überblick der Ergebnisse der Genotypisierung zeigt Tab. 9. Über alle Polymorphismen gemittelt konnten 98% aller Genotypen bestimmt werden. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (*engl. Hardy-Weinberg equilibrium, HWE*), welches die Häufigkeit von erwarteten mit beobachteten Genotypen auf Basis der Allelfrequenzen vergleicht, war für alle SNPs mit einer Ausnahme erfüllt (P > 0,05 nach χ^2 -Test). Lediglich der Polymorphismus rs13148414 im *DCTD*-Gen wies hier einen *P*-Wert von 0,003 auf, was jedoch in Anbetracht der Anzahl der untersuchten Varianten (n = 109) akzeptabel erscheint. Als weiteres Kriterium für die Qualität der Genotypisierung wurden die Analysen in 14% der Proben wiederholt. Dabei fand sich keine Abweichung.

Gen ¹	SNP	Genetisches Element ²	Chromosomale Lokalisation ³	Basen- aus- tausch ⁴	^{′′} Wt/Wt ⁵ ₄ (%)	Wt/Var⁵ (%)	Var/Var⁵ (%)	MAF ⁶ (%)	Chi- Test ⁷ (HWE)
Gemci	tabin-Metabo	olismus							
CDA	rs540282	Promotor -3572	1:20911872	A>G	78,0	21,3	0,7	11,3	0,6
	rs532545	Promotor -272	1:20915172	C>T	46,1	43,7	10,2	32,0	1
	rs603412	Promotor -26	1:20915418	G>C	31,9	54,2	13,9	41,0	0,1
	rs602950	5'UTR	1:20915531	A>G	45,8	44,4	9.8	32,0	0,9
	rs2072671	Exon 1	1:20915701	T>G	45,6	46,3	8,1	31,3	0,4
	rs818202	Intron 1	1:20916791	C>T	34,1	51,7	14,2	40,0	0,4
	rs10916824	Intron 1	1:20918912	A>G	83,8	15,5	0,7	8,4	1
	rs577042	Intron 1	1:20928154	T>C	68,6	27,7	3,7	17,6	0,8
	rs818194	Intron 2	1:20931828	T>A	58,4	33,8	7,8	24,7	0,3
	rs10916827	Intron 2	1:20933341	G>A	36,2	46,6	17,2	40,5	0,9
	rs580032	Intron 2	1:20933893	A>C	88,7	10.3	1,0	6,2	0,2
	rs11579252	Intron 2	1:20934213	T>C	77,0	21,0	2,0	12,5	0,8
	rs527912	Intron 2	1:20934283	G>A	46,0	41,6	12,4	33,2	0,6
	rs1689924	Intron 2	1:20934796	T>C	23,1	46,8	30,2	46,4	0,6
	rs12404655	Intron 3	1:20943195	T>C	56,3	36,3	7,4	25,6	0,7
	rs12072405	Intron 3	1:20943281	A>G	64,7	31,9	3,4	19,3	0,9
	rs1048977	Exon 4	1:20945055	G>A	45,7	41,2	13,1	33,7	0,4
	rs1614627	Upstream +1355	1:20946756	C>A	82,7	15,9	1,4	9,3	0,6
CMPK	1 rs11211517	Promotor -1338	1: 47798131	C>T	29,7	48,6	21,7	46,0	0,9
	rs7543016	Exon 1	1: 47799639	C>G	27,5	47,5	25,0	48,8	0,7
	rs12132521	Intron 1	1: 47818324	G>A	51,4	39,9	8,7	28,7	0,9

Gen ¹	SNP	Genetisches Element ²	Chromosomale Lokalisation ³	Basen- aus- tausch ⁴	Wt/Wt⁵ (%)	Wt/Var⁵ (%)	Var/Var⁵ (%)	MAF ⁶ (%)	Chi- Test ⁷ (HWE)
	rs35687416	Exon 2	1: 47834209	G>T	85,3	14,0	0,7	7,7	1
	rs6660321	Intron 4	1: 47841627	T>G	71,0	26,9	2,1	15,6	0,9
	rs7534571	Upstream +2768	1: 47847279	A>G	79,4	20,3	0,3	10,5	0,4
	rs12039726	Upstream +5168	1: 47849679	G>A	71,0	26,9	2,1	15,6	0,9
DCK	rs6446982	Promotor -4122	4: 71855143	G>A	94,1	5,9	0	2,9	0,9
	rs2306744	5'UTR	4: 71859352	C>T	97,3	2,7	0	1,4	1
	rs12648166	Intron 2	4: 71873745	C>T	32,3	47,1	20,6	44,2	0,7
	rs10805074	Intron 2	4: 71874331	C>T	93,5	6,5	0	3,3	0,9
	rs11544786	Exon 3	4: 71888176	C>T	89,7	10,3	0	5,2	0,7
DCTD	rs5016499	Promotor -2268	4: 183840898	C>A	49,7	40,5	9,8	30,1	0,8
	rs13111117	Intron 3	4: 183825476	G>A	86,4	13,2	0,4	7.0	1
	rs10016530	Intron 3	4: 183824984	T>G	93,0	7,0	0	3,5	0,8
	rs10520543	Intron 3	4: 183822229	G>A	50,7	36,4	12,9	31,1	0,05
	rs13148414	Intron 3	4: 183817674	C>G	57,3	31,5	11,2	26,9	0,003
	rs6834019	Intron 3	4: 183817659	C>A	88,4	11,2	0,4	6,0	1
	rs4742	Exon 4	4: 183815688	T>C	49,0	38,5	12,5	31,8	0,2
	rs1960207	Intron 5	4: 183813366	G>A	80,4	18,2	1,4	10,5	0,9
	rs2515683	Intron 5	4: 183813147	G>A	36,0	45,8	18,2	41,1	0,7
	rs10017797	Intron 5	4: 183812883	C>A	85,3	14,3	0,4	7,5	0,9
	rs7278	3'UTR	4: 183811487	C>T	61,5	35,0	3,5	21,0	0,7
	rs3924787	upstream +4340	4: 183806904	A>G	31,1	48,3	20,6	44,8	0,9
	rs4073676	upstream +4679	4:183806565	A>T	88,8	10,9	0,4	6,8	1
	rs4073675	upstream +4832	4:183806412	C>T	73,3	24,9	1,8	14,2	0,9
NT5C3	rs6946062	Intron 1	7: 33083107	T>C	33,7	49,1	17,2	41,8	1
	rs7795860	Intron 1	7: 33082489	A>G	49,7	42,8	7,6	29,0	0,8
	rs7792135	Intron 1	7: 33082375	A>G	64,1	33,1	2,8	19,3	0,6
	rs12668520	Intron 1	7: 33075248	T>C	64,1	31,4	4,5	20,2	0,9
	rs17170218	Intron 1	7: 33074785	A>T	46,6	46,2	7,2	30,3	0,3
	rs3750117	Exon 5	7: 33060946	G>A	47,4	43,9	8,7	30,6	0,8

Gen ¹	SNP	Genetisches Element ²	Chromosomale Lokalisation ³	Basen- aus- tausch ⁴	Wt/Wt⁵ (%)	Wt/Var⁵ (%)	Var/Var⁵ (%)	MAF ⁶ (%)	Chi- Test ⁷ (HWE)
	rs17170153	Intron 5	7: 33060755	A>C	93,4	6,2	0,4	3,4	0,5
	rs4394301	upstream +4158	7: 33049584	A>G	26,8	50,2	23,0	48,1	1
RRM1	rs1561876	Promotor -2529	11: 4113395	A>G	77,3	21,3	1,4	12,0	1
	rs1465952	Promotor -1385	11: 4114539	A>G	85,6	14,4	0	7,2	0,4
	rs11030918	Promotor -437	11: 4115487	T>C	40,3	46,5	13,2	36,5	1
	rs12806698	5'UTR	11: 4115974	C>A	51,5	41,2	7,3	27,8	0,9
	rs10835613	Intron 2	11: 4124276	C>G	30,6	52,2	17,2	43,3	0,6
	rs7932702	Intron 2	11: 4124372	C>T	40,7	49,0	10,3	34,8	0,4
	rs10498198	Intron 2	11: 4124731	C>G	91,4	8,6	0	4,3	0,8
	rs183484	Exon 9	11: 4141132	T>G	25,1	52,9	22,0	48,5	0,6
	rs9937	Exon 19	11: 4159457	C>T	26,1	52,2	21,6	47,8	0,7
	rs1042858	Exon 19	11: 4159466	T>C	84,9	14,8	0,4	7,7	0,8
	rs1042919	3'UTR	11: 4159764	T>A	84,9	14,8	0,4	7,7	0,8
RRM2	rs7574663	Promotor -3368	2: 10259327	G>C	61,2	33,7	5,2	22,0	1
	rs1130609	Exon 1	2: 10262920	C>A	52,6	38,8	8,6	28,0	0,8
	rs6741290	Intron 4	2: 10264709	C>T	31,3	49,8	18,9	43,8	1
	rs4668664	Intron 7	2: 10268798	G>A	53,3	39,9	6,9	26,8	1
	rs1138729	3'UTR	2:10271196	A>G	69,4	26,8	3,8	17,2	0,6
Gemcit	abin-Transp	ort							
ENT1	rs9357436	Promotor -4522	6: 44182720	C>T	66,6	30,7	2,7	18,1	0,8
	rs2297393	Promotor -2523	6: 44184719	A>G	25,3	49,7	25,0	49,8	1
	rs3734701	Promotor -1988	6: 44185254	C>T	62,0	34,2	3,8	20,9	0,8
	rs1057985	Promotor -1341	6: 44185901	C>T	38,9	46,2	14,9	38,0	1
	rs66872347	5'UTR	6: 44187386:	G>A	85,4	14,6	0	7,3	0,5
	rs67057732	5'UTR	6: 44187403:	G>A	95,1	4,9	0	2,5	0,9
	rs6914414	Intron 1	6: 44188277	G>A	88,0	11,6	0,3	6,2	1
	rs9462977	Intron 1	6: 44188701	A>G	27,0	53,9	19,1	46,1	0,4
	rs11274220	Intron 1	6: 44191783	Del>Ins 20bp	62,7	33,6	3,7	20,5	0,9
	rs693955	Intron 1	6: 44191920	G>T	62,5	34,1	3,4	20,5	0,7

Gen ¹	SNP	Genetisches Element ²	Chromosomale Lokalisation ³	Basen- aus- tausch⁴	Wt/Wt⁵ (%)	Wt/Var⁵ (%)	Var/Var⁵ (%)	MAF ⁶ (%)	Chi- Test ⁷ (HWE)
	rs1886884	Intron 1	6: 44192158	T>C	29,8	53,3	16,9	43,6	0,4
	rs747199	Intron 1	6: 44194345	G>C	61,1	35,9	3,0	20,9	0,4
	rs9394992	Intron 2	6: 44195992	C>T	54,4	38,9	6,7	26,2	1
	rs324148	Intron 2	6: 44196578	G>A	51,9	40,3	7,8	28,0	1
	rs324149	Intron 2	6: 44196995	C>T	54,8	38,7	6,5	25,9	1
	rs45573936 =lle216Thr	Exon 7	6: 44198362	T>C	93,6	6,4	0	3,2	0,9
	rs1128930	Intron 11	6: 44200325	T>G	37,7	47,6	14,7	38,5	1
	rs760370	Intron 12	6: 44200953	A>G	33,6	48,3	18,1	42,3	1
Hedgeh	og-Signalwo	eg							
PTCH1	rs71366293	5'UTR	9: 98270669	Del>Ins CGG	57,2	37,0	5,8	24,3	1
	rs10512249	Intron 2	9: 98256309	C>T	80,1	18,4	1,5	10,6	0,9
	rs473902	Intron 2	9: 98256235	A>C	86,8	12,5	0,7	7,0	0,9
	rs574688	Intron 10	9: 98239190	G>C	53,5	37,3	9,2	27,8	0,7
	rs2066836	Exon 12	9: 98238358	C>T	58,7	35,0	6,3	23,8	0,9
	rs2236407	Intron 12	9: 98237796	A>G	37,8	47,6	14,7	38,5	1
	rs357564	Exon 23	9: 98209594	G>A	43,4	44,1	12,6	34,6	1
	rs357565	3'UTR	9: 98205443	G>T	56,9	37,2	5,9	24,5	1
	rs16909856	upstream +771	9: 98204493	C>T	82,4	16,2	1,4	9,5	0,8
	rs357563	upstream +1065	9: 98204199	C>T	42,6	46,8	10,6	34,0	0,9
SHH	rs288746	Promotor -1705	7: 155606672	T>C	71,8	26,8	1,4	14,8	0,8
	rs872723	Promotor -777	7: 155605744	C>T	67,4	29,1	3,5	18,1	1
	rs756884	Intron 1	7: 155604099	G>A	82,4	16,2	1,4	9,5	0,8
	rs9333596	Intron 1	7: 155603978	T>C	68,3	28,2	3,5	17,6	0,9
	rs1233556	Intron 1	7: 155600417	G>A	70,4	26,1	3,5	16,5	0,8
	rs1233571	upstream +1264	7: 155594294	G>A	71,3	25,2	3,5	16,1	0,7
	rs1233560	upstream +2120	7: 155593438	G>A	29,6	46,5	23,9	47,2	0,7
SMO	rs6962740	Promotor -1902	7: 128826811	C>G	57,1	36,4	6,5	24,6	1
	rs11762252	Intron 1	7: 128834345	C>G	88,7	11,3	0	5,6	0,8
	rs2718107	Intron 1	7: 128838659	T>G	31,2	44,2	24,6	46,7	0,4

Gen ¹	SNP	Genetisches Element ²	Chromosomale Lokalisation ³	Basen- aus- tausch ⁴	Wt/Wt⁵ (%)	Wt/Var⁵ (%)	Var/Var⁵ (%)	MAF ⁶ (%)	Chi- Test ⁷ (HWE)
	rs4731562	Intron 1	7: 128842573	C>T	40,9	43,1	16,1	37,6	0,6
	rs2566871	Intron 1	7: 128843169	C>T	28,6	45,7	25,7	48,6	0,6
	rs2228617	Exon 6	7: 128846328	G>C	68,3	28,2	3,5	17,6	0,9

Tab. 9 Charakteristika untersuchter Genpolymorphismen geordnet nach Genen. Die Analyse der 109 Polymorphismen erfolgte an 142 Proben von Patienten mit Pankreaskarzinom. Zusätzlich habe ich diese Genloci (mit Ausnahme des Hedgehog-Signalwegs) noch an 153 Probanden aus vorangegangenen Studien der Abteilung Klinische Pharmakologie mit isolierten Leukozyten (Preuß 2009; Kuschel 2011) typisiert. Die in der Tabelle genannten Häufigkeitsangaben beziehen sich auf die Gesamtzahl von 295 Proben. ¹Bei mehreren Transkriptvarianten des Gens beziehen sich die Angaben immer auf die längste Isoform (betrifft *CMPK1, DCTD, NT5C3, RRM2, ENT1* und *PTCH1*). ^{2,3}Für jeden Polymorphismus (SNP) sind die rs-Nummer (*reference snp number*) und die Angaben zur chromosomalen Lokalisation aus der Datenbank dbSNP (Version GRCh37.p2/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/) des NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) entnommen. Für in der Promotorregion bzw. *upstream* des Gens gelegenen Varianten sind die Abstände in Relation zum Transkriptionsstart- bzw. -endpunkt angegeben. ⁴Basenaustausch an der jeweiligen polymorphen Stelle. ⁵Häufigkeitsverteilung der beobachteten Genotypkonfigurationen (Wt/Wt = homozgot für Wildtyp-Allel; Wt/Var = Wildtyp- und Variantenallel, d.h. Heterozygotie; Var/Var = homozygot für Varianten-Allel). ⁶MAF = *minor allele frequency* (Frequenz des selteneren Allels). ⁷Chi-Quadrat-Test zur Abschätzung des Hardy-Weinberg-Equilibriums (HWE).

