

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

**Identifizierung von Biomarkern für die Prognose der Gemcitabin-Therapie
beim Pankreaskarzinom: RNA-, DNA- und Immunhistochemische-
Analysen**

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von
Christian Zimmer
aus Erfurt

Göttingen 2014

Promotionsgesuch eingereicht am: 04.08.2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Brockmüller

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. V. Ellenrieder

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2015

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS PANKREASKARZINOM	1
1.2	HISTOPATHOLOGIE	3
1.3	THERAPIEOPTIONEN	3
1.4	DAS STANDARDTHERAPEUTIKUM GEMCITABIN	4
1.4.1	Transport zu den Zielzellen	5
1.4.2	Zelluläre Aufnahme	5
1.4.3	Metabolismus	6
1.5	BIOMARKER FÜR DAS THERAPIEANSPRECHEN VON GEMCITABIN	8
1.5.1	Genpolymorphismen in Kandidatengenens	8
1.5.2	Genexpression	10
1.5.3	MicroRNAs	10
1.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	11
2	MATERIAL	13
2.1	CHEMIKALIEN	13
2.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	14
2.3	GERÄTE	15
2.4	PRIMER ZUR GENOTYPISIERUNG VON SLC28A1 UND SLC28A3	17
2.5	LÖSUNGEN UND PUFFER	19
2.6	KITS	19
2.7	ANTIKÖRPER	19
2.8	SOFTWARE	20
3	METHODEN	21
3.1	AUSWAHL DER STUDIENTEILNEHMER	21
3.1.1	Retrospektive Patientenstudie	21
3.2	GENOTYPISIERUNG DER GENVARIANTEN	21
3.2.1	Isolierung und Quantifizierung der genomischen DNA	22
3.2.2	Multiplex-Gradienten-PCR	22
3.2.3	Agarosegelelektrophorese	23
3.2.4	Genotypisierung mit Primer-Extension-Methode (SNaPshot™)	24
3.3	IMMUNHISTOCHEMISCHE METHODEN	26
3.3.1	Kollektiv und Tumormaterial	26

3.3.2	Paraffineinbettung der Tumorresektate	27
3.3.3	Herstellung von Paraffinschnitten	27
3.3.4	Verwendete Antikörper	27
3.3.5	Immunhistochemische Färbung	28
3.3.6	Auswertung der Immunhistochemie	29
3.3.7	Statistische Auswertung des immunoreaktiven Scores	30
3.4	AUSWAHL DER MICRORNAS FÜR DIE EXPRESSIONSANALYSE	30
3.4.1	Gewinnung von miRNA und DNA aus Tumorzellen	30
3.4.2	Synthese der cDNA	31
3.4.3	Nachweis von microRNAs durch quantitative RT- PCR	31
3.5	QUANTIFIZIERUNG UND REINHEITSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	33
3.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG	33
3.6.1	Deskriptive Statistik	33
3.6.2	Analytische Statistik	34
3.7	BIOINFORMATIK	34
3.7.1	Auswahl der Kandidatengene	35
3.7.2	Kriterien zur Auswahl der Genvarianten	35
4	ERGEBNISSE	37
4.1	HOMOGENITÄT DER STUDIENKOHORTEN AUS HEIDELBERG UND GÖTTINGEN	37
4.2	EINFLUSS VON GRADING UND RESEKTIONSSTATUS AUF DIE ÜBERLEBENSZEIT	39
4.3	EINFLUSS DES ALTERS UND DER TUMORAUSBREITUNG AUF DIE ÜBERLEBENSZEIT	40
4.4	KEIMBAHN VARIANTEN IN KANDIDATENGENEN FÜR GEMCITABIN	41
4.5	EINFLUSS DER GENPOLYMORPHISMEN AUF DIE ÜBERLEBENSZEIT	42
4.5.1	Univariate Signifikanzen in der Heidelberger Kohorte	42
4.5.2	Kombinierte Analyse mit nicht-genetischen Einflussfaktoren	42
4.5.3	Vergleich mit der Göttinger Kohorte	44
4.5.4	Überprüfung der stärksten Assoziationen an weiterer Kohorte (HH)	48
4.6	PATIENTENDATEN DER PRÄPARATE FÜR IHC-ANALYSEN	51
4.7	IMMUNHISTOCHEMIE ENT1	52
4.7.1	Zytoplasmatisches ENT1-Protein	53
4.7.2	Nukleäres ENT1-Protein	55
4.7.3	Zellmembran gebundenes ENT1-Protein	57
4.8	IMMUNHISTOCHEMIE RRM2	57
4.8.1	Zytoplasmatisches RRM2	58

4.8.2	Nukleäres RRM2.....	59
4.8.3	Zellmembran-gebundenes RRM2	59
4.9	IMMUNHISTOCHEMIE PTCH1	60
4.9.1	Zytoplasmatisches PTCH1	60
4.10	MICRO-RNA-ANALYSEN	62
4.10.1	Micro-RNA-Expression und Immunhistochemie	62
4.10.2	Genexpression von micro-RNAs in Pankreaskarzinomzellen	62
5	DISKUSSION	65
5.1	ENT1	65
5.1.1	Abhängigkeit des klinischen Outcome von SNP in Promotorregion.....	65
5.1.2	ENT1-Expression wirkt sich auf klinisches Outcome aus.....	67
5.1.3	ENT1-Expression determiniert durch Promotor-SNP.....	68
5.1.4	Prognostische Relevanz der ENT1-Aminosäurevariante?.....	69
5.2	RRM2.....	69
5.2.1	Aminosäurevariante von RRM2 Ala59Ser (rs1130609).....	70
5.2.2	RRM2-Expression und Überlebenszeit.....	71
5.3	HEDGEHOG-SIGNALWEG	71
5.4	MICRORNAS	72
5.5	KRITISCHE BETRACHTUNG.....	72
5.6	AUSBLICK	73
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	75
7	LITERATURVERZEICHNIS	77
8	ANHANG.....	85

Abkürzungsverzeichnis

°	Grad (als Winkelmaß)
°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABCC	<i>ATP-binding cassette C</i>
Ala	Alanin
Asn	Asparagin
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BMI	<i>body mass index</i>
BRCA2	<i>breast cancer gene 2</i> , Brustkrebsgen2
BSA	bovines Serumalbumin, Rinder Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CDA	Cytidineaminase
CDP	Cytidin-Diphosphat
CEA	karzinoembryonales Antigen
CDKN2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> , Cyclin-abhängiger Kinasehemmer 2A
cDNA	komplementäre oder <i>copy</i> DNA
CNT	konzentrativer Nukleosidtransporter
CMPK1	Cytidinmonophosphatkinase 1
Ct	<i>cycle threshold</i> , Anfang des exponentiellen Wachstums
dbSNP	<i>database SNP</i> , innerhalb NCBI-Datenbank
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dCDP	Desoxy-Cytidindiphosphat
dCK	Desoxy-Cytidinkinase
DCTD	Desoxycytidilat-Deaminase
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dFdC	2',2'-Difluorodesoxycytidin, Synonym für Gemcitabin
dFdCDP	Gemcitabin-Diphosphat
dFdCMP	Difluorodesoxyuridin-Monophosphat, Gemcitabin-Monophosphat

dFdCTP	Gemcitabin-Triphosphat
dFdU	2',2'-Difluorodesoxyuridin
dFdUDP	Difluorodesoxyuridin-Diphosphat
dFdUMP	Difluorodesoxyuridin-Monophosphat
dFdUTP	Difluorodesoxyuridin-Triphosphat
d.h.	das heißt
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (Plural)
dTMP	Desoxythymidin-Monophosphat
dROX	Desoxy-6-Carboxy-X-Rhodamin
dUMP	Desoxyuridin-Monophosphat
EDTA	<i>ethylen diamin tetraacetic acid</i>
ENTs	äquilibrierende Nukleosidtransporter (Plural)
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
exp	<i>expected</i> , erwartet (Anzahl)
ExoI	Exonuklease I
FAST-AP	<i>thermosensitive alkaline phosphatase</i>
FFPE	<i>formalin-fixed, paraffin-embedded</i> , formalinfixiert in Paraffin eingebettet
FL	Fragmentlänge
g	Gramm
G	Guanin
GÖ	Göttingen
Gln	Glutamin
GV	Genotypverteilung
h	<i>hour</i> , Stunde
hCNT1-3	humaner konzentrativer Nukleosidtransporter 1-3
hENT1-4	humaner äquilibrierender Nukleosidtransporter 1-4
HD	Heidelberg
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor 2
HH	Hamburg
HIED	Hitze-induzierte Epitopdemaskierung
IHC	Immunhistochemie

Ile	Isoleucin
Ins	Insertion
inkl.	inklusive
IRS	immunreaktiver Score
k	Kilo
K	Kalium
kb	Kilobasen
kg/m ²	Kilogramm pro Quadratmeter
KI	Konfidenzintervall
k-ras	<i>kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LD	<i>linkage disequilibrium</i> , Kopplungsungleichgewicht
Lys	Lysin
m	Meter
M	mol/l
MAF	<i>minor allele frequency</i> , Frequenz des selteneren Allels
mg	Milligramm
mg/m ²	Milligramm pro Quadratmeter
min	Minuten
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
miRNA	MikroRNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDPKs	Nukleosid-Diphospho-Kinasen (Plural)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NT5Cs	5'-Nukleotidasen (Plural)
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
p	Signifikanzniveau
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PTCH1	<i>patched 1</i>
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson

r ²	Bestimmtheitsmaß
rho	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	<i>realtime</i> -Polymerasekettenreaktion, Echtzeit-PCR
RRM1/RRM2	Unterformen der Ribonukleotid-Reduktase
rs-Nummer	<i>reference SNP</i> -Nummer
s	Sekunde
S.	Seite
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
SLC29A1	<i>solute carrier family 29 member 1</i> (Nukleosidtransporter); Synonym zu ENT1-Transporter
SLC28A1	<i>solute carrier family 28 member</i> , Synonym zu CNT1 Transporter
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid- Polymorphismus
SMAD4	<i>mother against decapentaplegic homolog 4</i>
SMO	<i>smoothened</i>
SYBR Green	Cyanin-Farbstoff zum Nachweis von doppelsträngiger DNA
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TK2	Thymidin Kinase 2
TNM	Tumor-Klassifikation nach Tumorausbreitung (T), Lymphknotenbefall (N), Metastasierung (M)
TS	Thymidylat Synthase
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	<i>units</i> (Einheit für Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
UTR	<i>untranslated region</i> , nicht abgelesener Bereich auf der mRNA
UV	ultraviolett
V	Volt
Var	Varianten-Allel

Q-Lösung	Reagenz zur Verbesserung der PCR-Bedingungen
qRT-PCR	quantitative <i>realtime</i> Polymerasekettenreaktion
χ^2 -Test	Chi-Quadrat-Test
5-FU	5-Fluorouracil

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Einteilung der Tumorstadien des Pankreaskarzinoms laut UICC.....	2
Tab. 2 Primerliste für die Genotypisierung von CNT1+3.....	18
Tab. 3 Reaktionsansatz für Multiplex-Gradienten-PCR mit Q-Lösung.....	23
Tab. 4 Thermocyclerprotokoll für Multiplex-Gradienten-PCR.	23
Tab. 5 Reaktionsansatz zur enzymatischen Aufreinigung von PCR-Produkten	25
Tab. 6 Reaktionsansatz für die SNaPshot TM -Reaktion.....	25
Tab. 7 Thermocycler Protokoll zur SNaPshot TM -Reaktion.	25
Tab. 8 Zuordnung der Fluoreszenzfarbstoffe zu den ddNTPs.....	25
Tab. 9 Verwendete miRNA-Primer mit Katalog-Nummer der Herstellerfirma Qiagen.....	32
Tab. 10 Bestimmte mi-RNA-Referenzgene mit Primersequenz.....	32
Tab. 11 Reaktionsansatz einer SYBR [®] Green RT-PCR	33
Tab. 12 Taq-Man-Protokoll für die quantitative RT-PCR	33
Tab. 13 Allgemeine und klinische Charakteristika der Patientenkohorten aus GÖ und HD... ..	38
Tab. 14 Einfluss von SNPs und nicht-genetischen Faktoren auf die Überlebenszeit	44
Tab. 15 Weitere Replikationsstudie (HH) für die oben assoziierten Genvarianten	50
Tab. 16 Allgemeine und klinische Charakteristika des IHC-Kollektivs.....	51
Tab. 17 Korrelation der ENT1-Expression zwischen den Zellkompartimenten	52
Tab. 18 Wechselbeziehungen der RRM2-Expression zwischen den Zellkompartimenten.	58
Tab. 19 Einfluss der Expressionshöhe von miRNAs in Karzinomzellen auf das Überleben....	63
Tab. 20 Charakteristika der untersuchten Genpolymorphismen in der HD-Kohorte	85

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Transport, Metabolismus, Wirkmechanismus und Potenzierung von Gemcitabin	7
Abb. 2 Agarosegelelektrophorese bei Etablierung des SLC28A-Assays	24
Abb. 3 Elektropherogramm der SNaPSHOT TM -Reaktion	26
Abb. 4 Funktionsprinzip der immunhistochemischen Färbung.	29
Abb. 5 Untersuchte Kandidatengene mit Anzahl der bestimmten Genpolymorphismen	35
Abb. 6 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Resektionsstatus	39
Abb. 7 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom histopathologischen Grading (G2 und G3). .	40
Abb. 8 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Vorliegen von Fernmetastasen	41
Abb. 9 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Promotorvariante ENT1-rs1057985.....	46
Abb. 10 Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Aminosäurevariante ENT1-rs45573936....	46
Abb. 11 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Genvariante SLC28A1-rs4980346	47
Abb. 12 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Promotorvariante DCTD-rs5016499	47
Abb. 13 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Genvariante RRM2-rs1130609	48
Abb. 14 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Genvariante PTCH1-rs2236407	48
Abb. 15 Beispiel für die vier Kategorien der zytoplasmatischen ENT1-Färbeintensität.....	53
Abb. 16 Zytoplasmatische ENT1-Expression in Abhängigkeit der immunreaktiven Scores	54
Abb. 17 Relation zwischen Überlebenszeit und ENT1-Expression im Tumorzellzytoplasma	55
Abb. 18 Nukleäre ENT1-Expression in Abhängigkeit der immunreaktiven Scores.....	56
Abb. 19 Relation zwischen Überlebenszeit und nukleärer ENT1-Expression in Tumorzellen	56
Abb. 20 Zellmembranöse ENT1-Expression in Abhängigkeit der immunreaktiven Scores .	57
Abb. 21 Bildbeispiel für die vier Kategorien der zytoplasmatischen RRM2-Färbeintensität .	58
Abb. 22 Zytoplasmatische RRM2-Expression in Abhängigkeit der immunreaktiven Scores.....	59
Abb. 23 Membranöse RRM2-Expression in Abhängigkeit der immunreaktiven Scores	60
Abb. 24 Beispiel für die vier Kategorien der zytoplasmatischen PTCH1-Färbeintensität	61
Abb. 25 Zytoplasmatische PTCH1-Expression in Abhängigkeit der immunreaktiven Scores	61
Abb. 26 Tumordifferenzierung in Abhängigkeit der miR141- und 200c-Genexpression	63
Abb. 27 Tumorausbreitung in Abhängigkeit der miR200c, 21 und miR34a-Genexpression ..	64
Abb. 28 Gesamtüberleben in Abhängigkeit der ENT1-Promotorvariante rs1057985	66
Abb. 29 Gesamtüberleben in Abhängigkeit der ENT1-Expression	67
Abb. 30 Überleben in Abhängigkeit der ENT1-Expression und der Genvariante rs1057985.	69
Abb. 31 Gesamtüberleben in Abhängigkeit der RRM2-Aminosäurevariante rs1130609	70

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist mit steigender Inzidenz nach Kolon- und Magenkarzinom der dritthäufigste Tumor des Verdauungstraktes. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland belief sich 2013 auf 18,3 von 100.000 Personen, damit sind 3,5% aller Krebsneuerkrankungen Pankreaskarzinome. Verantwortlich für die steigenden Inzidenzen ist der demographische Wandel in Deutschland. Mit zunehmendem Alter steigt die Häufigkeit, am Pankreaskrebs zu erkranken, exponentiell an. Das mittlere Erkrankungsalter von Frauen liegt bei 76 Jahren, das von Männern bei 70 Jahren. Beide Geschlechter haben mit 1,5% ein identisches Lebenszeitrisiko für diese Erkrankung (Robert Koch-Institut et al. 2012). Die jährliche Inzidenz entspricht der krankheitsbedingten Mortalität. Damit hat das Pankreaskarzinom die ungünstigste Prognose aller gastrointestinalen Tumoren. Von 1980 bis 2004 sind die Neuerkrankungs- und Sterberaten bei Frauen um 17% und bei Männern um 6% angestiegen, wohingegen die Überlebensraten sich nur marginal verbessert haben. Das Pankreaskarzinom weist die niedrigsten Überlebensraten unter allen Krebserkrankungen auf. Das erste Jahr nach Diagnosestellung überleben nur 20% der Patienten, die absolute 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Frauen bei 6% und für Männer bei 7% (Robert Koch-Institut et al. 2010).