4.4 Genpolymorphismen und Gesamtüberleben

Die Analyse von Genpolymorphismen hinsichtlich ihrer Korrelation zum Gesamtüberleben wurde initial an einer Kohorte von insgesamt 142 Patienten durchgeführt. Aufgrund des maßgeblichen Einflusses des Resektionsstatus auf das Gesamtüberleben (siehe Kapitel 4.2.2) wurden für die spätere Auswertung ausschließlich Patienten mit Resektionstatus R0 und R1 berücksichtigt (n = 97). Die Tab. 10 gibt für jeden der 109 Polymorphismen als singuläre unabhängige Variable die mit dem *Cox-proportional-hazard*-Modell berechneten *Hazard Ratios* mit Konfidenzintervall sowie die *False Discovery Rate* (FDR) an. Die angeführten *Hazard Ratios* (HR) beschreiben in meinen Daten die über die Zeit konstante Sterbewahrscheinlichkeit einer Gruppe von Patienten im Vergleich zur Referenzgruppe, d.h. die Sterbewahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der jeweiligen Genotypenkonstellation. Ein HR von 1 bedeutet keinen Unterschied zwischen Variante und Wildtyp. Lag die HR > 1, so war das Risiko zu versterben für die betreffende Gruppe größer als beim Wildtyp hin.

4.4.1 Explorative Analyse mit 109 Kandidatengen-Varianten

Fett gedruckt in Tab. 10 sind die rs-Nummern derjenigen Varianten, die nach Log-rank-Test (linearer Trend entsprechend der Anzahl der Variantenallele angenommen) mit einem P-Wert < 0,05 mit der Überlebenszeit assoziiert waren. Dies war für zehn Genvarianten der Fall, welche in Tab. 11 aufgelistet sind.

Gen	SNP	Het <i>versus</i> Wt Var <i>versus</i> Wt	Hazard Ratio (95%-KI)	Р	FDR
Gemcit	abin-Metabolism	us			
CDA	rs540282	AG versus AA	1,07 (0,63-1,83)	0,8	0,9
		GG versus AA	2,21 (0,30-16,2)	0,4	0,8
	rs532545	CT versus CC	1,15 (0,71-1,87)	0,5	0,9
		TT versus CC	1,22 (0,54-2,75)	0,6	0,9
	rs603412	GC versus GG	1,24 (0,74-2,06)	0,4	0,8
		CC versus GG	1,38 (0,70-2,72)	0,3	0,8
	rs602950	AG versus AA	1,13 (0,70-1,82)	0,6	0,9
		GG versus AA	1,36 (0,60-3,07)	0,5	0,8
	rs2072671	TG versus TT	1,19 (0,74-1,91)	0,5	0,8
		GG versus TT	0,89 (0,35-2,29)	0,8	0,9
	rs818202	CT versus CC	0,74 (0,45-1,23)	0,3	0,7
		TT versus CC	1,06 (0,53-2,11)	0,9	0,9
	rs10916824	AG versus AA	0,76 (0,36-1,58)	0,5	0,8
		GG versus AA	1,44 (0,19-10,5)	0,7	0,9
	rs577042	TC versus TT	1,16 (0,71-1,90)	0,5	0,9
		CC versus TT	0,74 (0,29-1,92)	0,5	0,9
	rs818194	TA versus TT	1,32 (0,81-2,14)	0,3	0,7
		AA versus TT	1,31 (0,55-3,10)	0,5	0,9
	rs10916827	GA versus GG	0,99 (0,58-1,69)	1	1
		AA versus GG	1,19 (0,63-2,23)	0,6	0,9
	rs580032	AC versus AA	1,27 (0,66-2,45)	0,5	0,8
		CC versus AA	0,20 (0,02-1,54)	0,1	0,6

Gen	SNP	Het <i>versus</i> Wt Var <i>versus</i> Wt	Hazard Ratio (95%-KI)	Ρ	FDR
	rs11579252	TC versus TT	0,89 (0,52-1,52)	0,7	0,9
		CC versus TT	2,33 (0,56-9,69)	0,2	0,7
	rs527912	GA versus GG	0,92 (0,56-1,52)	0,8	0,9
		AA versus GG	0,84 (0,37-1,91)	0,7	0,9
	rs1689924	TC versus TT	0,95 (0,56-1,60)	0,9	0,9
		CC versus TT	0,89 (0,48-1,62)	0,7	0,9
	rs12404655	TC versus TT	1,14 (0,70-1,87)	0,6	0,9
		CC versus TT	0,60 (0,25-1,45)	0,3	0,7
	rs12072405	AG versus AA	1,06 (0,67-1,69)	0,8	0,9
		GG versus AA	0,73 (0,10-5,39)	0,8	0,9
	rs1048977	GA versus GG	1,28 (0,77-2,12)	0,3	0,8
		AA versus GG	1,09 (0,53-2,25)	0,8	0,9
	rs1614627	CA versus CC	0,80 (0,45-1,45)	0,5	0,8
		AA versus CC	0,19 (0,02-1,45)	0,1	0,6
CMPK1	rs11211517	CT versus CC	1,44 (0,81-2,56)	0,2	0,7
		TT versus CC	1,22 (0,62-2,43)	0,6	0,9
	rs7543016	CG versus CC	1,58 (0,85-2,95)	0,1	0,6
		GG versus CC	1,33 (0,67-2,64)	0,4	0,8
	rs12132521	GA versus GG	1,28 (0,78-2,07)	0,3	0,8
		AA versus GG	0,90 (0,37-2,19)	0,8	0,9
	rs35687416	GT versus GG	1,08 (0,51-2,26)	0,8	0,9
		TT versus GG	0,76 (0,10-5,52)	0,8	0,9
	rs6660321	TG versus TT	1,54 (0,93-2,55)	0,09	0,5
		GG versus TT	0,94 (0,12-6,89)	1	1
	rs7534571	AG versus AA	1,20 (0,71-2,03)	0,5	0,8
	rs12039726	GA versus GG	1,54 (0,93-2,55)	0,09	0,5
		AA versus GG	0,94 (0,12-6,89)	1	1
DCK	rs6446982	GA versus GG	0,95 (0,38-2,37)	0,9	1

Gen	SNP	Het <i>versus</i> Wt Var <i>versus</i> Wt	Hazard Ratio (95%-KI)	Р	FDR
	rs2306744	CT versus CC	0,49 (0,06-3,57)	0,5	0,8
	rs12648166	CT versus CC	1,19 (0,70-2,02)	0,5	0,8
		TT versus CC	1,12 (0,57-2,22)	0,7	0,9
	rs10805074	CT versus CC	1,03 (0,41-2,57)	0,9	1
	rs11544786	CT versus CC	0,55 (0,24-1,28)	0,2	0,6
DCTD	rs5016499	CA versus CC	2,19 (1,33-3,60)	0,002	0,2
		AA versus CC	1,04 (0,36-2,96)	0,9	1
	rs13111117	GA versus GG	1,47 (0,56-3,88)	0,4	0,8
	rs10016530	TG versus TT	0,58 (0,21-1,61)	0,3	0,8
	rs10520543	GA versus GG	1,28 (0,78-2,09)	0,3	0,8
		AA versus GG	1,47 (0,69-3,11)	0,3	0,8
	rs13148414	CG versus CC	2,01 (1,21-3,34)	0,006	0,2
		GG versus CC	1,59 (0,73-3,46)	0,2	0,7
	rs6834019	CA versus CC	0,64 (0,31-1,31)	0,2	0,7
	rs4742	TC versus TT	1,20 (0,73-1,96)	0,5	0,8
		CC versus TT	1,96 (0,92-4,15)	0,08	0,5
	rs1960207	GA versus GG	1,11 (0,60-2,04)	0,7	0,9
		AA versus GG	1,23 (0,29-5,06)	0,8	0,9
	rs2515683	GA versus GG	1,67 (0,99-2,81)	0,05	0,4
		AA versus GG	1,89 (0,94-3,81)	0,07	0,5
	rs10017797	CA versus CC	0,75 (0,40-1,40)	0,4	0,8
		AA versus CC	3,46 (0-Inf)	1	1
	rs7278	CT versus CC	1,81 (1,10-3,00)	0,02	0,4
		TT versus CC	10,8 (2,46-48,0)	0,002	0,2
	rs3924787	AG versus AA	1,67 (0,98-2,87)	0,06	0,5
		GG versus AA	1,45 (0,75-2,81)	0,3	0,7
	rs4073676	AT versus AA	1,46 (0,66-3,22)	0,3	0,8
		TT versus AA	0,57 (0,07-4,18)	0,6	0,9

Gen	SNP	Het <i>versus</i> Wt Var <i>versus</i> Wt	Hazard Ratio (95%-KI)	Р	FDR
	rs4073675	CT versus CC	1,18 (0,69-2,00)	0,5	0,9
		TT versus CC	0,86 (0,11-6,32)	0,9	1
NT5C3	rs6946062	TC versus TT	1,48 (0,85-2,57)	0,2	0,6
		CC versus TT	1,64 (0,89-3,03)	0,1	0,6
	rs7795860	AG versus AA	0,82 (0,49-1,34)	0,4	0,8
		GG versus AA	1,17 (0,51-2,68)	0,7	0,9
	rs7792135	AG versus AA	0,56 (0,31-0,99)	0,05	0,4
		GG versus AA	0,64 (0,15-2,66)	0,5	0,9
	rs12668520	TC versus TT	1,32 (0,79-2,20)	0,3	0,8
		CC versus TT	1,08 (0,42-2,76)	0,9	0,9
	rs17170218	AT versus AA	0,65 (0,40-1,07)	0,09	0,5
		TT versus AA	1,33 (0,52-3,38)	0,5	0,9
	rs3750117	GA versus GG	0,81 (0,49-1,33)	0,4	0,8
		AA versus GG	1,26 (0,57-2,77)	0,6	0,9
	rs17170153	AC versus AA	0,51 (0,21-1,22)	0,1	0,6
	rs4394301	AG versus AA	0,69 (0,41-1,18)	0,2	0,6
		GG versus AA	0,84 (0,44-1,62)	0,6	0,9
RRM1	rs1561876	AG versus AA	1,16 (0,64-2,10)	0,6	0,9
	rs1465952	AG versus AA	1,32 (0,69-2,53)	0,4	0,8
	rs11030918	TC versus TT	0,98 (0,58-1,66)	1	1
		CC versus TT	0,96 (0,47-1,96)	0,9	1
	rs12806698	CA versus CC	1,13 (0,69-1,84)	0,6	0,9
		AA versus CC	1,22 (0,55-2,67)	0,6	0,9
	rs10835613	CG versus CC	0,86 (0,50-1,48)	0,6	0,9
		GG versus CC	0,74 (0,36-1,53)	0,4	0,8
	rs7932702	CT versus CC	1,01 (0,61-1,68)	0,9	1
		TT versus CC	0,79 (0,34-1,82)	0,6	0,9
	rs10498198	CG versus CC	1,66 (0,59-4,62)	0,3	0,8

Gen	SNP	Het <i>versus</i> Wt Var <i>versus</i> Wt	Hazard Ratio (95%-KI)	Р	FDR
	rs183484	TG versus TT	0,80 (0,46-1,40)	0,4	0,8
		GG versus TT	0,84 (0,43-1,64)	0,6	0,9
	rs9937	CT versus CC	0,77 (0,44-1,33)	0,4	0,8
		TT versus CC	0,82 (0,42-1,59)	0,6	0,9
	rs1042858	TC versus TT	0,71 (0,35-1,44)	0,4	0,8
	rs1042919	TA versus TT	0,71 (0,35-1,44)	0,4	0,8
RRM2	rs7574663	GC versus GG	1,28 (0,78-2,10)	0,3	0,8
		CC versus GG	0,77 (0,23-2,62)	0,7	0,9
	rs1130609	CA versus CC	0,77 (0,46-1,26)	0,3	0,8
		AA versus CC	0,43 (0,19-0,97)	0,04	0,4
	rs6741290	CT versus CC	0,83 (0,49-1,41)	0,5	0,8
		TT versus CC	0,64 (0,33-1,22)	0,2	0,6
	rs4668664	GA versus GG	0,48 (0,28-0,81)	0,006	0,2
		AA versus GG	0,45 (0,21-0,94)	0,04	0,4
	rs1138729	AG versus AA	1,43 (0,84-2,43)	0,2	0,6
		GG versus AA	2,62 (0,62-10,9)	0,2	0,6
Gemcita	bin-Transport				
ENT1	rs9357436	CT versus CC	0,66 (0,40-1,11)	0,1	0,6
		TT versus CC	0,58 (0,08-4,26)	0,6	0,9
	rs2297393	AG versus AA	0,58 (0,32-1,02)	0,06	0,5
		GG versus AA	0,90 (0,47-1,70)	0,7	0,9
	rs3734701	CT versus CC	0,73 (0,45-1,18)	0,2	0,7
		TT versus CC	0,89 (0,27-2,93)	0,8	0,9
	rs1057985	CT versus CC	0,89 (0,55-1,46)	0,7	0,9
		TT versus CC	0,39 (0,18-0,88)	0,02	0,4
	rs66872347	GA versus GG	1,27 (0,48-3,33)	0,6	0,9
	rs67057732	GA versus GG	2,85 (0,66-12,2)	0,2	0,6
	rs6914414	GA versus GG	0,46 (0,19-1,08)	0,08	0,5

Gen	SNP	Het <i>versus</i> Wt Var <i>versus</i> Wt	Hazard Ratio (95%-KI)	Р	FDR
	rs9462977	AG versus AA	0,78 (0,47-1,30)	0,3	0,8
		GG versus AA	0,78 (0,39-1,53)	0,5	0,8
	rs11274220	DI versus DD	0,63 (0,38-1,03)	0,07	0,5
		II versus DD	5,80 (1,73-19,4)	0,004	0,2
	rs693955	GT versus GG	0,67 (0,41-1,09)	0,1	0,6
		TT versus GG	5,90 (1,75-19,8)	0,004	0,2
	rs1886884	TC versus TT	0,80 (0,48-1,31)	0,4	0,8
		CC versus TT	0,87 (0,44-1,74)	0,7	0,9
	rs747199	GC versus GG	0,66 (0,40-1,08)	0,1	0,5
		CC versus GG	2,57 (0-Inf)	1	1
	rs9394992	CT versus CC	1,05 (0,65-1,70)	0,8	0,9
		TT versus CC	1,32 (0,58-3,00)	0,5	0,8
	rs324148	GA versus GG	0,59 (0,36-0,96)	0,03	0,4
		AA versus GG	3,61 (1,58-8,25)	0,002	0,2
	rs324149	CT versus CC	0,60 (0,36-1,01)	0,06	0,5
		TT versus CC	0,92 (0,36-2,33)	0,9	0,9
	rs45573936	TC versus TT	8,79 (3,17-24,3)	0,00003	0,01
	rs1128930	TG versus TT	0,63 (0,38-1,03)	0,07	0,5
		GG versus TT	1,08 (0,54-2,18)	0,8	0,9
	rs760370	AG versus AA	0,63 (0,38-1,06)	0,08	0,5
		GG versus AA	0,99 (0,52-1,89)	1	1
Hedgeho	og-Signalweg				
PTCH1	rs71366293	DI versus DD	1,81 (1,10-2,99)	0,02	0,4
		II versus DD	1,20 (0,52-2,74)	0,7	0,9
	rs10512249	CT versus CC	1,25 (0,69-2,26)	0,4	0,8
	rs473902	AC versus AA	0,62 (0,32-1,23)	0,2	0,6
		CC versus AA	0,77 (0,10-5,61)	0,8	0,9
	rs574688	GC versus GG	0,85 (0,53-1,37)	0,5	0,9

Gen	SNP	Het <i>versus</i> Wt Var <i>versus</i> Wt	Hazard Ratio (95%-KI)	Р	FDR
		CC versus GG	0,63 (0,22-1,77)	0,4	0,8
	rs2066836	CT versus CC	1,73 (1,06-2,82)	0,03	0,4
		TT versus CC	1,13 (0,49-2,59)	0,8	0,9
	rs2236407	AG versus AA	2,19 (1,28-3,74)	0,004	0,2
		GG versus AA	1,66 (0,87-3,17)	0,1	0,6
	rs357564	GA versus GG	1,08 (0,65-1,78)	0,8	0,9
		AA versus GG	1,22 (0,62-2,37)	0,6	0,9
	rs357565	GT versus GG	0,54 (0,33-0,89)	0,02	0,4
		TT versus GG	0,85 (0,30-2,40)	0,8	0,9
	rs16909856	CT versus CC	1,39 (0,77-2,51)	0,3	0,7
	rs357563	CT versus CC	0,60 (0,37-0,97)	0,04	0,4
		TT versus CC	1,12 (0,49-2,57)	0,8	0,9
SHH	rs288746	TC versus TT	1,99 (1,18-3,36)	0,01	0,3
		CC versus TT	9,46 (0-Inf)	1	1
	rs872723	CT versus CC	1,51 (0,89-2,57)	0,1	0,6
		TT versus CC	0,56 (0,13-2,34)	0,4	0,8
	rs756884	GA versus GG	1,40 (0,71-2,74)	0,3	0,8
		AA versus GG	9,40 (1,20-73,3)	0,03	0,4
	rs9333596	TC versus TT	1,47 (0,85-2,52)	0,2	0,6
		CC versus TT	0,91 (0,28-2,95)	0,9	1
	rs1233556	GA versus GG	1,21 (0,72-2,01)	0,5	0,8
		AA versus GG	0,67 (0,16-2,77)	0,6	0,9
	rs1233571	GA versus GG	0,73 (0,43-1,23)	0,2	0,7
		AA versus GG	1,43 (0,51-4,00)	0,5	0,8
	rs1233560	GA versus GG	0,91 (0,54-1,52)	0,7	0,9
		AA versus GG	1,33 (0,70-2,54)	0,4	0,8
SMO	rs6962740	CG versus CC	0,70 (0,41-1,18)	0,2	0,6
		GG versus CC	0,76 (0,35-1,63)	0,5	0,8

Gen	SNP	Het <i>versus</i> Wt Var <i>versus</i> Wt	Hazard Ratio (95%-KI)	Р	FDR
	rs11762252	CG versus CC	1,53 (0,65-3,60)	0,3	0,8
	rs2718107	TG versus TT	1,30 (0,75-2,26)	0,3	0,8
		GG versus TT	0,81 (0,43-1,51)	0,5	0,9
	rs4731562	CT versus CC	0,93 (0,55-1,57)	0,8	0,9
		TT versus CC	1,02 (0,53-1,96)	0,9	1
	rs2566871	CT versus CC	1,60 (0,93-2,74)	0,09	0,5
		TT versus CC	1,24 (0,64-2,41)	0,5	0,9
	rs2228617	GC versus GG	0,60 (0,34-1,07)	0,09	0,5
		CC versus GG	1,26 (0,45-3,51)	0,7	0,9

Tab. 10 Genpolymorphismen und Gesamtüberleben. Dargestellt sind *Hazard Ratios* (HR) mit 95% -Konfidenzintervall (KI) und *P*-Wert sowie die *False Discovery Rate* (FDR) für jeden Genpolymorphismus als singuläre unabhängige Variable in Bezug zum Gesamtüberleben entsprechend einem *Coxproportional-hazard*-Modell. Im Falle von drei Genotypenkonfigurationen sind der heterozygote Genotyp (Het) und der homozygote Variantenallelstatus (Var) jeweils auf die Wildtyp-Konfiguration (Wt) bezogen, bei nur zwei Genotypenkonfigurationen nur der Het-Status auf den Wildtyp. Fett gedruckt sind diejenigen Polymorphismen, die im Log-rank-Test unter Berücksichtigung eines von der Alleldosis abhängigen linearen Trends einen *P*-Wert von < 0,05 zeigten. Die Angabe "Inf" im Konfidenzintervall (KI) steht für "*infinity*" und trat dann auf, wenn in einer Genotypkonfiguration nur eine Person vorhanden war; das KI ist dann nicht bestimmbar. FDR gibt ein Maß für die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Assoziationen an und ist üblicherweise bei einem Wert > 0,2 gegeben, d.h. die statistische Evidenz für derartige Befunde ist auch bei einem *P*-Wert < 0,05 schwach.

4.4.2 Adjustierung auf nicht-genetische Faktoren

Die nach Log-rank-Test mit einem P-Wert < 0,05 identifizierten und in Tab. 10 durch Fettschrift hervorgehobenen Varianten sind nachstehend in Tab. 11 aufgelistet. Für diese wurde jeweils mit einer Cox-Regression geprüft, ob die beobachtete Assoziation von Grading, Alter, Geschlecht und Resektionsgrad (R0 *versus* R1) beeinflusst wird. Nach dieser Adjustierung verlieben noch sieben Polymorphismen mit einer nominalen statistischen Signifikanz von P < 0,05.

Con	CND	Р	Р
Gen	JNF	(Log-rank-Test)	(Cox-Regression)
Gemcitabin-Me	tabolismus		
DCTD	rs7278	0,003	0,009
	rs13148414	0,03	0,2
	rs2515683	0,03	0,1
RRM2	rs4668664	0,006	0,004
	rs1130609	0,03	0,04
Gemcitabin-Tra	insport		
ENT1	rs45573936	0,00003	0,0005
	rs1057985	0,04	0,01
Hedgehog-Sign	alweg		
PTCH1	rs2236407	0,04	0,01
	rs357565	0,05	0,2
SHH	rs288746	0,02	0,05

Tab. 11 Zusammenstellung der mit dem Gesamtüberleben assoziierten SNPs. Betrachtet wurden hier zunächst alle SNPs mit P < 0.05 im Log-rank-Test. Diese wurden dann jeweils einer Cox-Regressionsanalyse mit den Faktoren Alter, Geschlecht, Grading und Resektionsgrad (R0 *versus* R1) als potenzielle *Confounder* unterzogen. Dabei wurde in SPSS die Methode "Enter" verwendet, wobei die unabhängigen Variablen mit Ausnahme des Alters als kategoriell klassifiziert wurden. Varianten mit daraus resultierenden P-Werten < 0.05 sind durch Fettschrift hervorgehoben.

4.4.3 Kombiniertes SNP-Modell

Diejenigen sieben SNPs, die auch nach Adjustierung auf nicht-genetische Faktoren eine nominale statistische Signifikanz mit P < 0,05 zeigten (siehe Tab. 11 in vorigem Kapitel 4.4.2), wurden nun zusammen in einem Cox-Modell analysiert. Dies ist unter Angabe der HR mit dem 95%-KI und *P*-Werten in Tab. 12 aufgeführt. Dabei blieben drei Polymorphismen unterhalb des Signifikanzniveaus von P < 0,05. Diese sind in Tab. 12 durch Fettschrift hervorgehoben (rs1057985 hatte einen *P*-Wert von exakt 0,049).

Gen	SNP	Hazard Ratio (95%-KI)	Р
Gemcitabin-Metabolis	smus		
DCTD	rs7278	1,60 (0,98 - 2,66)	0,06
RRM2	rs4668664	0,69 (0,41 - 1,16)	0,2
	rs1130609	1,02 (0,62 - 1,67)	0,9
Gemcitabin-Transpor	t		
ENT1	rs45573936	9,24 (2,95 - 28,9)	0,0001
	rs1057985	0,68 (0,47 - 1,00)	0,05
Hedgehog-Signalweg			
PTCH1	rs2236407	1,25 (0,93 - 1,70)	0,1
SHH	rs288746	2,08 (1,20 - 3,62)	0,01

Tab. 12 Kombiniertes Cox-Modell der am stärksten mit dem Überleben assoziierten SNPs. Betrachtet wurden hier zunächst die sieben SNPs mit P < 0,05 in der Cox-Regressionsanalyse nach Adjustierung auf nicht-genetische Faktoren (Tab. 11). Fett hervorgehoben sind diejenigen SNPs, die im kombinierten Modell einen P-Wert < 0,05 aufwiesen.

4.4.4 Adjustierung auf multiples Testen

Nun wurde eine Adjustierung auf multiples Testen vorgenommen, indem für die oben genannten SNP-Assoziationen eine FDR unter Berücksichtigung der Zahl der insgesamt untersuchten Genvarianten berechnet wurde. Nach dieser Prozedur verblieb nur der Effekt der *ENT1*-Aminosäurevariante rs45573936 statistisch signifikant mit P = 0,004. Dieser Beziehung wurde daher die stärkste Bedeutung eingeräumt. Die nachfolgenden Darstellungen konzentrieren sich somit zunächst auf diese Variante. Weiterhin werden noch die SNPs dargestellt, welche sowohl nach Adjustierung auf nicht-genetische Faktoren (Kapitel 4.4.2) als auch im kombinierten Cox-Modell (Kapitel 4.4.3) mit P < 0,05 mit der Überlebenszeit assoziiert waren, auch wenn nach Korrektur auf multiples Testen hier keine statistische Signifikanz mehr vorlag.

4.4.5 Stärkste Effekte für Varianten im Bereich des ENT1-Gens

Die stärkste Assoziation mit der Überlebenszeit zeigte sich für den SNP rs45573936, der zum Aminosäureaustausch Ile216Thr im Nukleosid-Transporter *ENT1 (SLC29A1)* führt. Das Variantenallel hat dabei in der Allgemeinbevölkerung nur eine Häufigkeit von ca. 1%. In dem ausgewerteten Kollektiv (Resektionsstatus R0 und R1, n = 97) waren fünf Patienten mit heterozygoter Allelausprägung enthalten; Homozygotie für die Variante (Thr216) fand sich nicht. Der Effekt dieser Variante auf das Überleben ist in Abb. 10 anhand eines Kaplan-Meier-Plots grafisch veranschaulicht. Das *Hazard Ratio* für Patienten mit heterozygoter Allelausprägung im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-Konfiguration wurde mit 8,8 (95%-KI 3,2 - 24,3; siehe Tab. 10 oben) ermittelt. Das bedeutet, die Variantenträger hatten über die Zeit konstant ein 8,8-fach erhöhtes Sterberisiko. Der Einfluss dieser Variante war sowohl nach

Adjustierung auf nicht-genetische Parameter (P = 0,0005; siehe Tab. 11 oben und im Detail nachstehend in Tab. 13) als auch nach Korrektur auf multiples Testen (P = 0,004; Kapitel 4.4.4) statistisch signifikant.

Parameter	Statistische Signifikanz (P-Wert)
ENT1 rs45573936	0,0005
Grading	0,04
Resektionsgrad (0 vs 1)	0,2
Geschlecht	0,4
Alter bei Therapiebeginn	0,8

Tab. 13 Cox-Regressionsanalyse zur Assoziation von *ENT1* rs45573936 und Überleben. Die Angaben beziehen sich auf 97 Patienten mit adenoduktalem Pankreaskarzinom und R0- bzw. R1-Resektion.



Abb. 10 Überlebenskurven in Abhängigkeit des ENT1-SNPs rs45573936 (Ile216Thr). Es sind für die Genotypenkonfigurationen zwei Wildtyp (TT) und Heterozygotie (TC) Überlebensraten ab Beginn der die Gemcitabin-Therapie veranschaulicht. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem Log-rank-Test

Da sich in der initialen Kohorte von 142 Patienten (einschließlich R2 und nicht operable) elf mit Heterozygotie für rs45573936 fanden, wurde geprüft, ob eventuell ein Einfluss dieser Variante auf die Ausbreitung des Pankreas-Karzinoms zum Operationszeitpunkt vorliegt. Dazu wurde die Genotypverteilung dieser Variante in den drei Gruppen "R2/Inoperabilität", "R0/R1" und "Gesunde" jeweils paarweise verglichen. Zwischen "R0/R1" und "Gesunden" war keinerlei Unterschied festzustellen. In der Gruppe "R2/Inoperabilität" war ein Trend zu einem häufigeren Vorkommen des heterozygoten Status gegenüber "R0/R1" (P = 0,09) und gegenüber "Gesunden" (P = 0,07) festzustellen.

Eine weitere Variante des *ENT1*-Gens, für die sich ein Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit seiner Allelausprägung feststellen ließ, war rs1057985. Dieser SNP ist im

Promotorbereich des *ENT1*, 1341 Basenpaare vor der längsten mRNA-Transkriptvariante des Gens, lokalisiert (Abb. 11). Mit einer beobachteten Allelfrequenz von 38% trat das Variantenallel relativ häufig innerhalb der Patientenkohorte auf, was zu den Daten zur Verteilung innerhalb der kaukasischen Bevölkerung (33% nach Datenbank dbSNP) passt. Wie aus Abb. 11 ersichtlich, sind rs1057985 und die oben beschriebene Aminosäurevariante rs45573936 nicht im Kopplungsungleichgewicht ($r^2 = 0,03$), d.h. sie sind voneinander unabhängig.



Abb. 11 Architektur des ENT1-Gens und Kopplungsplot der analysierten Varianten. Die Abbildung ist einer Vorarbeit der Abteilung Klinische Pharmakologie (Kuschel 2011) entnommen. Die 18 SNPs sind von 5'- nach 3'-Richtung aufsteigend nummeriert. Rs1057985 ist SNP "4", rs45573936 SNP "16". Im oberen Teil der Abbildung finden sich die fünf Transkriptvarianten des ENTI-Gens in Relation zu den untersuchten Polymorphismen. Im unteren Teil der Abbildung sind paarweise die Kopplungsungleichgewichte (linkage disequilibrium, LD) der Genvarianten als Plot dargestellt. Anhand der Zahlen und Farbgebung innerhalb der Rauten kann auf die Stärke des LD geschlossen werden. Ein hohes LD wird durch einen hohen Zahlenwert und dunkle Farbe signalisiert. Starke genetische Kopplung spricht für häufige gemeinsame Vererbung der beiden Genvarianten. Ein dunkel-schwarzes Feld ohne Zahlenwert zeigt ein LD von 100% an.