Die schlechte Prognose der Erkrankung wird durch den über lange Zeit klinisch inapparenten Verlauf bedingt. Durch fehlende Frühsymptome werden Pankreaskarzinome häufig erst in weit fortgeschrittenen, meist kurativ inoperablen Stadien diagnostiziert. Ikterus (zu 25% auch Frühsymptom), starke gürtelförmige Oberbauchschmerzen, rätselhafte Thrombosen, Aszites oder ein neu aufgetretener Diabetes mellitus deuten auf ein weit fortgeschrittenes Tumorstadium hin. Pankreaskarzinome zeichnen sich durch eine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung aus, etwa zwei Drittel der Tumoren sind bei Diagnosestellung bereits metastasiert. Metastasen finden sich häufig in den lokoregionären Lymphknoten, der Lunge, dem Leberparenchym und dem Peritoneum.

Die Diagnosestellung des Pankreaskarzinoms erfolgt mit bildgebenden Verfahren wie der Computertomographie, der Sonographie oder bei unklarer Cholestase durch eine ERCP (endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie). Bei Patienten mit einer inoperablen oder metastasierten Erkrankung kann zur Sicherung der Diagnose eine perkutane Feinnadelaspirationszytologie durchgeführt werden.

Die Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms erfolgt nach UICC basierend auf der TNM-Klassifikation (Tab. 1). Die Therapieoptionen sind vom jeweiligen Tumorstadium (0 bis IV) abhängig.

Stadium 0	Tis, N0, M0
Stadium IA	T1, N0, M0
Stadium IB	T2, N0, M0
Stadium IIA	T3, N0, M0
Stadium IIB	T1,2,3, N1, M0
Stadium III	T4, Jedes N, M0
Stadium IV	Jedes T, Jedes N, M1

Tab. 1 Einteilung der Tumorstadien des Pankreaskarzinoms laut UICC.

Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie des Pankreaskarzinoms noch ungeklärt. Es wird von einem Zusammenspiel mehrerer Risikofaktoren ausgegangen. Hinlänglich bekannt sind Alter, männliches Geschlecht und afroamerikanische Rassenzugehörigkeit. Etwa 5-10% der Pankreaskarzinome sind hereditär bedingt. Mit einem erhöhten Pankreaskrebsrisiko assoziierte Syndrome bzw. Erkrankungen sind u.a. das Peutz-Jeghers-Syndrom und die hereditäre Pankreatitis. Für einen Patienten mit Peutz-Jeghers-Syndrom liegt das relative Risiko bei 132, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Giardiello et al. 2000).

Tabakkonsum wird für etwa 20% der Pankreaskarzinome verantwortlich gemacht. Personen, die aktuell rauchen, haben ein 1,74-fach höheres Risiko (Duell 2012). Ferner sind Adipositas (BMI ≥ 30 kg/m²), Diabetes Typ I und II, fleisch- und fettreiche Ernährung oder *Helicobacter pylori*-Infektionen mit einem höheren Risiko verbunden (Freitas et al. 2009). Das Vorhandensein der Blutgruppe 0 wirkt sich hingegen protektiv aus (Amundadottir et al. 2009). Verglichen mit der Blutgruppe 0 haben Patienten mit A, B, AB ein 1,4-fach erhöhtes Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Wolpin et al. 2010).

Die Rolle von Alkoholkonsum bei der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms wird kontrovers diskutiert. Zahlreiche Studien konstatieren, dass chronisch starker Alkoholkonsum oder Rauschtrinken das Risiko allenfalls moderat erhöht (Michaud et al. 2001; Duell 2012). Kein Einfluss ließ sich von Kaffee- oder Teekonsum ableiten (Genkinger et al. 2012).

Zahlreiche molekulare Mechanismen sind in der Pathogenese nach gegenwärtiger Lehrmeinung des als nicht-hereditär betrachteten Pankreaskarzinoms von Bedeutung. Im Bereich der kodierenden Sequenzen liegen im Mittel 63 somatische Mutationen vor (Jones et al. 2008; Jones et al. 2009). Dabei besteht in mehr als 90% der Fälle eine aktivierende Mutation des K-Ras-Onkogens. Häufig involviert ist auch eine Inaktivierung von Suppressorgen wie CDKN2A, p53, SMAD4 und BRCA2 (Freitas et al. 2009).

1.2 Histopathologie

Etwa 92% aller Pankreastumoren sind vom exokrinen Pankreas ausgehende duktale Adenokarzinome. Diese befinden sich zu 70% im Kopf, zu 25% im Korpus und zu 5% im Schwanz. Histopathologisch präsentieren sich diese durch eine überwiegend gute Differenzierung von schleimbildendem Drüsenepithel mit Einbettung in ein makroskopisch sichtbares, derbes Bindegewebsstroma. Histologische Varianten davon sind das adenosquamöse Karzinom, das anaplastische Karzinom, das muzinöse Adenokarzinom und das Siegelringzellkarzinom. Davon abzugrenzen sind nicht-duktales Adenokarzinome (intraduktales papilläres muzinöse Neoplasie, muzinöses Zystadenokarzinom, seröses Zystadenokarzinom) sowie Azinuszell-Neoplasien. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden ausschließlich Karzinome mit adenoduktalem Charakter untersucht, wobei nicht zwischen den histologischen Subformen unterschieden wurde. Bei den meisten duktales Adenokarzinomen gelingt der immunhistochemische Nachweis von CA 19-9 und CEA Tumormarkern. Als Verlaufsparemeter besitzt der Biomarker CA 19-9 die höchste Spezifität (Bhat et al. 2012).

1.3 Therapieoptionen

Der einzig kurative Ansatz ist die radikale Entfernung des Tumors mit anschließender adjuvanter Chemotherapie. Durch die Infiltration von Arterien (Truncus coeliacus, Arteria mesenterica superior) und die frühe Metastasierung sind lediglich 15-20% der Tumoren einem kurativen Therapieansatz zugänglich. Eine radikale Resektion des Tumors ist daher im Allgemeinen den UICC-Stadien I-III vorbehalten. Nach erfolgreicher Operation wird in der Regel eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Standardtherapeutikum hierfür ist gegenwärtig das Nukleosidanalogen Gemcitabin (Oettle et al. 2007), welches ebenfalls in palliativer Situation (UICC-Stadium IV) zum Einsatz kommt.

Studien belegen, dass durch eine Zytostatikatherapie mit Gemcitabin eine Verlängerung des Gesamtüberlebens und Verbesserung der Lebensqualität (z.B. Schmerzreduktion) von Patienten mit weit fortgeschrittenen Tumoren erreicht werden kann (Burris et al. 1997; Louvet et al. 2005). Eine kombinierte Therapie mit Gemcitabin und dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib kann eine zusätzliche Verlängerung der Überlebenszeit bewirken (Senderowicz et al. 2007). Die Kombinationstherapie ist einer Gemcitabin-Monotherapie bezüglich der Verlängerung des Gesamtüberlebens im Median von 5,91 auf 6,37 Monate überlegen (Moore et al. 2007). Dabei weist die Entwicklung eines

Hautausschläges unter Erlotinib (im 1./2. Behandlungsmonat) auf ein besseres Therapieansprechen hin (Wacker et al. 2007). Die supportive Gabe des monoklonalen Antikörpers Bevacizumab brachte in Studien keinen weiteren Überlebensvorteil (Kindler et al. 2010; Ko et al. 2010).

Eine denkbare Alternative für das metastasierte Pankreaskarzinom ist die Therapie mit Folfirinox, einer Kombination von Fluorouracil, Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin. In einer vielversprechenden Studie war die mediane Überlebenszeit deutlich länger als unter einer Gemcitabin-Monotherapie (11,1 Monate *versus* 6,8 Monate; Conroy et al. 2011). Wegen der erhöhten Toxizität bietet sich eine Therapie mit Folfirinox nur für Patienten mit gutem Allgemeinzustand an.