Univariat zeigte der SNP rs1057985 als singuläre unabhängige Variable sowohl im Log-rank-Test und der Cox-Regressionsanalyse einen Effekt auf die Überlebenszeit mit P = 0,04. Grafisch ist dies in Abb. 12 illustriert. Dabei ist klar erkennbar, dass Träger der Variante AA bedeutend länger überlebten als Wildtypträger (HR 0,39; 95%-KI 0,18 - 0,88; siehe Tab. 10 oben). Dies besagt, dass homozygote Träger des Variantenallels gegenüber der Wildtyp-Konfiguration eine um fast 2/3 reduzierte Wahrscheinlichkeit haben, in einem bestimmten Zeitintervall unter Gemcitabin zu versterben. Für Träger heterozygoter Allelausprägung waren diese Befunde nicht nachweisbar (HR 0,89; 95%-KI 0,55 - 1,46).



Abb. 12 Einfluss von rs1057985 auf die Überlebenszeit. Es sind für die drei Genotypenkonfigurationen Wildtyp (CC), Heterozygotie (CT) und Variante (TT) die Überlebensraten für die 97 Patienten mit R0- bzw. R1-Resektionsstatus gezeigt. Die Darstellung entspricht Abb. 6 und Abb. 7

Wurden wie zuvor nicht-genetische Faktoren im Cox-Modell berücksichtigt, nahm die statistische Signifikanz dieser Variante noch leicht zu (siehe Tab. 14). Nach Korrektur auf multiples Testen wurde ein *P*-Wert von 0,5 bestimmt, so dass die Nullhypothese eines falschpositiven Befundes gegenwärtig nicht verworfen werden kann.

Parameter	Statistische Signifikanz (P-Wert)
<i>ENT1</i> rs1057985	0,01
Grading	0,006
Resektionsgrad (0 vs 1)	0,3
Alter bei Therapiebeginn	0,8
Geschlecht	0,9

 Tab. 14 ENT1 rs1057985 und nicht-genetische Faktoren im Cox-Modell bezogen auf Gesamtüberleben.

 Betrachtet wurden 97 Patienten mit Pankreaskarzinom und R0- bzw. R1-Resektionsstatus.

4.4.6 SNP in SHH mit tendenzieller Beeinflussung der Überlebenszeit

Die Genvariante rs288746 ist im Promotorbereich des *SHH*-Gens, 1705 Basenpaare vor Beginn des RNA-Transkripts, lokalisiert. Das *SHH*-Gen selbst befindet sich auf Chromosom 7. Innerhalb der kaukasischen Normalbevölkerung hat das Variantenallel dieses Polymorphismus eine Häufigkeit von 10,5% (in meiner Studie 14,8%). Die Variante war bei den 97 analysierten Patienten mit Pankreaskarzinom und Resektionsstatus R0 bzw. R1 mit P = 0,02 nach Log-rank-Test mit dem Gesamtüberleben assoziiert. Das HR wurde mit 1,99 (95%-KI: 1,18 - 3,36) bestimmt, d.h. Patienten mit heterozygoter Allelausprägung hatten
verglichen mit Trägern des Wildtypes ein 2-fach erhöhtes Risiko, unter Gemcitabin-Therapie zu versterben (P = 0,01). Eine Kaplan-Meier-Grafik in Abb. 13 verdeutlicht diesen Befund.



Abb. 13 Überlebenszeit in Abhängigkeit von *SHH*-SNP rs288746. Die Darstellung erfolgte analog zu Abb. 6 und Abb. 7

Auch nach Adjustierung auf nicht-genetische Faktoren war in einem Cox-Regressionsmodell ein Einfluss dieser Variante in ähnlicher Größenordnung wie das Grading erkennbar (P = 0.05; Tab. 15).

Parameter	Statistische Signifikanz (P-Wert)
SHH rs288746	0,05
Grading	0,05
Resektionsgrad (0 vs 1)	0,2
Geschlecht	0,5
Alter bei Therapiebeginn	0,7

Tab. 15 Einfluss von *SHH* rs288746 und nicht-genetischer Faktoren auf Gesamtüberleben. Im Cox-Modell analysiert, wurden Daten von 97 Patienten mit Pankreaskarzinom mit R0- oder R1-Resektionsstatus zugrunde gelegt.

4.5 Hämatotoxizität unter Gemcitabin-Therapie

4.5.1 Deskriptiver Verlauf von Leukozyten und Thrombozyten

Für die Bewertung der sekundären Zielgröße "Hämatotoxizität unter Gemcitabin-Therapie" wurde wieder die ursprüngliche Patientenzahl von 142 ungeachtet des Resektionsstatus zu Grunde gelegt. Für 116 von diesen gelang eine lückenlose Darstellung der Verläufe von Leukozyten- und Thrombozytenzahlen während der ersten 42 Tage der Therapie. Bedingung war die erstmalige Gabe von Gemcitabin. Bei dem zumeist angewandten 3/4-Takt (d.h. drei Gaben von 1000 mg Gemcitabin/m² KOF im wöchentlichen Abstand gefolgt von einer Woche Pause) sind in diesem 42-Tage-Intervall zwei komplette Gemcitabin-Zyklen enthalten. Von den 116 Patienten mit auswertbaren Blutbilddaten erhielten 71 einen solchen 3/4-Takt, 23 einen 2/3-Takt, 16 Patienten einen 6/8-Takt und 6 eine andere Taktung der Chemotherapie.

Die Charakteristika der Hämatotoxizitätsdaten sind in Tab. 16 und Tab. 17 zusammengefasst. Der tiefste Wert für Leukozyten und Thrombozytenzahl innerhalb des Beobachtungsintervalls von 42 Tagen wurde als Nadir festgelegt. Der Nadir von Leukozyten betrug im Median 3400/µl und der von Thrombozyten 155000/µl. Diese Nadirwerte wurden schließlich Zytotoxizitätskriterien, den sogenannten Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTC, Version 4.0, 2010) des National Cancer Instituts (NCI), zugeordnet. Diese Kriterien beschreiben den Grad der (Hämato-) Toxizität einer Therapie auf einer Skala von Grad 1 (leicht) bis Grad 4 (schwer).

Nadir Leukozyten [1000/µl] bzw. in % zu Tag 0 ¹	
Median (%)	3,4 (51)
Interquartilabstand (%)	2,6 - 4,9 (39 - 67)
Range (%)	0,7 - 10,6 (11 - 102)
NCI - CTC [Zahl der Patienten] ²	
G0:>4000 Leukozyten/µI (Untergrenze Normbereich)	48
G1:3000 - 4000 Leukozyten/µl	26
G2:2000 - 3000 Leukozyten/µl	26
G3:1000 - 2000 Leukozyten/µl	15
G4:<1000 Leukozyten/µl	1
Zeit bis Nadir Leukozyten [Tage]	
Median	14
Interquartilabstand	7 - 28
Range	3 - 42
Gemcitabin-Intensität bei Leukozytennadir [Zahl der Patienten] ³	
<1000 mg/m² KOF	49
1000 - 2000 mg/m² KOF	46
2000 - 3000 mg/m² KOF	21
Leukozyten [1000/µl] an Tag 0 ¹	
Median	7
Interquartilabstand	5,7 - 8,6

Range	3 - 12,4			
Leukozyten [1000/µl] an Tag 7 der Gemcitabin-Therapie				
Median	4,5			
Interquartilabstand	3,4 - 5,7			
Range	1,2 - 11,4			
% Leukozyten Tag 7 zu Tag 0				
Median	64,3			
Interquartilabstand	50,0 - 83,3			
Range	29,1 - 186,0			

Tab. 16 Verlaufsdaten für Leukozyten während der ersten 42 Tage Gemcitabin-Therapie. ¹Die Werte von Tag 0 beziehen sich in der Regel auf eine unmittelbar vor der ersten Gemcitabin-Gabe abgenommene Blutprobe, in einzelnen Fällen bis zu maximal zwei Tage davor. ²NCI (National Cancer Institute) – CTC (Common Terminology Criteria for Adverse Events) beschreibt den Grad der Toxizität einer durchgeführten Therapie, hier diejenige von Gemcitabin auf Leukozyten und bezieht sich auf die gemessenen Nadir-Werte. Die Einteilung erfolgte entsprechend den Kriterien der CTC-Version 4.0 (2010). G0 entspricht dem Normbereich und bedeutet keine Toxizität.³Die Gemcitabin-Intensität bei Nadir beschreibt die kumulative Gesamtdosis Gemcitabin, welche innerhalb von 3 Wochen (21 Tage) vor Eintritt des Nadir verabreicht wurde.

Nadir Thrombozyten [1000/µl] bzw. in % zu Tag 0	
Median (%)	154,5 (55)
Interquartilabstand (%)	113,5 - 199 (42 - 67)
Range (%)	38 - 350 (8 - 184)
NCI - CTC [Zahl der Patienten]	
G0:>150000 Thrombozyten/µI (Untergrenze Normbereich)	61
G1: 75000 - 1500000 Thrombozyten/µl	45
G2: 50000 - 75000 Thrombozyten/µl	8
G3: 25000 - 50000 Thrombozyten/µl	2
G4:<25000 Thrombozyten/µl	0
Zeit bis Nadir Thrombozyten [Tage]	
Median	14
Interquartilabstand	8 - 28,3
Range	2 - 43
Gemcitabin-Intensität bei Thrombozytennadir [Zahl der Patienten]	
<1000 mg/m² KOF	37
1000 - 2000 mg/m² KOF	64
2000 - 3000 mg/m² KOF	16
Thrombozyten [Tsd./µl] an Tag 0 der Gemcitabin-Therapie	
Median	273
Interquartilabstand	222 - 346
Range	102 - 705
Thrombozyten [Tsd./µl] an Tag 7 der Gemcitabin-Therapie	
Median	196
Interquartilabstand	158 - 255,5
Range	42 - 708
% Thrombozyten Tag 7 zu Tag 0	
Median	70,6
Interquartilabstand	60,1 - 82,9
Range	31,6 - 197,8

Tab. 17 Verlaufsdaten für Thrombozyten in den ersten 42 Tagen der Gemcitabin-Therapie. Die Darstellungsweise ist wie in Tab. 16 für Leukozyten beschrieben.

4.5.2 Variabilität in Ausprägung und Zeitdauer des Nadir-Eintritts

Die Häufigkeitsverteilung der Nadire entsprechend der CTC-Skala und die Zeitdauer bis zu deren Eintreten ist für Leukozyten in Abb. 14 und für Thrombozyten in Abb. 15 veranschaulicht. Von 116 Patienten entwickelten 16 (14%) eine schwere Leukozytopenie mit Grad 3 odere 4. Demgegenüber zeigten 48 (41%) keine nennenswerte Leukozytotoxizität. Schwere Thrombozytopenien waren wesentlich seltener zu verzeichnen (2 Fälle). Für beide Zellreihen traten die Nadire bei etwa 2/3 der Patienten innerhalb der ersten 21 Tage auf (Median 14 Tage). Zwischen der Ausprägung des Nadirs (in absoluten Zahlen) und der Zeitdauer bis zu dessen Eintreten bestand keinerlei Korrelation, weder bei den Leukozyten noch bei den Thrombozyten (Spearman rho = -0,07, P = 0,5 bzw. rho = -0,14, P = 0,2).



Abb. 14 Häufigkeitsverteilung des Leukozytopeniegrades und des Zeitintervalls bis Nadireintritt. Betrachtet wurden insgesamt 116 Patienten während der ersten 42 Tage einer Gemcitabin-Therapie. Die Gradeinteilung der Leukozytopenie wurde anhand der der Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTC) des National Cancer Institute (NCI) vorgenommen. Grad 0 entspricht dem Normbereich und stellt keine Toxizität dar.



Abb. 15 Häufigkeitsverteilung des Thrombozytopeniegrades und des Zeitintervalls bis Nadireintritt. Darstellungsweise analog zu Abb. 14.

Es ist denkbar, dass die Intensität der Gemcitabin-Therapie (im Median aller Patienten 2000 mg/m² KOF) die Nadirwerte von Leukozyten und Thrombozyten beeinflusst. Dies wurde in einer nicht-parametrischen Korrelationsanalyse für die in einem Zeitraum von 21 Tagen vor Auftreten des Nadirs verabreichte kumulative Gemcitabin-Dosis geprüft. Ein Zusammenhang fand sich nur für die Zeit bis zum Eintreten des Leukozytennadirs (rho = 0,61, P < 0,001), was jedoch nicht erstaunlich ist, da einem "späteren" Nadir in der Regel auch eine höhere Gemcitabin-Dosis voranging. Mit der Schwere des Nadirs war die Gemcitabin-Intensität dagegen überhaupt nicht korreliert, weder bei Leukozyten (rho = -0,01, P = 0,9) noch bei Thrombozyten (rho = 0,01, P = 0,9).

4.5.3 Zytotoxizität nach singulärer Gemcitabin-Gabe

Als weiterer Parameter zum Vergleich der Zytotoxizität bei den einzelnen Patienten wurden die Veränderungen der Hämatotoxizitätswerte über ein konstantes Zeitintervall betrachtet. Es wurden dafür die ersten sieben Tage gewählt, da zu Beginn der Therapie in der Regel noch keine Dosisanpassungen erfolgten und fast alle Patienten initial 1000 mg/m² KOF Gemcitabin erhielten. Außerdem werden bei allen angewandten Regimen unabhängig des Gemcitabin-Takts nach einer Woche routinemäßig Blutbilddaten vor der nächsten Gabe erhoben. Bezogen auf den prätherapeutischen Ausgangswert waren die Leukozyten nach sieben Tagen im Median auf 64,3% und die Thrombozyten auf 70,6% abgefallen. Für eine diesbezüglich auswertbare Subgruppe von 93 Patienten ist die Verteilung der absoluten Leukozyten- und Thrombozyten-Werte für Tag 0 und Tag 7 in Abb. 16 dargestellt.



Abb. 16 Verlauf von Leukozyten (links) und Thrombozyten (rechts) innerhalb der ersten sieben Tage. Alle betrachteten 93 Patienten hatten, der prätherapeutischen Blutentnahme an Tag 0 folgend, eine einmalige Gabe von 1000 mg Gemcitabin/m² KOF erhalten. Die statistische Signifikanz der Veränderungen der Leukozyten- und Thrombozytenwerte zwischen den beiden Messpunkten wurde mit dem gepaarten Rangsummentest nach Wilcoxon geprüft und ist als *P*-Wert angegeben.

4.5.4 Einfluss von Varianten in Gemcitabin-Kandidatengenen auf Nadir sowie Zytotoxizität nach singulärer Gemcitabin-Gabe

Denkbar ist, dass Polymorphismen in Kandidatengenen für die Wirksamkeit von Gemcitabin nicht nur den Erfolg, sondern auch die Nebenwirkungen einer Therapie beeinflussen können. Daher wurden 86 der 109 in Kapitel 4.3 gelisteten Genvarianten hinsichtlich möglicher Assoziationen zur Hämatotoxizität während einer Gemcitabin-Therapie überprüft. Keine Berücksichtigung fanden hier die 23 Varianten der Gene des Hedgehog-Signalwegs (PTCH1, SHH und SMO), da die Bedeutung dieser Signalkaskade vor allem im Tumor-induzierten Bindegewebswachstum zu sehen ist. Als Phänotypen wurden – wie oben beschrieben (siehe Kapitel 4.5.2 und 4.5.3) – für Leukozyten und Thrombozyten die Zeitdauer (in Tagen) bis zum Nadir während der ersten 42 Tage der Gemcitabin-Therapie sowie die Veränderungen beider Blutzelllinien während der ersten sieben Therapietage analysiert. Insgesamt zeigten 14 Genvarianten einen Einfluss auf mindestens einen der genannten phänotypischen Parameter mit P < 0.05. Eine Zusammenstellung dieser Ergebnisse ist in Tab. 18 aufgeführt. Unter Berücksichtigung multiplen Testens war jedoch keine dieser Assoziationen statistisch signifikant. Eine medizinische Bedeutung einer dieser Varianten wäre plausibler, wenn weitere Hinweise für eine Funktionalität vorlägen. Aus diesem Grund wurden hier zusätzlich die Effekte der 14 Polymorphismen auf die Überlebenszeit der Patienten betrachtet (siehe ebenfalls Tab. 18) und den Assoziationen mit Hämatotoxizitätsdaten gegenüber gestellt. In diesem Zusammenhang fand sich für den ENTI-SNP rs747199 eine konsistente Beeinflussung von Überleben und der Wirkung Gemcitabin von auf den Thrombozytenverlauf innerhalb der ersten sieben Therapietage.

		Parameter		Gemcitabin	Überleben	
Gen	SNP	klinischer Hämatotoxizität	Р	Sensitivität	Tendenz	P (Log-rank)
CDA	rs12404655	Thrombozyten Therapietag 7	0,04	↑	\leftrightarrow	0,5
CMPK1	rs12039726	Zeit bis Nadir Leukozyten	0,02	↑	\leftrightarrow	0,2
CMPK1	rs35687416	Leukozyten Therapietag 7	0,02	↑	\leftrightarrow	1,0
CMPK1	rs6660321	Zeit bis Nadir Leukozyten	0,02	↑	\leftrightarrow	0,2
DCTD	rs1960207	Thrombozyten Therapietag 7	0,02	\downarrow	\leftrightarrow	0,7
	rs4073675	Thrombozyten Therapietag 7	0,003	\downarrow	\leftrightarrow	0,7
		Zeit bis Nadir Leukozyten	0,01	\downarrow		
DCTD	rs7278	Zeit bis Nadir Leukozyten	0,01	Ť	\downarrow	0,003
ENT1	rs1128930	Thrombozyten Therapietag 7	0,01	Ť	\leftrightarrow	0,6
	rs747199	Thrombozyten Therapietag 7	0,007	Ť	Ť	0,07
	rs760370	Thrombozyten Therapietag 7	0,01	↑	\leftrightarrow	0,6
NT5C3	rs7795860	Zeit bis Nadir Thrombozyten	0,01	\downarrow	\leftrightarrow	0,9
RRM1	rs7932702	Leukozyten Therapietag 7	0,02	\downarrow	\leftrightarrow	0,7
	rs9937	Leukozyten Therapietag 7	0,04	Ť	\leftrightarrow	0,6
RRM2	rs1138729	Zeit bis Nadir Leukozyten	0,02	↑	↓	0,09

Tab. 18 SNPs mit Einfluss auf Hämatotoxizität. Klinische Parameter waren für Leukozyten sowie Thrombozyten die Zeit bis Eintritt des Nadir innerhalb der ersten 42 Tage der Gemcitabin-Therapie und die Veränderung der Zellzahlen von Tag 7 der Therapie bezogen auf Tag 0 (in %). Assoziationen mit P < 0,05 sind aufgelistet. Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mit Mann-Whitney-U-Test (zwei Genotyp-Konfigurationen) bzw. Jonkheere-Terpstra-Test (drei Genotypen-Ausprägungen mit je mindestens fünf Patienten). Entsprechend der biochemischen Funktionsweise eines Gens wurden die Effekte des Variantenallels eines Polymorphismus hinsichtlich der Sensitivität auf Gemcitabin bewertet (\uparrow = gesteigerte, \downarrow = reduzierte Empfindlichkeit). Zum Vergleich ist der Einfluss dieser Genpolymorphismen auf die Überlebenszeit gegenüber gestellt, wobei " \uparrow " eine Verängerung, " \downarrow " eine Verkürzung und " \leftrightarrow " kein Effekt des Variantenallels bedeutet.

4.5.5 Rs747199 beeinflusst gleichsinnig Überleben und Hämatotoxizität

Historisch zunächst dem Promotorbereich zugerechnet (traditionelle Nomenklatur:-706G>C), wird rs747199 heute auf Intron 1 des *ENT1*-Gens, 7103 Basenpaare hinter dem Transkriptionsstart der längsten mRNA-Isoform, lokalisiert (siehe oben Abb. 11). Laut dbSNP-Datenbank besteht eine Häufigkeit des selteneren Allels von 16% bei Kaukasiern. Die Überprüfung der Auswirkungen dieses SNPs auf die untersuchten Hämatotoxizitätsparameter zeigte eine Assoziation mit P = 0,007 mit den Veränderungen der Thrombozytenzahlen innerhalb der ersten Therapiewoche. Für Patienten mit Variantenallel war an Tag sieben der Therapie bezogen auf den prätherapeutischen Wert eine verstärkte Thrombozytopenie zu verzeichnen (siehe Abb. 17, links). In Gegenwart des Variantenallels *C* zeigte sich zudem eine Tendenz zu längerem Gesamtüberleben. Ein Kaplan-Meier-Plot in Abb. 17 rechts illustriert diese Beobachtung.



Abb. 17 Effekte von rs747199 auf Hämatotoxizität (links) und Gesamtüberleben (rechts). Links ist der Anteil Thrombozyten an Therapietag 7 bezogen auf Therapietag 0 in Abhängigkeit von rs747199 dargestellt. Die statistische Prüfung erfolgte hier mit dem Mann-Whitney-U-Test, wobei der heterozygote und homozygote Variantenallel-Status zusammengefasst wurden. Rechts ist der Einfluss dieser Genvariante auf das Gesamtüberleben veranschaulicht und mit Hilfe des Log-rank-Tests statistisch bewertet.

5 Diskussion

Der Einfluss des Resektionsgrades und des histopathologischen Gradings auf die Überlebenszeit von Patienten mit Pankreaskarzinom ist bekannt. Als möglicher neuer Marker für das Überleben mit Gemcitabin therapierter Patienten konnte in meiner Arbeit eine Aminosäurevariante im Nukleosidtransporter ENT1 identifiziert werden. Diese (rs45573936) zeigte sich auch unter Berücksichtigung nicht-genetischer Faktoren und nach Korrektur auf multiples Testen statistisch signifikant mit dem Überleben verknüpft. Zwei weitere Varianten im Promotorbereich bzw. im Intron 1 des ENT1-Gens, rs1057985 bzw. rs747199, zeigten ebenfalls einen Bezug zum Gesamtüberleben. Letztgenannte war gleichzeitig auch mit dem Grad der Thrombozytotoxizität verbunden. Das Zeitintervall bis zum Auftreten des Nadirs für Thrombozyten bzw. Leukozyten stand in keinem Zusammenhang mit dessen Intensität. In den Genen DCTD, RRM2, PTCH1 und SHH konnten fünf weitere Genvarianten mit einer Beeinflussung der Überlebenszeit identifiziert werden. Unter Berücksichtigung multiplen Testens kann jedoch nur der Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und der Aminosäurevariante rs45573936 als statistisch signifikant betrachtet werden. Nachfolgend werden diese Befunde - beginnend mit rs45573936 als stärkstem - diskutiert und mit der aktuellen Literaturlage in Beziehung gesetzt.

5.1 ENT1-Aminosäurevariante Ile216Thr (rs45573936)

Die Aminosäurevariante rs45573936 des *ENT1*-Gens zeigte einen starken Effekt auf die Gesamtüberlebenszeit der untersuchten Patienten mit Pankreaskarzinom. Heterozygote Patienten verstarben deutlich früher als Patienten mit Homozygotie für den Wildtyp. Homozygote Träger des Variantenallels wurden nicht beobachtet. Auch nach Adjustierung auf nicht-genetische Faktoren sowie auf multiples Testen erwies sich die Assoziation als statistisch signifikant. Die Thr216-Variante dieses biallelischen Polymorphismus findet sich in der deutschen Bevölkerung mit einer Frequenz von etwa 2,5%.

Der ENT1-Transporter enthält elf transmembranäre Domänen (Sundaram et al. 2001). In der sechsten dieser Domänen befindet sich der Aminosäureaustausch Ile216Thr (siehe Abb. 18). Klare Beweise für die Funktionalität der Variante liegen noch nicht vor. In der Literatur existieren hierzu bislang nur zwei Arbeiten. In Thr216-überexprimierenden Hefezellen wurde die kompetitive Hemmung des [³H]-Inosin-Transports durch die Nukleosid-Analoga Gemcitabin, Cytarabin und Ribavirin analysiert (Osato et al. 2003). Es konnte dabei für keines der drei Medikamente eine relevante Modifikation des Transports durch das Thr216-Allel nachgewiesen werden. Diese Messungen wurden über einen Zeitraum von 20 min

durchgeführt. Dabei wurde der einwärts gerichtete Transport, jedoch kaum derjenige in die Gegenrichtung erfasst. Es ist durchaus denkbar, dass sich Thr216 bei einem von intra- nach extrazellulär gerichteten Gradienten auswirkt. Weiterhin ist in Bezug auf die zitierte Arbeit anzumerken, dass Gemcitabin und die beiden anderen Nukleosid-Analoga (da nicht radioaktiv markiert) lediglich als Inhibitoren des Transports von [³H]-Inosin, nicht jedoch als direkte Substrate des ENT1 gemessen wurden. Diese Unterscheidung sollte gleichwohl nicht außer Acht gelassen werden. Dass Thr216 tatsächlich die Aufnahme von Nukleosiden modulieren kann, wurde kürzlich in einer Studie für Adenosin gezeigt (Kim et al. 2011).



Abb. 18 Sekundärstruktur des ENT1-Transporters. Der rote Pfeil zeigt die Lokalisation von Ile216Thr an.

Einen weiteren Hinweis auf eine Funktionalität dieser Variante erbrachte eine frühere Studie der Abteilung Klinische Pharmakologie (Kuschel 2011). Dabei fand sich *in vitro* eine nahezu komplette Resistenz auf Gemcitabin in Gegenwart von Thr216 (siehe Abb. 19). Leukozyten wurden 6 h mit Gemcitabin inkubiert, danach das Zytostatikum durch gründliches Waschen entfernt und nach weiteren 42 h die Apoptoserate in Bezug auf eine unbehandelte Kontrolle durchflusszytometrisch gemessen. Somit scheint es sich hier im Wesentlichen um eine Wirkung auf den Efflux von Gemcitabin zu handeln, der bei der homogeneren Zellpopulation der T-Lymphozyten besonders zu Tage trat. In Parallelansätzen, die während der gesamten Inkubationszeit von 48 h Gemcitabin exponiert waren, war dies so nicht zu sehen. Diese Beobachtung zusammen mit der Tatsache, dass der starke Effekt bereits im heterozygoten Zustand von Ile216Thr bewirkt wurde, lässt die Hypothese zu, dass es sich bei Thr216 um ein *gain-of-function*-Allel handeln könnte. Möglicherweise beruht dies auf einer Phosphorylierung des Thr-Restes. In einem weiteren Schritt sollte zunächst untersucht werden, ob dies in Anbetracht der Lokalisation dieser Aminosäure in der ENT1-Proteinkette prinzipiell denkbar ist. Ausgeschlossen hingegen wurde bereits ein Einfluss von rs45573936 auf die Transkription und Translation des *ENT1*-Gens (Kim et al. 2011). Demzufolge werden bei Heterozygotie das Ile- und das Thr-Allel gleichberechtigt exprimiert, was ein weiterer Grund für die Annahme ist, dass ein Thr-bedingter Effekt mutmaßlich hyperfunktionell ist.



Abb. 19 Gemcitabin-Toxizität in Abhängigkeit von rs45573936 (Ile216Thr). Die Abbildung ist einer Vorarbeit der Abteilung Klinische Pharmakologie (Kuschel 2011) entnommen. Aus venösem Blut von 67 gesunden Spendern wurden PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) isoliert, über 6 h bei 37°C mit 10 μg/ml Gemcitabin behandelt und danach so gewaschen, dass Gemcitabin im Kulturmedium um mindestens Faktor 1000 verdünnt wurde. Nach 42 h Weiterkultivierung bei 37°C (insgesamt 48 seit Beginn der Gemcitabin-Zugabe) erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie. Es wurde jeweils eine Probe ohne jegliche Gemcitabin-Behandlung als Kontrolle mitgeführt. Dargestellt sind die Effekte von rs45573936 auf die mit Gemcitabin exponierten Proben in Relation zur jeweiligen Kontrolle, und zwar für die Gesamtpopulation der PBMCs (links) sowie für die mit einem spezifischen Antikörper markierte Subpopulation der T-Lymphozyten (rechts). Die statistische Testung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

5.2 Varianten in Promotorregion und Intron 1 von ENT1

Zwei weitere Varianten im *ENT1* hatten einen günstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben, wenngleich diese Befunde unter Berücksichtigung multiplen Testens zum jetzigen Zeitpunkt nicht als statistisch signifikant bezeichnet werden können.

Zum Polymorphismus rs1057985 ist in der Literatur noch nichts bekannt. Auf Grund seiner Lokalisation (siehe oben Abb. 11) sind Allel-spezifische Effekte auf die Transkription vorstellbar. Möglicherweise werden die beiden längeren Transkripte nur in Gegenwart eines Allels gebildet (mutmaßlich desjenigen mit einem effizienteren Transport von Gemcitabin und einem somit besseren Ansprechen). Für diese Überlegungen sprechen Daten aus einer früheren Arbeit der Abteilung Klinische Pharmakologie (Preuß 2009). Dort waren, bezogen auf Genvarianten, Expressionsanalysen an isolierten PBMCs gesunder Probanden durchgeführt worden (siehe Abb. 20). Im Basalzustand ohne weitere Medikamentenzugabe lagen in Anwesenheit des Variantenallels deutlich höhere Transkriptkonzentrationen vor. Bei homozygotem Vorkommen des Variantenallels zeigte sich nahezu einer Verdopplung der *ENT1*-Transkripte.