Als weitere Option gilt einer aktuellen Studie zufolge die neoadjuvante Gemcitabin-haltige Radiochemotherapie, wobei der radiosensibilisierende Effekt dieser Substanz ausgenutzt wird. Auf diese Weise konnten etwa ein Drittel der Pankreaskarzinome, die primär als irresektabel eingestuft wurden, sekundär erfolgreich reseziert werden. Ein R0-Status konnte in 39,2% und ein R1 in 41,2 % der Fälle erreicht werden. Dabei lag das mediane Überleben von Patienten mit R0-resezierten Tumoren bei 22,1 Monaten und damit signifikant höher als bei nicht-resezierten 11,9 Monate (Habermehl et al. 2012).

1.4 Das Standardtherapeutikum Gemcitabin

Gemcitabin (Cytidin mit zwei Fluor-Substituenten; 2',2'-Difluorodesoxycytidin; dFdC) ist ein Nukleosid-Analogon und stellt eine stark hydrophile Substanz dar.

Die S3-Leitlinie 2007 (Adler et al. 2007) sieht entsprechend randomisierten Studienergebnissen nach R0- bzw. R1-Resektion des Pankreastumors eine additive Chemotherapie mit Gemcitabin über eine Behandlungsdauer von sechs Monaten vor (Oettle et al. 2007). Besteht eine palliative Situation, ist die Erstlinientherapie (siehe Kapitel 1.3) eine Monotherapie mit Gemcitabin, wobei die Behandlungsdauer dem individuellen Zustand des Patienten angepasst wird. Die empfohlene Einzeldosis beträgt in der Regel 1000 mg/m² Körperoberfläche und wird als 30-minütige Kurzinfusion einmal wöchentlich für einen Zeitraum von drei Wochen mit anschließender einwöchiger Therapiepause verabreicht (Adler et al. 2007). Eine häufige und nicht zu unterschätzende Nebenwirkung der Chemotherapie ist die Myelosuppression. Daher ist vor jeder Einzelgabe die Kontrolle der Thrombo- und Leukozytenzahlen obligat. Die nachfolgenden Unterkapitel fokussieren sich auf wichtige Mechanismen, die den Transport von Gemcitabin im Blut und über die Zellmembran sowie dessen Metabolismus beeinflussen und Gegenstand vorliegender Untersuchungen waren.

1.4.1 Transport zu den Zielzellen

Die Verteilung von Gemcitabin im Blut erfolgt nahezu unabhängig von einer Plasmaprotein-Bindung. Die Plasmaspitzen-Konzentration wird etwa fünf Minuten nach Infusionsende erreicht. In Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Verteilungsvolumen beträgt nach Fachinformation des Herstellers die Plasma-Halbwertszeit zwischen 42 und 92 Minuten. Ein Großteil des Gemcitabins wird, bevor es in die Zielzellen gelangt, durch die in Blut, Leber und Nieren vorkommende Cytidin-Deaminase (CDA) zu dem zytotoxisch inaktiven Metaboliten 2',2'-Difluordeoxyuridin (dFdU) umgesetzt (Abbruzzese et al. 1991). Die Verfügbarkeit von aktivem Gemcitabin am gewünschten Wirkort wird zudem durch eine verstärkte Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs vermindert, u.a. ausgelöst durch eine gesteigerte Expression von Sonic-Hedgehog (SHH) in den Pankreaskarzinomzellen (Thayer et al. 2003). SHH dient als Ligand für das Patched-Transmembranprotein (PTCH1) und bewirkt eine Aufhebung des repressiven Effekts von PTCH1 auf Smoothed (SMO; Stone et al. 1996). Als Folge werden verstärkt Proliferationsgene transkribiert (Scales und de Sauvage 2009), die u.a. zu einer peritumoralen Bindegewebsvermehrung (Bailey et al. 2008) führen. Folge ist eine Verlangsamung des regionalen Blutflusses. Angesichts der relativ kurzen Plasma-Halbwertszeit von Gemcitabin reduziert sich auf diese Weise der Anteil von biologisch aktiver Substanz, welche bis zu den Tumorzellen gelangt. Umgekehrt konnte im Mausmodell durch Inhibierung des Hedgehog-Signalwegs die lokale Verfügbarkeit von Gemcitabin und damit das Tumoransprechen verbessert werden (Bailey et al. 2008).

1.4.2 Zelluläre Aufnahme

Aufgrund der geringen passiven Permeabilität des stark hydrophilen Gemcitabins durch die Zellmembran muss es über Nukleosidtransporter in die Zellen aufgenommen werden (Mackey et al. 1998). Beim Menschen sind insgesamt sieben Nukleosidtransporter in der Literatur beschrieben, drei konzentrierende (hCNT1-3) und vier äquilibrierende, bidirektionale Transporter (hENT1-4).

Für den Transport des Pyrimidin-Analogons Gemcitabin sind insbesondere der ubiquitär vorkommende äquilibrierende bidirektionale hENT1 (Garcia-Manteiga et al. 2003) sowie die im Pankreas relativ stark exprimierten konzentrativen natriumabhängigen hCNT1 und hCNT3 (Gray et al. 2004b) von Bedeutung. Zellen mit gering exprimierten hENT1 waren in Zellkultur gegenüber Gemcitabin nahezu resistent (Mackey et al. 1998). Anhand immunhistochemischer Analysen konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von hENT1 in Tumorproben von Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas die

Prognose bei Gemcitabin-Therapie verbessert. Das spiegelte sich in einem verlängerten rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben wider (Marechal et al. 2009; Farrell et al. 2009; Spratlin et al. 2004).

1.4.3 Metabolismus

Gemcitabin stellt ein Prodrug dar, das intrazellulär zu den zytotoxischen Nucleotiden Gemcitabin-Diphosphat (dFdCDP) und Gemcitabin-Triphosphat (dFdCTP) phosphoryliert wird. Letzteres wird durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu Deoxy-Cytidin während der DNA-Synthese eingebaut und führt zum Abbruch der Kettenverlängerung. Weitere aktive Metabolite hemmen kompetitiv Enzyme der Nucleinsäuresynthese und führen über zellinterne Prozesse zur Apoptose-Induktion. In Zellkultur zeigten mit Gemcitabin behandelte Zellen eine 1000fach verringerte Wachstumsaktivität (Hertel et al. 1990). Die zytotoxisch aktiven Metabolite dFdCDP und dFdCTP entstehen über enzymatisch vermittelte Phosphorylierungsschritte (Abb. 1). Zunächst wird durch die Enzyme Desoxycytidinkinase (dCK) und – in geringerem Umfang – Thymidin Kinase 2 (TK2) zu Gemcitabin-Monophosphat (dFdCMP) phosphoryliert (Mini et al. 2006). Die weiteren Phosphorylierungen zu dFdCDP und dFdCTP wird durch Cytidinmonophosphat Kinase (CMPK1) und Nucleosid-Diphospho-Kinasen (NDPKs) vermittelt.

In der Phosphorylierungskette stellt die dCK das Geschwindigkeits-limitierende Enzym dar. Der Metabolit dFdCDP hemmt Ribonucleotidreduktasen (RRM1/RRM2) irreversibel (Smid et al. 2001) und blockiert damit die *de novo*-Synthese von natürlichen Desoxynucleotiden für die Replikation und DNA-Reparatur. Durch den dCTP-Mangel wird vermehrt dFdCTP in DNA und RNA eingebaut. Ein Einbau von dFdCTP in die RNA führt zum vollständigem Stillstand der Synthese (Ruiz van Haperen et al. 1993). Die Inkorporation von dFdCTP in den wachsenden DNA-Strang erfolgt durch Polymerase α und führt nach Einbau eines weiteren Nucleotids zum Abbruch der Kettenverlängerung (Heinemann et al. 1988). Man spricht in diesem Zusammenhang vom maskierten Kettenabbruch, wodurch sich dFdCTP erfolgreich den zellulären Reparaturmechanismen entzieht und Apoptose-Mechanismen induziert (Huang und Plunkett 1995). Weiterhin aktiviert eine Verminderung des Angebots an Desoxycytidintriphosphat (dCTP) über einen negativen Feedbackmechanismus die dCK und führt damit zu einer vermehrten Phosphorylierung von Gemcitabin (Bergman et al. 2002). Dies wird als eine sich selbst potenzierende Wirkung des Gemcitabins bezeichnet.