Abb. 20 Einfluss des Promotor-SNPs rs1057985 auf die basale ENT1-Transkription. Die Abbildung ist einer früheren Dissertation der Abteilung Klinische Pharmakologie entnommen (Preuß 2009). Dort war mittels quantitativer *Real time*-PCR die basale Transkription des ENT1-Gens 6 h nach Gewinnung von PBMCs aus venösem Blut gesunder Spender analysiert worden. Links ist für jede der drei Genotyp-Konfigurationen der Mittelwert (± SEM, *standard error of the mean*) der gemessenen ENT1-Transkripte dargestellt, rechts mit Bezug auf TBP (*tata box-binding protein*) als Referenzgen. Die angegebenen P-Werte wurden mittels linearer Regression ermittelt.

Der zweite ENTI-Polymorphismus, dessen Variantenallel das Überleben in der von mir untersuchten Patientenkohorte günstig beeinflusste, ist rs747199. Diese Variante war vor Entdeckung der längeren Transkriptformen dem Promotor des ENT1-Gens zugeordnet worden (traditionelle Nomenklatur:-706G>C), wird aber heute als Intron 1-Variante geführt. Neben einer tendenziell günstigeren Prognose ging das Variantenallel auch mit einem verstärkten Abfall der Thrombozyten während der ersten sieben Therapietage mit Gemcitabin einher. Dies lässt vermuten, dass es sich hierbei um ein den ENT1-vermittelten Transport steigerndes Allel handelt. Zu dieser Auffassung gelangten auch die Autoren einer Studie, welche basierend auf bioinformatischen Analysen zu Transkriptionsfaktor-Bindestellen Konstrukte mit Genvarianten im 5'-Bereich des ENT1 herstellten und damit Reportergenanalysen durchführten. Eine Kombination dreier Genvarianten mit dem Variantenallel von rs747199 ging in diesen Untersuchungen mit einer erhöhten Transkriptrate einher (Myers et al. 2006).

5.3 Weltweite Verteilung der ENT1-Varianten

Auf Basis genomweiter Daten des "1000 *humane genome*-Projekts" (http://www.1000genomes.org/) können Häufigkeiten einzelner Genvarianten zwischen unterschiedlichen Ethnizitäten verglichen werden. Für die *ENT1*-SNPs rs1057985, rs747199 und rs45573936 ist dies in Tab. 19 aufgelistet.

Dabei fällt auf, dass die in meiner Studie so stark mit dem Sterberisiko bei Pankreaskarzinom unter Gemcitabin-Therapie verbundene Genvariante rs45573936 (Ile216Thr) weltweit selten ist, am häufigsten jedoch bei Kaukasiern mit einer Frequenz von 1,9% für das Thr216-Allel auftritt. Bei gesunden in Göttingen rekrutierten Probanden deutscher Abstammung belief sich dieses Vorkommen sogar auf 2,6% und war damit ähnlich häufig wie bei der Subpopulation von Briten innerhalb der Kaukasier (2,8%). Bei Finnen und Italienern (Toskana) kommt diese Variante mit etwa 1,5% vor. Noch seltener ist sie bei Afrikanern (0,6%) und in Lateinamerika (0,3%). Gar nicht vorhanden scheint sie bei Asiaten (Chinesen und Japaner) zu sein.

Auch bei den anderen beiden betrachteten *ENT1*-Varianten waren deutliche Unterschiede zwischen den ethnischen Gruppen festzustellen. Das Allel von rs1058985, welches in meiner Studie eine bessere Prognose unter der durchgeführten Therapie bedingte, kommt am häufigsten bei Asiaten, am seltensten bei Afrikanern vor. Auch das Variantenallel von SNP rs747199 scheint meinen Daten zufolge mit einer tendenziell längeren Überlebenszeit einherzugehen und ein Bezug zu einer stärkeren *ENT1*-Transkription wurde beschrieben (Myers et al. 2006, siehe oben in Abschnitt 5.2). Dieses Allel ist bei Afrikanern sehr selten, während es bei den anderen Bevölkerungsgruppen eine gleichmäßige Verteilung von etwa 20% hat. Sollte sich die Assoziationen für diese Genvarianten in weiteren klinischen Studien bestätigen, könnten die ethnisch bedingten Disparitäten eine therapeutische Relevanz haben. Asiaten scheinen für die Prognose eines Gemcitabin-therapierten Pankreaskarzinoms die günstigste genetische Konstellation in Bezug auf *ENT1*-Genpolymorphismen zu haben.

Population	Anzahl Personen	rs1057985 C>T (T in %)	rs747199 G>C (C in %)	rs45573936 lle216Thr T>C (C in %)
Afrikaner	246	26,0	0,8	0,6
Asiaten	288	54,3	22,6	0,0
Kaukasier	434	37,0	21,1	1,9
Lateinamerikaner	179	46,9	20,4	0,3

Tab. 19 Häufigkeit der *ENT1*-Varianten rs1057985, rs747199 und rs45573936 bezogen auf Ethnizitäten. Die Angaben basieren auf Daten des 1000 *human genome*-Projekts (http://www.1000genomes.org/) und beziehen sich stets auf das in dieser Arbeit als "seltener auftretend" identifizierte Allel, dessen Vorkommen in % angegeben ist. Unter "Afrikaner" wurden Afroamerikaner der amerikanischen Südstaaten, Yoruba aus Nigeria und Luhya aus Kenia zusammengefasst. Als "Asiaten" zählten die Gruppen der Chinesen (Peking und Südchina) und Japaner. Unter "Kaukasier" wurden Amerikaner europäischer Abstammung, Briten, Iberer, Toskaner, Finnen und Deutsche subsumiert. Letztere entsprechen 153 Probanden aus Vorstudien der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen (Preuß 2009 und Kuschel 2011). Die Gruppe der Lateinamerikaner umfasste Kolumbianer, Puertoricaner und Mexikaner.

5.4 Weitere Genvarianten als mögliche Biomarker für Therapieansprechen

Außerhalb des *ENT1*-Gens zeigten noch einige weitere Varianten einen Einfluss auf die Überlebenszeit unter Gemcitabin bei Pankreaskarzinom. Es werden hier nur diejenigen kurz diskutiert, die auch nach Adjustierung auf die nicht-genetischen Faktoren Alter, Geschlecht, Resektionsstatus (R0 *versus* R1) und Grading eine Assoziation von P < 0,05 aufwiesen. Unter Berücksichtigung multiplen Testens zeigte sich jedoch keine statistische Signifikanz (P > 0,05 unter Anwendung der *False Discovery Rate*). Für die Varianten *DCTD* rs7278, *RRM2* rs4668664 und *RRM2* rs1130609 ist in der Literatur funktionell noch nichts beschrieben. Rs7278 befindet sich in der 3'-UTR von *DCTD* und könnte die Transkriptstabilität (z.B. durch differenzielle Bindung von microRNAs) modulieren. Dies könnte weiter untersucht werden, indem man die RNA-Neusynthese mit Actinomycin D hemmt und somit die biologische Halbwertszeit der *DCTD*-Transkripte in Abhängigkeit von rs7278 bestimmt. Die beiden genannten *RRM2*-SNPs stehen in starkem genetischen Kopplungsungleichgewicht ($r^2 = 0,72$) und sind somit nicht als unabhängig voneinander zu betrachten. Rs1130609 liegt in Exon 1, repräsentiert den Aminosäureaustausch Ser59Ala und könnte somit die Proteinfunktion verändern.

Für die *PTCH1*-Variante rs2236407 zeichnete sich ab, dass Träger des Variantenallels tendenziell früher verstarben als solche mit Homozygotie für das Wildtyp-Allel. Dieser Polymorphismus wurde im Zusammenhang mit dem Risiko der Entwicklung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten bei menschlichen Neugeborenen beschrieben (Letra et al. 2010). Der SNP befindet sich auf Intron 12 des *PTCH1*-Gens (Chromosom 9). Auswirkungen des

Hedgehog-Signalwegs auf das Therapieansprechen von Patienten mit Pankreaskarzinom sind bereits bekannt (Olive et al. 2009): Im Mausmodell führte eine Hemmung dieses Signalwegs zu einer erhöhten Sensitivität von Pankreaskarzinomen auf Gemcitabin. Inwiefern rs2236407 als Genvariante die Expression und/oder Aktivität dieses Signalwegs beeinflusst, bedarf detaillierter funktioneller Untersuchungen. Zuvor sollte aber die in meinen Daten beobachtete klinische Assoziation in einer weiteren Studie mit vergleichbaren Bedingungen bestätigt werden.

Ein Polymorphismus Hedgehog-Signalwegs weiterer des mit Assoziation zum Gesamtüberleben war rs288746 des SHH-Gens (Chromosom 7). Rs288746 wird dem Promotorbereich des Gens zugerechnet. Patienten mit heterozygoter Allelausprägung besaßen verglichen mit Trägern des Wildtyps ein erhöhtes Risiko unter Gemcitabin-Therapie zu versterben (Homozygotie für die Variante lag nur in einem Fall vor). Basierend auf genomweiten Analysen wurde eine Bedeutung von SHH-SNPs, einschließlich rs288746 für das Risiko der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms postuliert (Amundadottir et al. 2009). Diese Publikation beinhaltete eine schnelle Replikationsstudie, in der sich die initial beobachtete Assoziation zu einem höheren Erkrankungsrisiko für Träger des Variantenallels von rs288746 nicht bestätigte. In Anbetracht der Lokalisation dieses SNPs im Promotorbereich des SHH-Gens wäre am ehesten ein Einfluss auf die Transkription plausibel. Dies könnte z.B. durch Reportergenuntersuchungen mit entsprechenden Allel-spezifischen Konstrukten überprüft werden.

5.5 Determinanten der Hämatotoxizität unter Gemcitabin

Eine Abnahme um mehr als 20% gegenüber dem Ausgangswert fand sich während der ersten 42 Therapietage mit Gemcitabin bei 92 (von 104) bzw. bei 97 (107) Patienten hinsichtlich der Leukozyten bzw. Thrombozyten. Ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Hämatotoxizität und der Zeit bis zu deren Eintreten konnte nicht ausgemacht werden. Ebenso wenig war eine Korrelation zwischen dem Nadir für Leukozyten bzw. Thrombozyten und der während 21 Tage unmittelbar zuvor verabreichten Gemcitabindosis zu erkennen. Umso wichtiger erscheinen Biomarker, mit denen sich schwere Blutbildveränderungen im Therapieverlauf vorhersagen lassen. Solche Marker könnten nicht nur schwere Nebenwirkungen vermeiden helfen, sondern auch bei Patienten mit geringer Sensitivität eine Dosiseskalation erlauben. Von den analysierten 86 genetischen Markern in potenziellen Kandidatengenen die Hämatotoxizität Gemcitabin (ENT1-Transporter, für von metabolisierende und katabolisierende Enzyme) zeigten sich für 14 SNPs tendenzielle

Assoziationen mit den *in-vivo*-Parametern für Leuko- und Thrombozytotoxizität. Unter Anwendung der Kriterien für multiples Testen waren diese Befunde jedoch nicht belastbar und bedürfen weiterer Überprüfung.

Weiterhin konnten für die Hypothese, dass im Rahmen einer Zytostatikatherapie häufig diejenigen Patienten profitieren, die besonders schwere Nebenwirkungen erfahren, in meiner Studie keine Belege gefunden werden. Auch bei den nominal signifikanten Assoziationen fanden sich – mit Ausnahme von rs747199 – keine Genvarianten, welche im Hinblick auf eine postulierte Modulation der Gemcitabinempfindlichkeit in gleicher Weise mit Überlebenszeit Hämatotoxizität verbunden Daher und waren. kann vermutet werden. dass Therapieansprechen und Nebenwirkungen einer Gemcitabin-Therapie durch unterschiedliche Biomarker beeinflusst werden.

5.6 Kritische Betrachtung

Für den wesentlichen Befund meiner Arbeit, der Identifizierung von Ile216Thr als möglichen Biomarker für die Prognose eines mit Gemcitabin behandelten Pankreaskarzinoms, ist eine Beziehung zu Gemcitabin auf Grund der Lokalisation dieser Genvariante im Nukleosid-Transporter ENT1 naheliegend. Eine Aussage darüber, ob der beobachtete klinische Effekt tatsächlich in ursächlichem Zusammenhang mit Gemcitabin steht, kann endgültig jedoch nicht getroffen werden. Denkbar wäre eine Beeinflussung des natürlichen Verlaufs der Erkrankung durch diese Genvariante, da für diese Arbeit keine Vergleichsgruppe ohne Gemcitabin-Behandlung (d.h. mit Placebo) zur Verfügung stand. Eine Studie mit Placebo muss aus ethischen Gründen ausgeschlossen werden. Ohnehin erscheint die Frage, ob der Effekt dieser Aminosäurevariante in direkter Beziehung zu Gemcitabin steht, eher theoretischer Natur, da Gemcitabin als Standardtherapie bei Pankreaskarzinom etabliert ist. Neuere Strategien sind typischerweise Add-on-Therapien, d.h. es wird der Zusatz weiterer Substanzen, zumeist Tyrosinkinase-Inhibitoren, zu Gemcitabin erprobt. Für einen direkten Zusammenhang mit Gemcitabin sprechen die *ex-vivo*-Daten einer praktisch kompletten Resistenz von Leukozyten auf dieses Medikament in Gegenwart von Thr216 (Kuschel 2011).

Kritisch zu sehen ist insbesondere, dass der beobachtete Effekt von Thr216 letztlich auf nur fünf Patienten beruht. Dies ist aber der niedrigen Allelfrequenz geschuldet. Angemerkt sei hier noch, dass auch in der initial betrachteten Kohorte von 142 Patienten insgesamt elf das Thr216-Allel aufwiesen und auch hier ein deutlicher Effekt auf das Gesamtüberleben erkennbar war. Eine grundsätzliche Schwierigkeit bei klinischen Assoziationsstudien besteht in der Erfordernis eines möglichst homogenen Patientenkollektivs. Aus dem Patientenpool von 552 Patienten, die wegen des Verdachts auf einen malignen Pankreasprozesses zwischen 2003 und 2010 am Uniklinikum Göttingen behandelt wurden, kam der Großteil für meine Analysen letztlich nicht in Frage. Festzuhalten bleibt, dass trotz der geringen Fallzahl die Assoziation dieser Genvariante so stark war, dass die statistische Signifikanz auch nach Adjustierung auf multiples Testen Bestand hatte.

In letztgenannter Hinsicht mussten Assoziationen sechs weiterer Genvarianten, die nach Korrektur auf nicht-genetische Faktoren eine nominale Signifikanz mit P < 0,05 zeigten, kritisch bewertet werden. Hierzu bedarf es zunächst einer klinischen Bestätigung, um die medizinische Relevanz besser einschätzen zu können und ggf. dann weitergehende molekularbiologische Untersuchungen anzustrengen.