Bei der Inaktivierung spielen neben der oben bereits erwähnten Degradierung von Gemcitabin durch CDA vor allem Enzyme eine Rolle, die auf der Stufe des Monophosphats dFdCMP angreifen. Dazu gehören 5'-Nucleotidasen (NT5Cs), die der dCK-vermittelten Phosphory-

lierung entgegenwirken und die Desoxycytidilat-Desaminase (DCTD), deren Aufgabe es ist dFdCMP zu Difluorodesoxyuridin-Monophosphat (dFdUMP) umzusetzen. Das dFdUMP hemmt die Thymidylat-Synthase, woraus ein Mangel an Desoxythymidin-Monophosphat (dTMP) resultiert und auch auf diese Weise die natürliche DNA-Synthese gehemmt wird (Bergman et al. 2002). Andererseits wird DCTD durch dFdCTP inhibiert, was über eine Akkumulierung von dFdCMP wiederum zum oben beschriebenen Selbstpotenzierungs-Mechanismus der Gemcitabin-Wirkung beiträgt.

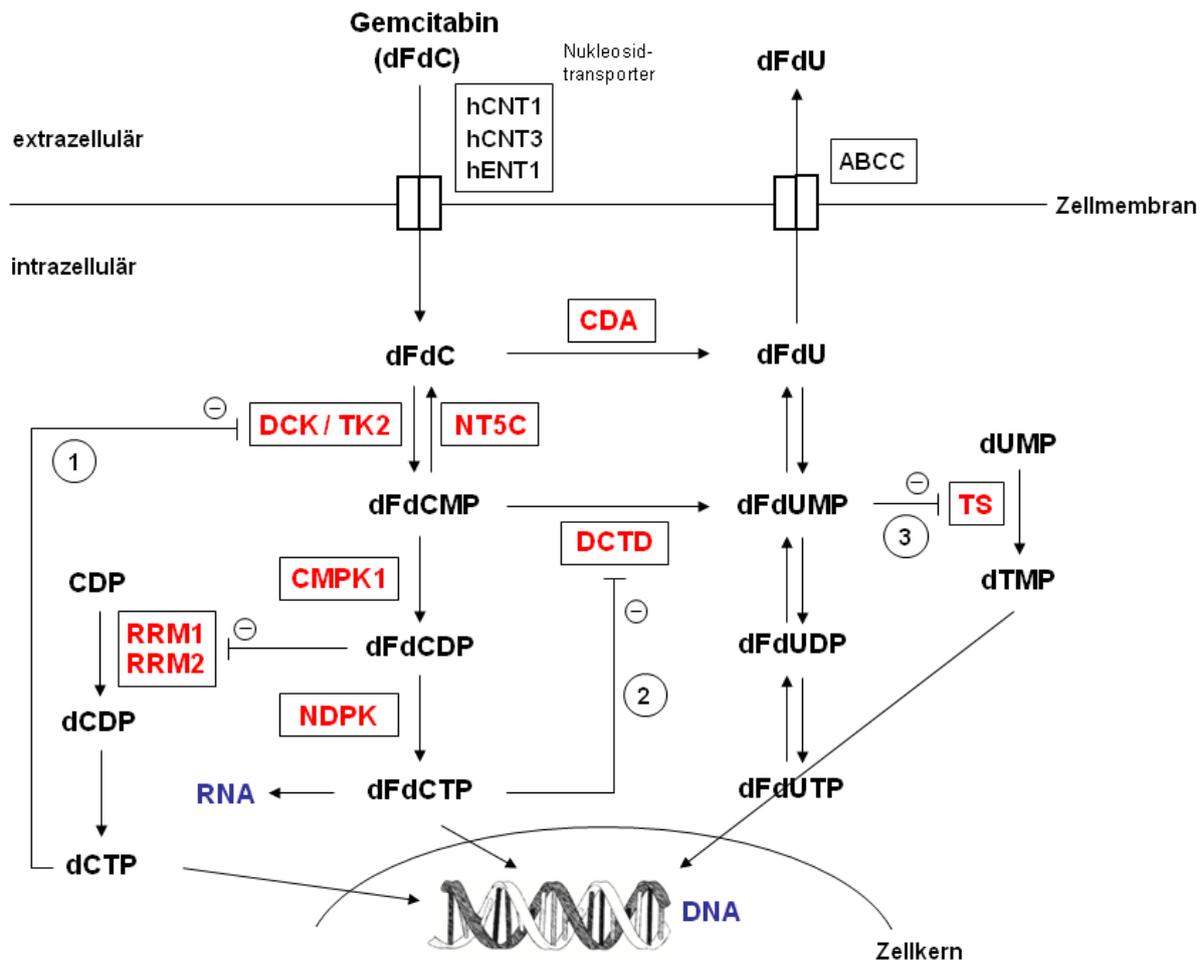


Abb. 1 Transport, Metabolismus, Wirkmechanismus und Selbstpotenzierung von Gemcitabin. Metaboliten von Gemcitabin: 2',2'-Difluorodesoxyuridin (dFdU), Difluorodesoxyuridin-Monophosphat, (dFdUMP), Difluorodesoxyuridin-Diphosphat (dFdUDP), Difluorodesoxyuridin-Triphosphat (dFdUTP), Gemcitabin-Monophosphat (dFdCMP), Gemcitabin-Diphosphat (dFdCDP), Gemcitabin-Triphosphat (dFdCTP) Nukleotide: Cytidin-diphosphat (CDP), Desoxycytidin-Diphosphat (dCDP), Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP), Desoxythymidin-Monophosphat (dTMP), Desoxyuridin-Monophosphat (dUMP). Transport: hENT1- humaner äquilibrerender Nucleosidtransporter, hCNT1/3- humaner konzentrativer Nucleosidtransporter, ABCC -ATP-binding cassette C, Metabolismus: CDA- Cytidineaminase, dCK- Desoxycytidinkinase, TK2- Thymidin Kinase 2, NT5C- 5' Nucleotidase, CMPK1- Cytidinmonophosphat Kinase 1, NDPK- Nucleosid-Diphospho-Kinasen, DCTD- Desoxycytidilat-Desaminase, RRM1/2- Ribonucleotidreduktase 1/2, TS- Thymidylat Synthase. 1-3 Selbstpotenzierungsmechanismen (eigene Grafik)

1.5 Biomarker für das Therapieansprechen von Gemcitabin

Das Ansprechen auf die Gemcitabin-Therapie beim Pankreaskarzinom unterliegt einer starken, zurzeit noch weitgehend ungeklärten, interindividuellen Variabilität. Daher sind Biomarker, die prätherapeutisch eine Aussage über das Therapieansprechen zulassen, im Sinne einer personalisierten Medizin von enormer Bedeutung. Als Kandidaten für derartige Biomarker wurden in der vorliegenden Arbeit genetische Polymorphismen sowie an Paraffinschnitten analysierte Expressionen von Protein und micro-RNA in Bezug auf eine Beeinflussung der Überlebenszeit untersucht.

1.5.1 Genpolymorphismen in Kandidatengen

Neben den oben bereits angesprochenen somatischen Mutationen im Mittel 63 in der kodierenden Sequenz (Jones et al. 2008) hat eine Pankreastumorzelle die Keimbahn-Variabilität ihres Wirtes geerbt. Daher ist es naheliegend, dass Genpolymorphismen der Keimbahn-DNA für den Verlauf der Erkrankung und insbesondere auch für den Therapieerfolg (z.B. Transport und Metabolismus von Gemcitabin) bedeutsam sind.

In einem ersten Genom-weiten Ansatz zur Identifizierung potenzieller Biomarker wurden mittels eines Arrays über 500,000 *Loci* bei 352 Patienten auf Assoziation mit dem Gesamtüberleben getestet (Innocenti et al. 2012). Nach Adjustierung auf Stratifizierungsfaktoren (Abstammung, Behandlungsarm) verfehlte jedoch auch die stärkste Assoziation in der genannten Studie die Signifikanzschwelle für Genom-weites Testen.

Eine alternative Herangehensweise besteht in der selektiven Untersuchung von Polymorphismen in Kandidatengen, die mechanistisch in einem Zusammenhang mit der Gemcitabin-Wirkung stehen. Diese Methode liefert zwar nur Informationen über die ausgewählten *Loci*, ist jedoch Hypothesen-getrieben und das Problem des multiplen Testens ist um einige Größenordnungen kleiner. Solche Gene betreffen den Transport und Metabolismus vom Gemcitabin und den Hedgehog-Signalweg (1.4).

Aus der Gruppe dieser Gene wurde CDA in Bezug auf Keimbahn-Genpolymorphismen am intensivsten untersucht; dieses Gen kodiert für die Cytidin-Deaminase, welche Gemcitabin inaktiviert. Der Einfluss des bei Kaukasiern vorkommenden CDA-Aminosäureaustausches Lys27Gln auf die Enzymaktivität wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Funktionelle Studien berichteten über eine verminderte (Gilbert et al. 2006) bzw. verstärkte Aktivität (Giovannetti et al. 2008) bei Vorliegen des Gln27-Allels. Eine stärkere Enzymaktivität von Gln27, einhergehend mit weniger Hämatotoxizität, aber auch schlechterem Überleben wurde bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, bei einer Therapie mit Gemcitabin

und Cisplatin beschrieben (Tibaldi et al. 2008 und Tibaldi et al. 2012). Passend dazu wurde bei Monotherapie des Pankreaskarzinoms mit Gemcitabin von einer erhöhten Rate an schweren Blutbildstörungen bei Vorliegen des Lys27-Allels berichtet, war hier jedoch ohne Auswirkungen auf die Überlebenszeit (Farrell et al. 2012). Unklar ist auch, ob sich dieser Polymorphismus auf die *Clearance* von Gemcitabin im Plasma auswirkt (Maring et al. 2010; Joerger et al. 2012). Ein zweiter CDA-Polymorphismus, der Aminosäureaustausch Ala70Thr, wurde bei Asiaten ebenfalls intensiv untersucht (Sugiyama et al. 2007; Yonemori et al. 2005; Ueno et al. 2009), kommt aber bei Kaukasiern kaum vor (Sugiyama et al. 2009). Ziemlich sicher dürfte sein, dass die Plasmaspiegel an CDA invers mit dem Therapieansprechen korrelieren (Tibaldi et al. 2012; Ueno et al. 2011). Ob und ggf. welche Genpolymorphismen daran beteiligt sind, ist noch unklar. Für das Gemcitabin-Monophosphat degradierende Enzym DCTD wurde bei rekombinanter Expression das Asp58-Allel (Asn58Asp) mit einer vermehrten Proteinbildung und einem Trend zu höherer Enzymaktivität in Verbindung gebracht (Gilbert et al. 2006). Für weitere am Metabolismus von Gemcitabin beteiligte Gene ist die Datenlage in der Literatur noch spärlich. Zuletzt wurde über zwei Polymorphismen in der anabolen CMPK1 berichtet, welche den Therapieerfolg von Gemcitabin bei Pankreaskarzinom beeinflussen könnten (Woo et al. 2012).

Bei der zellulären Aufnahme von Gemcitabin stehen die Nukleosidtransporter SLC29A1 (=ENT1), SLC28A1 (=CNT1) und SLC28A3 (=CNT3) im Vordergrund. Beim ENT1 wird vermutet, dass nicht ein einzelner SNP für eine erhöhte Expression verantwortlich ist, sondern dass mehrere SNPs in der Promotorregion eine gesteigerte ENT1-Transkription bewirken (Myers et al. 2006). Eine abgeschlossene Dissertation im Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen erbrachte starke Hinweise auf eine medizinische Bedeutung von zwei Polymorphismen des ENT1-Transporters (Schaudinn 2013): dem Aminosäureaustausch Ile216Thr und einem Polymorphismus in der Promotorregion. Das Thr216-Allel war zuvor bei *in vitro*-Untersuchungen an T-Lymphozyten durch eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Gemcitabin aufgefallen (Kuschel 2011).

Die konzentrativen Nukleosidtransporter (CNTs) sind hochkonserviert, das gilt insbesondere für den CNT3 (Badagnani et al. 2005; Damaraju et al. 2005). Beim CNT1-Transporter konnte *in vitro* eine veränderte Affinität gegenüber Gemcitabin für den Polymorphismus Val189Ile (rs2290272) aufgezeigt werden (Gray et al. 2004a). Insgesamt gibt es jedoch nur wenige Daten über die genetische Variabilität in den CNTs hinsichtlich einer klinischen Relevanz bei der Therapie mit Gemcitabin.

Abgesehen von der beschriebenen generellen Bedeutung des Hedgehog-Signalwegs für die Gemcitabin-Therapie bei Pankreaskarzinom (Olive et al. 2009) ist über eine mögliche genetische Modulation dieser Prozesse kaum etwas bekannt.

1.5.2 Genexpression

Ein Beispiel für den klinischen Einsatz eines Genexpressionsparameters stellt die Überexpression des Rezeptors HER2/neu bei Mammakarzinom dar, wovon die Gabe von Trastuzumab abhängig gemacht wird (Vogel et al. 2002). Beim Pankreaskarzinom ist ein vergleichbarer Parameter für die Gemcitabin-Therapie noch nicht etabliert. Am aussichtsreichsten erscheint dabei der ENT1. Mehrere Studien weisen übereinstimmend auf ein verlängertes Überleben hin, wenn der ENT1 in Tumorzellen sowohl auf Protein- als auch RNA-Ebene überdurchschnittlich exprimiert war (Giovannetti et al. 2006; Spratlin et al. 2004; Marechal et al. 2009; Farrell et al. 2009; Morinaga et al. 2012).

In vitro bedeutete eine geringe Aktivität des ENT1-Transportes eine hohe Gemcitabin-Resistenz (Mackey et al. 1998). Weniger einheitlich ist die Datenlage für andere Komponenten des Gemcitabin-Transports oder –Metabolismus. Eine Überexpression von RRM2 soll *in vitro* mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Gemcitabin einhergehen (Duxbury et al. 2004). Diese Hypothese stützen zwei Studien, in denen Patienten mit einer niedrigen RRM2-Expression signifikant länger überlebten (Itoi et al. 2007; Fujita et al. 2010). Andere Studien hingegen sprechen RRM2 jegliche prognostische Relevanz ab (Giovannetti et al. 2006; Xie et al. 2012). Eine Ursache für eine ineffektive Gemcitabin-Therapie wird in der Überexpression von SHH, einem Liganden im Hedgehog-Signalweg, gesehen.

1.5.3 MicroRNAs

Die aus 19-24 nicht-kodierenden Nukleotiden bestehenden microRNAs (miRNAs) sind für die posttranskriptionale Genexpression verantwortlich (He und Hannon 2004). MicroRNAs sind in der Lage, die Proteinbiosynthese durch Modulation der Stabilität von mRNAs - meistens wirken sie degradierend- zu beeinflussen. Derzeit wird in einer Vielzahl von Studien untersucht, ob miRNAs als prognostische Marker für die Gemcitabintherapie beim Pankreaskarzinom von Bedeutung sein könnten. In dieser Hinsicht konnten einige miRNAs identifiziert und in ihrer Funktion charakterisiert werden. Eine Schlüsselrolle bei der epithelial-mesenchymalen-Transformation und damit bei der Metastasierung von Tumorzellen scheint die miRNA-200-Familie (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141,

miR-429) einzunehmen (Gregory et al. 2008). Gemcitabin-resistente Zelllinien zeigten eine geringe Expression der miRNAs 200b und 200c (Ali et al. 2010; Li et al. 2009).

In einer klinischen Studie war eine hohe miR200c-Expression in makrodisseziertem Pankreaskarzinom-Gewebe signifikant mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert (Yu et al. 2010). Im Gegensatz dazu scheint sich eine geringe miR21-Expression im Tumorgewebe positiv auf die Gesamtüberlebenszeit bei Gemcitabin-haltiger Therapie auszuwirken (Hwang et al. 2010). Mit pre-miRNA-21 transfizierte Zellen zeigten unter Gemcitabin eine höhere Proliferations- und geringere Apoptoserate (Giovannetti et al. 2010). Eine weitere Bedeutung als potentieller Biomarker wird miR10b zugesprochen. Patienten mit geringer miR10b-Expression sprachen besser auf einen multimodalen, Gemcitabin-haltigen neoadjuvanten Therapieansatz an, hatten eine geringere Metastasierungsrate und längere eine Überlebenszeit (Preis et al. 2011). In humanen Pankreaskarzinomzellen ist die Zellzykluskontrolle u.a. durch vollständigen oder teilweisen Verlust des Tumorsuppressor-Proteins p53 gestört. Dies bedingt, dass DNA-Reparatur und Apoptoseinduktion erschwert sind. Eine Reaktivierung der Funktionen von p53 scheint durch das Einbringen von miR34 in Tumorzellen möglich (Ji et al. 2009); diese miRNA wird direkt durch p53 reguliert und vermittelt eine Vielzahl seiner tumorsuppressiven Effekte.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bestätigung bereits identifizierter und die Exploration neuer Biomarker für das Ansprechen einer Gemcitabin-Therapie bei Pankreaskarzinom. Deren prätherapeutischer Einsatz würde unter Berücksichtigung der molekularbiologischen Konstellation des einzelnen Patienten den Behandlungserfolg im Vorfeld kalkulierbarer machen.