5.7 Ausblick

Auf Grund der starken klinischen (auch nach Korrektur auf multiples Testen) sowie der funktionellen Assoziation von Ile216Thr (in Leukozyten) sollten nun weiterführende Analysen klären, ob sich diese Genvariante tatsächlich auf die Gemcitabin-Empfindlichkeit auswirkt. Um einen eindeutigen Beweis für die Funktionalität von Ile216Thr zu führen, müssen Allel-spezifische Konstrukte, eines mit Ile216 und eines mit Thr216, bei ansonsten identischem genetischem Hintergrund hergestellt werden. Nach Transfektion dieser Konstrukte in Modellzellen könnten vergleichende Toxizitätsversuche durchgeführt werden. Weiterhin wären Prüfungen der Transporterfunktion in Abhängigkeit der Allelkonfiguration denkbar. Wegen der Hypothese eines Effekts auf den Efflux von ENT1 könnten die Zellen mit radioaktiv-markiertem Gemcitabin inkubiert, gewaschen, in Gemcitabin-freiem Medium weiterkultiviert und die intrazelluläre Konzentration des Pharmakons für Ile216 mit Thr216 verglichen werden. Entscheidend im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung wäre die Initiierung einer prospektiven Studie zu Ile216Thr als biologischem Marker. Hierbei müssten Patienten mit Pankreaskarzinom, die sich für eine Gemcitabin-Therapie entscheiden, prätherapeutisch genotypisiert werden. Die Gesamtüberlebenszeit und das progressionsfreie Überleben könnten Studienendpunkte im Sinne des Therapieansprechens sein. In Deutschland findet sich das seltenere Allel Thr216 mit einer Frequenz von 2,5%. Dies lässt von 5% heterozygoten Allelträgern ausgehen. Bei 13000 neuerkrankten Patienten mit Pankreaskarzinom pro Jahr in Deutschland entspricht das etwa 650 Personen. Variantenbedingt hätten diese Patienten per se keinen Benefit von einer Gemcitabin-Chemotherapie zu erwarten. Ihnen könnte stattdessen eine alternative Therapie angeboten werden. Wichtig wäre weiterhin zu überprüfen, ob Thr216 auch die Wirksamkeit von Gemcitabin bei anderen

Tumorentitäten beeinflusst. Zunächst könnten Patientenkohorten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom oder Mammakarzinom retrospektiv dahingehend analysiert werden.

Die Befunde für die anderen Genvarianten mit nominal signifikantem Bezug zum Gesamtüberleben sind im Rahmen dieser Arbeit als explorativ einzuordnen. Für diese Varianten ist eine gezielte Replikation der Befunde an einem vergleichbaren Patientensatz erforderlich. Im positiven Falle wären auch dann weitergehende funktionelle Charakterisierungen anzustellen.

Darüber hinaus liefern die aufwändig erhobenen Nachsorgedaten eine hervorragende Basis zur Prüfung einer Assoziation mit weiteren Genvarianten. Solche Kandidaten könnten z.B. aus Experimenten mit Genom-weit sequenzierten Zellen gewonnen werden, in welchen die Empfindlichkeit auf Gemcitabin bestimmt wird.

6 Zusammenfassung

Jährlich erkranken etwa 13000 Personen in Deutschland an einem Pankreaskarzinom. Therapiestandard ist die Resektion des Tumors und die Gemcitabin-basierte Chemotherapie in adjuvanter und palliativer Intention. Auch unter adäquater Therapie zählt das Pankreaskarzinom mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von weniger als einem Jahr zu den Tumorentitäten mit der schlechtesten Prognose überhaupt. Einige Patienten leben jedoch verhältnismäßig lange, ohne dass man die Gründe dafür kennt. Unter anderem wird ein Einfluss genetischer Varianten vermutet, insbesondere in Genen, welche für die Wirksamkeit von Gemcitabin wichtig sind. Dabei handelt es sich üblicherweise nicht um somatische Tumormutationen. sondern um Keimbahn-Varianten. Letztere kommen in der Allgemeinbevölkerung in unterschiedlicher Häufigkeit vor und haben meist keinen Krankheitswert. Ziel meiner Arbeit war es, den Einfluss solcher Keimbahn-Polymorphismen Genen für Transport (extrazellulär Hedgehog-Signalweg und transmembranäre in Nukleosidtransporter) sowie Metabolismus von Gemcitabin auf Ansprechen und Nebenwirkung (Hämatotoxizität) von Patienten mit Pankreaskarzinom zu prüfen.

Aus 552 Patienten, die zwischen 2003 und 2011 in der Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen wegen einer Pankreaserkrankung behandelt wurden, kamen für meine Studie letztlich 142 in Betracht. Kriterien waren ein histologisch gesichertes adenoduktales Pankreaskarzinom, eine Gemcitabin-haltige Chemotherapie und die Verfügbarkeit von Überlebensdaten. Dazu wurden Pathologie-Berichte und Arztbriefe ausgewertet, sowie Kontakte zu ambulanten Onkologen und Hausärzten hergestellt. Dabei wurden auch die Blutbildverläufe unter Therapie dokumentiert. Aus peripherem Blut dieser Patienten konnten genomische DNA isoliert und daran 109 Polymorphismen in elf Genen mit dem Primerextensions-Verfahren analysiert werden.

Das mediane Gesamtüberleben aller 142 Patienten betrug elf Monate und variierte im Bereich von einem bis 114 Monaten. Ein deutlicher Einfluss auf das Überleben konnte für den Resektionsstatus und das histopathologische Grading des Tumors nachgewiesen werden. Die Genanalysen erfolgten daraufhin an 97 Patienten mit R0/R1-Resektionsstatus. Ein Signifikanzniveau von P < 0,05 mit dem Gesamtüberleben erreichten zunächst in univariater Analyse zehn Varianten in *DCTD*, *RRM2*, *ENT1*, *PTCH1* und *SHH*. Nach Adjustierung auf nicht-genetische Faktoren durch Cox-Regressionsanalyse verblieben davon noch sieben. Wurden diese dann zusammen in einem kombinierten Modell betrachtet, waren es noch drei: Eine Promotorvariante (rs1057985) und eine Aminosäurevariante (rs45573936, Ile216Thr) in *ENT1* sowie ein SNP im Promotorbereich von *SHH*. Nach Adjustierung auf multiples Testen

war ausschließlich die *ENT1*-Aminosäurevariante Ile216Thr statistisch signifikant mit Gesamtüberleben verbunden (P = 0,004). Heterozygote Träger von Thr216 wiesen eine um Faktor 8,8 erhöhte Sterbewahrscheinlichkeit auf. In der deutschen Bevölkerung tragen etwa 5% dieses Allel, d.h. bezogen auf die jährliche Pankreaskarzinom-Inzidenz betrifft dies ca. 650 Personen. Homozygotie für Thr216 fand sich weder in meiner Patientenkohorte noch in den ca. 2000 Individuen des weltweiten Genom-Resequenzierungsprojekts. Frühere in der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführte Studien *ex vivo* mit Gemcitabin behandelter Leukozyten zeigten in Gegenwart von Thr216 eine massiv verminderte Empfindlichkeit auf das Zytostatikum. Das Variantenallel des *ENT1*-SNPs rs1057985 in der Promotorregion des Gens ging mit einer verlängerten Überlebenszeit während der Gemcitabin-Therapie einher. Funktionelle Untersuchungen deuten auf eine verstärkte *ENT1*-Transkription in Gegenwart dieses Allels hin. Dies fügt sich in die durch die Literatur gut belegte Hypothese, dass die Expressionsstärke des *ENT1* eine wichtige Determinante für das Ansprechen auf Gemcitabin ist. Auch der Effekt des SNPs rs288746 im Hedgehog-Liganden *SHH* auf die Überlebenszeit könnte infolge der Lokalisation im

Promotorbereich auf einer transkriptionellen Beeinflussung beruhen; hierzu gibt es jedoch noch keine funktionellen Daten. Im Hinblick auf die Hämatotoxizität von Gemcitabin ließ sich keine Korrelation zwischen den Nadirwerten der Leuko- und Thrombozyten und der Zeitdauer bis zu deren Eintreten innerhalb der ersten 42 Therapietage nachweisen. Eine klare Assoziation der Hämatotoxizität mit den untersuchten Genpolymorphismen zeigte sich nicht. Am kohärentesten stellte sich in diesem Zusammenhang der *ENT1*-SNP rs747199 dar. Träger des Variantenallels tendierten in meiner Kohorte zu mehr Hämatotoxizität unter Gemcitabin und sprachen gleichzeitig etwas besser auf die Therapie an.

Die Bestätigung der Effekte von Ile216Thr in einer prospektiven Studie und den Nachweis einer direkten Funktionalität mittels Allel-spezifischer molekular-genetischer Konstrukte vorausgesetzt, wäre in Zukunft der Einsatz dieser Genvariante als möglicher Biomarker für eine Gemcitabin-basierte Chemotherapie bei Pankreaskarzinom denkbar. Den Patienten mit Thr216 könnten, in Annahme der Wirkungslosigkeit der Therapie, bereits initial alternative Therapiemodalitäten vorgeschlagen werden. Über einen Beitrag zur personalisierten Tumortherapie hinaus können die Ergebnisse meiner Dissertation weitere Forschungsanstrengungen zu einem besseren Verständnis der molekularen Zusammenhänge bei der Gemcitabin-Therapie stimulieren. Dies würde dann zukünftig weitere Optionen der Therapieverbesserung eröffnen.

7 Literaturverzeichnis

Abbruzzese JL, Grunewald R, Weeks EA, Gravel D, Adams T, Nowak B, Mineishi S, Tarassoff P, Satterlee W, Raber MN et al. (1991): A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine. *J Clin Oncol* <u>9</u>(3), 491-498

Achiwa H, Oguri T, Sato S, Maeda H, Niimi T, Ueda R (2004): Determinants of sensitivity and resistance to gencitabine: the roles of human equilibrative nucleoside transporter 1 and deoxycytidine kinase in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* <u>95</u> (9), 753-757

Aksoy P, Zhu MJ, Kalari KR, Moon I, Pelleymounter LL, Eckloff BW, Wieben ED, Yee VC, Weinshilboum RM, Wang L (2009): Cytosolic 5'-nucleotidase III (NT5C3): gene sequence variation and functional genomics. *Pharmacogenet Genomics* <u>19 (8)</u>, 567-576

Albain KS, Nag SM, Calderillo-Ruiz G, Jordaan JP, Llombart AC, Pluzanska A, Rolski J, Melemed AS, Reyes-Vidal JM, Sekhon JS et al. (2008): Gemcitabine plus Paclitaxel versus Paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment. *J Clin Oncol* 26 (24), 3950-3957

Amundadottir L, Kraft P, Stolzenberg-Solomon RZ, Fuchs CS, Petersen GM, Arslan AA, Bueno-de-Mesquita HB, Gross M, Helzlsouer K, Jacobs EJ et al. (2009): Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet* <u>41</u> (<u>9</u>), 986-990

Bailey JM, Swanson BJ, Hamada T, Eggers JP, Singh PK, Caffery T, Ouellette MM, Hollingsworth MA (2008): Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* <u>14 (19)</u>, 5995-6004

Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD (1999): Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* <u>5 (5)</u>, 216-224

Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD (2004): The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* <u>447 (5)</u>, 735-743

Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN et al. (2003): Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* <u>425 (6960)</u>, 846-851

Braakhuis BJ, van Dongen GA, Vermorken JB, Snow GB (1991): Preclinical in vivo activity of 2',2'difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) against human head and neck cancer. *Cancer Res* <u>51 (1)</u>, 211-214

Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P et al. (1997): Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* <u>15 (6)</u>, 2403-2413

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardiere C et al. (2011): FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* <u>364 (19)</u>, 1817-1825

Cunningham D, Chau I, Stocken DD, Valle JW, Smith D, Steward W, Harper PG, Dunn J, Tudur-Smith C, West J et al. (2009): Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* <u>27 (33)</u>, 5513-5518

Dong S, Guo AL, Chen ZH, Wang Z, Zhang XC, Huang Y, Xie Z, Yan HH, Cheng H, Wu YL (2010): RRM1 single nucleotide polymorphism -37C-->A correlates with progression-free survival in NSCLC patients after gemcitabine-based chemotherapy. *J Hematol Oncol* <u>3</u>10

Farrell JJ, Elsaleh H, Garcia M, Lai R, Ammar A, Regine WF, Abrams R, Benson AB, Macdonald J, Cass CE et al. (2009): Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* <u>136 (1)</u>, 187-195

Farrell JJ, Bae K, Wong J, Guha C, Dicker AP, Elsaleh H (2011): Cytidine deaminase singlenucleotide polymorphism is predictive of toxicity from gemcitabine in patients with pancreatic cancer: RTOG 9704. *Pharmacogenomics J*. Epub 2011 May 31. <u>http://www.nature.com/tpj/index.html</u>. DOI: 10.1038/tpj.2011.22

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010): Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* <u>127 (12)</u>, 2893-2917

Gandhi V, Plunkett W (1990): Modulatory activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinosyl nucleosides. *Cancer Res* <u>50 (12)</u>, 3675-3680

Garcia-Manteiga J, Molina-Arcas M, Casado FJ, Mazo A, Pastor-Anglada M (2003): Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine-induced cytotoxicity. *Clin Cancer Res* <u>9 (13)</u>, 5000-5008

Gilbert JA, Salavaggione OE, Ji Y, Pelleymounter LL, Eckloff BW, Wieben ED, Ames MM, Weinshilboum RM (2006): Gemcitabine pharmacogenomics: cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase gene resequencing and functional genomics. *Clin Cancer Res* <u>12 (6)</u>, 1794-1803

Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Buschenfelde C, Friess H, Kleeff J (2010): Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med* <u>7 (4)</u>, e1000267

Giovannetti E, Del Tacca M, Mey V, Funel N, Nannizzi S, Ricci S, Orlandini C, Boggi U, Campani D, Del Chiaro M et al. (2006): Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gencitabine. *Cancer Res* <u>66 (7)</u>, 3928-3935

Giovannetti E, Laan AC, Vasile E, Tibaldi C, Nannizzi S, Ricciardi S, Falcone A, Danesi R, Peters GJ (2008): Correlation between cytidine deaminase genotype and gemcitabine deamination in blood samples. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* <u>27 (6)</u>, 720-725

Gray JH, Owen RP, Giacomini KM (2004): The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* <u>447 (5)</u>, 728-734

Griffiths M, Beaumont N, Yao SY, Sundaram M, Boumah CE, Davies A, Kwong FY, Coe I, Cass CE, Young JD et al. (1997): Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat Med* <u>3 (1)</u>, 89-93

Hamilton SR, Yao SY, Ingram JC, Hadden DA, Ritzel MW, Gallagher MP, Henderson PJ, Cass CE, Young JD, Baldwin SA (2001): Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na+-nucleoside cotransporter rCNT1. *J Biol Chem* <u>276 (30)</u>, 27981-27988

Hart AR, Kennedy H, Harvey I (2008): Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation. *Clin Gastroenterol Hepatol* <u>6 (3)</u>, 275-282

Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Pisters PW, Evans DB, Khan R, Chou TH, Lenzi R et al. (2007): Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol* <u>102 (12)</u>, 2696-2707

Heinemann V, Xu YZ, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W (1990): Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Mol Pharmacol* <u>38 (4)</u>, 567-572

Heinemann V, Xu YZ, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W (1992): Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potentiation. *Cancer Res* <u>52 (3)</u>, 533-539

Heinemann V, Quietzsch D, Gieseler F, Gonnermann M, Schonekas H, Rost A, Neuhaus H, Haag C, Clemens M, Heinrich B et al. (2006): Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* <u>24 (24)</u>, 3946-3952

Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, Rinzel SM, Poore GA, Todd GC, Grindey GB (1990): Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res* 50 (14), 4417-4422