Zunächst sollen an zwei weiteren Patientenkohorten die zuvor gefundenen Assoziationen von Genpolymorphismen und Therapieüberleben überprüft werden. Da diese Voruntersuchung insbesondere die Bedeutung des ENT1-Transporters nahelegt, werden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die weiteren, für den Transport von Gemcitabin in Frage kommenden Gene analysiert. Beim Einschluss von Patienten in die Untersuchungen wurde auf eine histopathologische (Grading, adenoduktales Karzinom) und klinische (Resektionsstatus) Homogenität geachtet. Bei mit dem Überleben assoziierten Polymorphismen wurde ein Zusammenhang mit der Proteinexpression der entsprechenden Gene immunhistochemisch untersucht. Aus denselben Paraffinblöcken wurden die Expressionsstärken von – basierend auf der Literatur –ausgewählten micro-RNAs bestimmt und deren Wertigkeit für das Über-

leben und ein möglicher Zusammenhang mit den zuvor erhobenen genetischen und immunhistochemischen Parametern beurteilt. Im Einzelnen werden folgende Fragestellungen beantwortet:

1. Haben zuvor identifizierte Genpolymorphismen als potenzielle Biomarker (Schaudinn 2013) auch in zwei weiteren Kohorten mit 93 und 124 Patienten einen signifikanten Einfluss auf das Überleben einer Gemcitabin-haltigen Chemotherapie bei Pankreaskarzinom? Welchen Einfluss haben dabei Alter, histologisches Grading, Resektions- und TNM-Status?
2. Welche Rolle kommt der genetischen Variabilität in weiteren, unter 1. noch nicht untersuchten, für Gemcitabin transportierenden Genen zu?
3. Ist auch in den untersuchten Kohorten eine Beziehung zwischen immunhistochemisch bestimmter ENT1-Expression und Überlebenszeit nachweisbar und damit ein weiterer Meilenstein zu dessen klinischer Implementierung als Biomarker gegeben? Inwieweit ist dabei die Proteinexpression in den einzelnen Zellkompartimenten (Zellmembran, Zytosol, Kernmembran) untereinander verknüpft? Eignet sich darüber hinaus, auf Basis der Ergebnisse unter 1., die Proteinexpression weiterer Gene in Tumorzellen als prognostischer Parameter?
4. Lassen sich die in der Literatur beschriebenen, zum Teil im Kontext von Gemcitabin und Pankreaskarzinom-Zelllinien erhobenen Befunde für micro-RNAs in der vorliegenden klinischen Kohorte bestätigen?

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose <i>Ultra Pure</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Anodenpuffer (für Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt
Albumin fraction	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Darmstadt
Citronensäure Monohydrat	Merck, Darmstadt
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse	Dako, Glostrup, Dänemark
DNA 1 kb-Größenstandard	Rapidozym, Berlin
DNA 100 bp-Größenstandard	Rapidozym, Berlin
DNA Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Set	ABgene, Epsom
EDTA 0,5 M in wässriger Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (1% in H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Exonuklease I	Fermentas, St. Leon-Rot
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneScan™ LIZ® 120 Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
GENESCAN® 400 HD[ROX] Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
HiDi-Lösung (enthält Formamid)	Applied Biosystems, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat Dihydrat	Merck, Darmstadt
PCR-Primer (Design nach gewünschter Sequenz, siehe Anhang)	MWG-Biotech, Ebersberg
Polymer POP7	Applied Biosystems, Darmstadt
Primerpaare (vorgefertigt für <i>real-time</i> PCR, Bestellnummer im Anhang)	Qiagen, Hilden
Q Solution	Qiagen, Hilden
RNase Zap	Ambion, Austin, USA
TaqMan® Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt

Chemikalie

Top Taq-DNA-Polymerase
 Tris 100 %
 Verdünnungspuffer für Antikörper
 Xylol

Hersteller

Qiagen, Hilden
 Roth, Karlsruhe
 Zytomed Systems, Berlin
 Merck, Darmstadt

2.2 Verbrauchsmaterialien**Verbrauchsmaterial**

Handschuhe, Nitratex, puderfrei
 Kimtech Science Labortücher
 Mikroschraubröhrchen (2 ml)
 PCR Softtubes Flachdeckel,
 PCR-Folien (Adhesive PCR Foil Seals)
 Pinzetten
 Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
 Pipettenspitzen RNase-, Dnase-frei
 (0,1- 10 µl, 10- 100 µl, 100- 1000 µl)
 Platten, transparent für MTT-Assay (96-Well)
 Platten, Thermo fast 96-Well
 Platten, Thermo fast 384-Well
 Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)
 Röhrchen 50 ml
 Sequenzierplatte
 Skalpell, Präzisa, Figur 10
 Softasept, Desinfektionsmittel
 Spitzen für Multipipette plus
 (Combitip plus 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 ; 2,5 ; 5 ml)
 Streifen, Flat cap strips (8er) für PCR-Platten
 SuperFrost® Plus
 Disposable Filter-Tips 1000 µl für Qiacube
 TaqMan Adhesive Optical Covers
 Rotor Adapters (10 x 24) für Qiacube

Hersteller

Ansell GmbH, München
 Kimberly-Clark, Surrey, UK
 Sarstedt, Nümbrecht
 Biozym, Hessisch Oldendorf
 Thermo, Waltham, USA
 neoLab, Heidelberg
 Sarstedt, Nümbrecht
 Kisker, Steinfurt
 Sarstedt, Nümbrecht
 Abgene, Epsom
 Abgene, Epsom
 Sarstedt, Nümbrecht
 Sarstedt, Nümbrecht
 Applied Biosystems, Darmstadt
 Dahlhausen, Köln
 Braun, Melsungen
 Eppendorf, Hamburg
 Abgene, Epsom
 Menzel, Braunschweig
 Qiagen, Hilden
 Applied Biosystems, Darmstadt
 Qiagen, Hilden

2.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Accu-jet [®]	Brand, Wertheim
3130XL Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
96 Well Plate Base	Applied Biosystems, Darmstadt
96 Well Plate Retainer	Applied Biosystems, Darmstadt
96 Well Plate Septa	Applied Biosystems, Darmstadt
Biofuge fresco 17	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Biophotometer 6313	Eppendorf, Hamburg
BioRobot [®] EZ1	Qiagen, Hilden
ComPhor L Mini-Gelkammer	Biozym, Hessisch Oldendorf
Dampfgarer Multi Gourmet	Braun, Kronberg
DNA Engine PTC 200 Thermal Cycler (96er & 384er)	MJ Research/BioRad. Hercules, USA
Einwegklingen für Microtom	Microm, Walldorf
Eppendorf Research und Reference [®] Pipetten 0,1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research [®] 8 Kanal Pipette 10 µl	Eppendorf, Hamburg
TaqMan ABI PRISM 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Tiefkühlschrank VIP Series -86°C	Sanyo Electric Co Ltd., Japan
Thermomixer 5436	Eppendorf Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf Hamburg
Feinwaage BL 610	Sartorius, Göttingen
Fluor-S [™] MultiImager	BioRad, München
Labelguard [™] Microliter Cell	Implen, München
Magnetrührer (IKAMAG RET)	IKA, Staufen
Mastercycler Gradient (96er & 384er)	Eppendorf, Hamburg
Microtom HM400R	Microm, Walldorf
Mikrowelle MWS 2820	Bauknecht, Schorndorf
Mikroskop	Olympus
Multifuge x3r Centrifuge	Thermo, Waltham, USA
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
MS 2 Minishaker	IKA, Staufen

Gerät	Hersteller
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Vertikal-Autoklav KSG 40/60	KSG, Olching
Vertikal-Autoklav: FV für Sterilgut	Tecnorama, Fernwald
Vortex Genie 2	New York, USA
Wärmeschrank FP	Binder, Tuttlingen
QIAcube	Qiagen, Hilden
Qualitron® Microcentrifuges	Fairport, USA
Zymed Mosaic MSP 9500	Invitrogen, USA
Microtom HM400R	Microm, Walldorf