Huang P, Plunkett W (1995): Induction of apoptosis by gemcitabine. *Semin Oncol* <u>22 (4 Suppl 11)</u>, 19-25

Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W (1991): Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* <u>51 (22)</u>, 6110-6117

Humbert M, Casteran N, Letard S, Hanssens K, Iovanna J, Finetti P, Bertucci F, Bader T, Mansfield CD, Moussy A et al. (2010): Masitinib combined with standard gemcitabine chemotherapy: in vitro and in vivo studies in human pancreatic tumour cell lines and ectopic mouse model. *PLoS One* <u>5 (3)</u>, e9430

Innocenti F, Owzar K, Cox NL, Evans P, Kubo M, Zembutsu H, Jiang C, Hollis D, Mushiroda T, Li L et al. (2012): A Genome-Wide Association Study of Overall Survival in Pancreatic Cancer Patients Treated with Gemcitabine in CALGB 80303. *Clin Cancer Res* <u>18 (2)</u>, 577-584

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010): Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 60 (5), 277-300

Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A et al. (2008): Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* <u>321 (5897)</u>, 1801-1806

Kim JH, Karpyak VM, Biernacka JM, Nam HW, Lee MR, Preuss UW, Zill P, Yoon G, Colby C, Mrazek DA et al. (2011): Functional role of the polymorphic 647 T/C variant of ENT1 (SLC29A1) and its association with alcohol withdrawal seizures. *PLoS One* <u>6 (1)</u>, e16331

Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, Sutherland S, Schrag D, Hurwitz H, Innocenti F, Mulcahy MF, O'Reilly E, Wozniak TF et al. (2010): Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol* <u>28 (22)</u>, 3617-3622

Kuschel C: Funktionelle und genetische Variabilität bei der zytotoxischen Wirkung von Nukleosid-Analoga. Untersuchung in menschlichen Leukozyten und lymphoblastoiden Zelllinien. Medizinische Dissertation Göttingen 2011

Lamba JK, Crews K, Pounds S, Schuetz EG, Gresham J, Gandhi V, Plunkett W, Rubnitz J, Ribeiro R (2007): Pharmacogenetics of deoxycytidine kinase: identification and characterization of novel genetic variants. *J Pharmacol Exp Ther* <u>323 (3)</u>, 935-945

Leabman MK, Huang CC, DeYoung J, Carlson EJ, Taylor TR, de la Cruz M, Johns SJ, Stryke D, Kawamoto M, Urban TJ et al. (2003): Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *Proc Natl Acad Sci U S A* <u>100 (10)</u>, 5896-5901

Letra A, Menezes R, Govil M, Fonseca RF, McHenry T, Granjeiro JM, Castilla EE, Orioli IM, Marazita ML, Vieira AR (2010): Follow-up association studies of chromosome region 9q and nonsyndromic cleft lip/palate. *Am J Med Genet A* <u>152A (7)</u>, 1701-1710

Li L, Schaid DJ, Fridley BL, Kalari KR, Jenkins GD, Abo RP, Batzler A, Moon I, Pelleymounter L, Eckloff BW et al. (2012): Gemcitabine metabolic pathway genetic polymorphisms and response in patients with non-small cell lung cancer. *Pharmacogenet Genomics* <u>22 (2)</u>, 105-116

Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, Crawford CR, Cass CE (1998): Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* <u>58 (19)</u>, 4349-4357

Mackey JR, Yao SY, Smith KM, Karpinski E, Baldwin SA, Cass CE, Young JD (1999): Gemcitabine transport in xenopus oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *J Natl Cancer Inst* <u>91 (21)</u>, 1876-1881

Mangravite LM, Lipschutz JH, Mostov KE, Giacomini KM (2001): Localization of GFP-tagged concentrative nucleoside transporters in a renal polarized epithelial cell line. *Am J Physiol Renal Physiol* 280 (5), F879-885

Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA et al. (2007): 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. *J Clin Oncol* <u>25 (15)</u>, 1960-1966

Morinaga S, Nakamura Y, Watanabe T, Mikayama H, Tamagawa H, Yamamoto N, Shiozawa M, Akaike M, Ohkawa S, Kameda Y et al. (2011): Immunohistochemical Analysis of Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 (hENT1) Predicts Survival in Resected Pancreatic Cancer Patients Treated with Adjuvant Gemcitabine Monotherapy. *Ann Surg Oncol.* Epub 2011 Sept 13. <u>http://www.annsurgoncol.org</u>. DOI: 10.1245/s10434-011-2054-z

Myers SN, Goyal RK, Roy JD, Fairfull LD, Wilson JW, Ferrell RE (2006): Functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the human equilibrative nucleoside transporter 1. *Pharmacogenet Genomics* <u>16 (5)</u>, 315-320

Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C et al. (2010): Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association (Jama)* <u>304 (10)</u>, 1073-1081

Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980): Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature* <u>287 (5785)</u>, 795-801

Nybakken K, Perrimon N (2002): Hedgehog signal transduction: recent findings. *Curr Opin Genet Dev* <u>12 (5)</u>, 503-511

Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C et al. (2007): Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association (Jama)* <u>297 (3)</u>, 267-277

Oguri T, Achiwa H, Muramatsu H, Ozasa H, Sato S, Shimizu S, Yamazaki H, Eimoto T, Ueda R (2007): The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 expression predicts nonresponse to generitabine-containing chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* <u>256 (1)</u>, 112-119

Okazaki T, Javle M, Tanaka M, Abbruzzese JL, Li D (2010): Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. *Clin Cancer Res* <u>16 (1)</u>, 320-329

Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D et al. (2009): Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* <u>324</u> (5933), 1457-1461

Osato DH, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Wang J, Ferrin TE, Herskowitz I, Giacomini KM (2003): Functional characterization in yeast of genetic variants in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT1. *Pharmacogenetics* <u>13 (5)</u>, 297-301

Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V (1995): Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentiation. *Semin Oncol* <u>22 (4 Suppl 11)</u>, 3-10

Plunkett W, Huang P, Searcy CE, Gandhi V (1996): Gemcitabine: preclinical pharmacology and mechanisms of action. *Semin Oncol* 23 (5 Suppl 10), 3-15

Preuß A: Funktionelle und genetische Variabilität in Nukleosidtransportern für die Wirksamkeit von Gemcitabin: Retrospektive und prospektive Patientenstudie bei Pankreaskarzinom sowie in-vitro-Untersuchungen an Blutzellen gesunder Spender. Medizinische Dissertation Göttingen 2009

Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R (2010): Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24 (3), 349-358

Rha SY, Jeung HC, Choi YH, Yang WI, Yoo JH, Kim BS, Roh JK, Chung HC (2007): An association between RRM1 haplotype and gemcitabine-induced neutropenia in breast cancer patients. *Oncologist* 12 (6), 622-630

Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, Graham K, Loewen SK, Smith KM, Hyde RJ, Karpinski E, Cass CE, Baldwin SA et al. (2001): Recent molecular advances in studies of the concentrative Na+-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *Mol Membr Biol* <u>18 (1)</u>, 65-72

Robbins DJ, Nybakken KE, Kobayashi R, Sisson JC, Bishop JM, Therond PP (1997): Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal2. *Cell* <u>90 (2)</u>, 225-234

Robert Koch-Institut (Hrsg): Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends.7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2010a

Robert Koch-Institut (Hrsg.): Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin, 2010b

Robert Koch-Institut (2011): Datenbankabfrage www.rki.de vom 28.08.2011

Ryu JS, Shin ES, Nam HS, Yi HG, Cho JH, Kim CS, Kim HJ, Lee JE (2011): Differential effect of polymorphisms of CMPK1 and RRM1 on survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with gencitabine or taxane/cisplatinum. *J Thorac Oncol* <u>6 (8)</u>, 1320-1329

Saif MW (2008): Translational research in pancreatic cancer. Highlights from the "44th ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA. May 30 - June 3, 2008. *Journal of the Pancreas (Jop)* <u>9 (4)</u>, 398-402

Sandler AB, Nemunaitis J, Denham C, von Pawel J, Cormier Y, Gatzemeier U, Mattson K, Manegold C, Palmer MC, Gregor A et al. (2000): Phase III trial of gemcitabine plus cisplatin versus cisplatin alone in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* <u>18 (1)</u>, 122-130

Santini D, Perrone G, Vincenzi B, Lai R, Cass C, Alloni R, Rabitti C, Antinori A, Vecchio F, Morini S et al. (2008): Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) protein is associated with short survival in resected ampullary cancer. *Ann Oncol* <u>19 (4)</u>, 724-728

Santini D, Vincenzi B, Fratto ME, Perrone G, Lai R, Catalano V, Cass C, Ruffini PA, Spoto C, Muretto P et al. (2010): Prognostic role of human equilibrative transporter 1 (hENT1) in patients with resected gastric cancer. *J Cell Physiol* <u>223 (2)</u>, 384-388

Shewach DS, Reynolds KK, Hertel L (1992): Nucleotide specificity of human deoxycytidine kinase. *Mol Pharmacol* <u>42</u>(3), 518-524

Shi JY, Shi ZZ, Zhang SJ, Zhu YM, Gu BW, Li G, Bai XT, Gao XD, Hu J, Jin W et al. (2004): Association between single nucleotide polymorphisms in deoxycytidine kinase and treatment response among acute myeloid leukaemia patients. *Pharmacogenetics* <u>14 (11)</u>, 759-768

Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D, Dabbagh L, Young JD, Dumontet C, Cass C, Lai R, Mackey JR (2004): The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* <u>10 (20)</u>, 6956-6961

Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F, Ruiz IAA (2007): Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* <u>104 (14)</u>, 5895-5900

Storniolo AM, Allerheiligen SR, Pearce HL (1997): Preclinical, pharmacologic, and phase I studies of gemcitabine. *Semin Oncol* 24 (2 Suppl 7), S7-2-S7-7

Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, Kikura-Hanajiri R, Hasegawa R, Maekawa K, Saito Y, Ozawa S, Sawada J, Kamatani N et al. (2007): Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. *J Clin Oncol* <u>25 (1)</u>, 32-42

Sundaram M, Yao SY, Ng AM, Cass CE, Baldwin SA, Young JD (2001): Equilibrative nucleoside transporters: mapping regions of interaction for the substrate analogue nitrobenzylthioinosine (NBMPR) using rat chimeric proteins. *Biochemistry* <u>40 (27)</u>, 8146-8151

Tanaka M, Javle M, Dong X, Eng C, Abbruzzese JL, Li D (2010): Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Cancer* <u>116 (22)</u>, 5325-5335

Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V et al. (2003): Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* <u>425 (6960)</u>, 851-856

Turati F, Galeone C, Edefonti V, Ferraroni M, Lagiou P, La Vecchia C, Tavani A (2012): A metaanalysis of coffee consumption and pancreatic cancer. *Ann Oncol* <u>23</u>(2), 311-318

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2011): Pancreatic cancer. *Lancet* <u>378</u> (9791), 607-620

von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Bodrogi I, Albers P, Knuth A, Lippert CM et al. (2000): Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol* <u>18 (17)</u>, 3068-3077

Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Buchler MW (2004): Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* <u>91 (5)</u>, 586-594

Wolpin BM, Kraft P, Gross M, Helzlsouer K, Bueno-de-Mesquita HB, Steplowski E, Stolzenberg-Solomon RZ, Arslan AA, Jacobs EJ, Lacroix A et al. (2010): Pancreatic cancer risk and ABO blood group alleles: results from the pancreatic cancer cohort consortium. *Cancer Res* <u>70 (3)</u>, 1015-1023

Xu X, Strimpakos AS, Saif MW (2011): Biomarkers and pharmacogenetics in pancreatic cancer. Highlights from the "2011 ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA; June 3-7, 2011. *Journal of the Pancreas (Jop)* <u>12 (4)</u>, 325-329

Yuan Z, Goetz JA, Singh S, Ogden SK, Petty WJ, Black CC, Memoli VA, Dmitrovsky E, Robbins DJ (2007): Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* <u>26</u> (7), 1046-1055

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. J. Brockmöller danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen bei der Überlassung dieses spannenden Themas sowie für die Ermöglichung meiner Dissertation und wissenschaftlichen Tätigkeit in seiner Abteilung.

Herrn Prof. Dr. med. B. M. Ghadimi danke ich für die Förderung dieser Arbeit und die Ermöglichung, auf ein solch umfassendes Patientenkollektiv zurückgreifen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med M. Schirmer für seine kompetente und intensive Betreuung während der gesamten Arbeit. Danke für die stete, tatkräftige Unterstützung, die wertvollen Hilfestellungen bei der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift und die vielen investierten Stunden.

Ich möchte zudem allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen für Hilfe und Beratung bei meiner experimentellen Tätigkeit danken, hier v.a. meinen Mitdoktoranden Herrn C. Zimmer und Herrn S.Roppel.

Weiterhin gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen, insbesondere Herrn Dr. med J. Gaedcke sowie aus der Abteilung Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen Frau Dr. med J. Kitz mein Dank für die konstruktive Zusammenarbeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich für die gute Kooperation und Hilfe bei der Patientennachsorge bei allen beteiligten Arztpraxen und Ambulanzen im Raum Südniedersachsen / Nordhessen, v.a. bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Interdisziplinären Kurzzeitonkologie (IKO) der Universitätsmedizin Göttingen.

Einen besonderen Dank möchte ich an Frau Dr. med. R. Montag richten, die mir bei der Erarbeitung dieser Dissertationsschrift vertrauensvoll mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Lebenslauf

Ich wurde am 21.04.1983 als einziger Sohn der Eheleute Dr. med. Esther Schaudinn (geb. Ullmann) und Dipl. Ing. Siegfried Schaudinn in Erfurt geboren.

Von 1989 bis 1993 besuchte ich die Grundschule Am Schwemmbach in Erfurt. Danach wechselte ich auf das Heinrich-Mann-Gymnasium in Erfurt. Während der Gymnasialzeit verbrachte ich ein Schuljahr an der Caprock Highschool in Amarillo/Texas, USA. 2002 legte ich das Abitur ab.

Anschließend absolvierte ich den Zivildienst im Helios Klinikum Erfurt.

Von Herbst 2003 bis Frühjahr 2004 verfolgte ich das Studium der Kulturwissenschaften an der Europa-Universität Viadrina in Frankfurt an der Oder.

Im April 2004 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Im Jahr 2006 bestand ich erfolgreich das Physikum. Ein Jahr des klinischen Studienabschnitts absolvierte ich an der Universidad Autonoma in Barcelona. Nach zehn Semestern beendete ich den theoretischen Teil des Studiums. Im Anschluss begann ich mit den Arbeiten zu meiner Dissertation als Stipendiat des Graduiertenkollegs 1034 der Universität Göttingen. Von Februar 2009 bis Januar 2010 war ich als PJ-Student in den Abteilungen Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen, Innere des Klinikums Bremen Mitte und Chirurgie des *Hospital Aleman* in Buenos Aires, Argentinien (Lehrkrankenhaus der Universität Buenos Aires) tätig. Das Medizinstudium schloss ich im April 2010 mit dem Staatsexamen an der Universität Göttingen erfolgreich ab und erhielt meine Approbation als Arzt.

Seither arbeitete ich weiter an meiner Dissertationsschrift.