2.4 Primer zur Genotypisierung von SLC28A1 und SLC28A3

GEN rs-Nummer	PCR Primer, vorwärts (3'→5')	PCR Primer, rückwärts (3'→5')	FL (bp)	PP	SNaPshot –Primer, (5'→3')	SP
SLC28A1						
rs7173860	GGTGCCGGTACTAGCAAGTATTTATGCATC	CTTCCAGGAAGCCACCTATGTGATTATTTTC	457	6	CCATCTAGTGAGAAAGGGAGATAGAG	H
rs3743162	TCTGCCTGGAACCTCCAGAGTTCA	TTGGCCACAGGTGTGAGAGAGATG	475	7	CCCAGACCTTCCAGCTGAAA	H
rs7182385	ATGAGGCTGTGCAGACAGCAAGTG	AAAGTGTCTCCACCCCAAACCTCA	131	7	CCCACCCCAAACCTCATGC	H
rs1545471	GGCCTCCTTACACATCTCCCTCACA	CGCCAGAGAGTTCTCCATGACACAG	579	7	(GACT) ₂ GCTACTGTGCCAAAAAGTAGTTAGGA	G
rs17215836	"	"	"	7	(GACT) ₄ GCCAAAGCTGAGGAGGTTTCT	G
rs12914194	TGCTTGTCACATATGCTCAGCTTGGT	ACTAGCACTCACTGCGCAATGATG	475	7	GTCAAATGAAGCCAGAGAC	G
rs1545470	"	"	"	7	(GACT) ₉ ACTCTGCTGTGCTGTTTCTC	G
rs2290272	"	"	"	7	(CTGA) ₆ CTAGGCAAAGAGGAGAGCGA	G
rs8187758	GCCCATCCCTCAAGGAACCTGAAC	ACCCAGCCTCTGGAAAGACTACTCTATTG	399	7	(GACT) ₈ CCACATACCTACCCGGATCT	G
rs4247408	"	"	"	7	TTGGGACCTCAGTACCAGGC	G
rs16974612	CAGTGGTGGCAAAAAACTTTGAAGTTG	GGGGGAGGCTGAATAAAATGTTGTG	277	6	(TGAC) ₁₁ TGGTCCAGGAATTTGTCCAG	G
rs11853372	AACAGGAAATCAGGAGGCGTAGCTAGG	GCCAGAAAGTGAAGGGACTCATCTC	85	7	AACAGGAAATCAGGAGGCGTAGCTAGG	H
rs4980347	CCCATTGTGAAGTGGCGACAGTTAC	AAGGTCCCTGTGGCCAATATCATCTTAC	245	7	CAGTTACATCCACCACAGATGCT	H
rs4980346	"	"	"	7	(CTGA) ₅ CTAGCTGCTGCCCTGTTCTG	G
rs12910476	CCTGTCGACGCCATGTTCCCTATTC	GCGTAACCTCCGGTCATGACAAC	660	7	GAAGCCCTTCATTACTCATTACAGTATC	G
rs12910991	"	"	"	7	(CTGA) ₆ CTGGGTCTGTACTTGGCTGAGCT	H
rs3803390	"	"	"	7	ACATGACACTCTCTGAAGTCCA	H
rs4248928	GGAAAAACAGCAAAGCCTGTCTGTGTAG	TGTCCTGCCCTCCCATTTATCAGTC	317	6	(TGAC) ₂ TTGAGTGTAGGTCATAAGACCCCC	H
rs12915914	CGCACATCCCTCCTATTGCTAATATC	CTTTCCACCCATGTAATCAATATAAAACTATC	199	6	(TGAC) ₃ TTGAGCACTTGAATGAGGCTAGTC	G
rs2242048	GTTCTGGCTGTGCTGGACTTTATC	TGAAGCACCACCTTCAGTGTGTCTCAG	528	6	(ACTG) ₆ GAGACATGGTGGACATCCA	H
rs2242046	"	"	"	6	(ACTG) ₆ GAGATCCACTGCTTCCTGT	H

GEN rs-Nummer	PCR Primer, vorwärts (3'→5')	PCR Primer, rückwärts (3'→5')	FL (bp)	PP	SNaPshot –Primer, (5'→3')	SP
SLC28A3						
rs10868154	GCACACATATGTTTCATTGCAGCACTGT	GGGGTACTTTGAGGGCTCATGTGA	505	7	(GACT) ₆ GTTAACAACAGCAAAGACATGGACTC	G
rs10868152	CCTCACAAAACCCTAAGAGGCTCTGAGA	ACGTCAGGCCAATACTAATCCAAATCAAC	252	7	(GACT) ₃ GAAGTCAGACTGCCTGGTTCTAATC	H
rs11140542	ACCCAGCCTCTGCATTTTCTCTGAAC	ATGAGCAACGGTGCCAGTCAAC	398	7	CTAGACTAATATGTGGGTGTTTATGCTGTAGT	H
rs4266723	GTGGAATGCTAGGCCACTGGAATAAAC	TGAGAAATGGGAATACTCACTCTGCTGATAG	124	6	(ACTG) ₂ ATTGGTTTCCTAAGTGATTTTACCAATF	H
T						
rs17087144	CTCAAGAATGCACTTCTCTGGAAGATTCTTGT	AGCCTCTAGGGCTCTGTCACTGTTTCAGTAG	174	6	(GACT) ₅ TTCCTGGAAGATTCTTGTATCCATA	G
rs17343066	CGCTCGGCTGGAGCTTCTTATATTC	TCTCTGAGATGCCATGGAAGTGACTTG	204	6	(GACT) ₃ CCCTAAAAATAAGTCTAGGTGTGATCAT	G
rs12004882	GTACAGGCCAAACCAAATCTTGAACCTA	GGCATGCTGGCAACTCCATAGTC	105	7	CTGTACAGGCCAAACCAAATCTTGAACCTA	H
rs11140525	GGGCCTCATTCTCTGTGCTTCTAATTTG	ATCATTGGTTTATGCAGCAGGTATCACAAC	198	6	ATCATTGGTTTATGCAGCAGGTATCACAAC	G
rs10735568	AAGGCGTGGTCACATTGCTCTCAG	CAAACCTGGCTCTAGTTTCCCGTTACTGTTT	173	7	AAGGCGTGGTCACATTGCTCTCAG	G
rs10122651	TCTTTTCTTCCCTTCAAGTAGCCTTC	GAGTGTGTACCCGAAGGAGAAAACCTAAAG	628	6	(GACT) ₆ CATACAAATGATAAACGGAGAAATTATG	G
A						
rs10780660	ATGATTGTGGGAGTCAAGGGAGATTTGTAG	GCAGTGAAAGTACCCCAAGTTACCTGCTATC	131	6	GCAGTGAAAGTACCCCAAGTTACCTGCTATC	H
rs7867504	CCCTCAGGGCTTGGCACACTTATTC	GTGCCGAAGAGTTGTTTGTGTTTCCCTAC	299	6	(TGAC) ₃ TTTTGTGTTTCCCTACAGAAACCACATAC	H
rs4585823	CGACCCATAGAGCTTACAAGCCACACATAG	GCATTCCCCAGATGATCCACTCAAG	227	6	(GACT) ₄ CCTCTTCTACTAATTGGCACTCC	H
rs7853758	GTGGCCAACATCGCTGTGAATC	CAGGACAGGGCTGAATTCATAAAAGACA	71	7	CAGGACAGGGCTGAATTCATAAAAGACA	G
rs56350726	AACAGCTTTATGGTTGCCAGACTCATAGGTT	TGGGTCCACCTTCTTCTCAAGTG	107	6	AACAGCTTTATGGTTGCCAGACTCATAGGTT	G

Tab. 2 Primerliste für die Genotypisierung von CNT1+3. Die untersuchten Polymorphismen wurden mit ihrer rs-Nummer entsprechend der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) nach Genen geordnet aufgelistet. Die Spalten 2 und 3 beinhalten die Vorwärts- und Rückwärts-Primer für die Multiplex-PCR in jeweils 5'-3'-Richtung. Die Fragmentlänge (FL) des PCR-Produktes wurde in Basenpaaren (bp) angegeben. Die Spalte „PP“ gibt anhand der Ziffern 6 und 7 die Zuordnung zum jeweiligen Multiplex-PCR-Pool an. In der vorletzten Spalte ist die Sequenz der SNaPshot-Primer angegeben, mit denen der endgültige Nachweis der einzelnen Polymorphismen erfolgte. Für die Genotypisierung wurden zwei unterschiedliche SNaPshot-Primer-Pools gemäß der Zuordnung G und H in Spalte „SP“ verwendet. Die Primerlisten für die Genotypisierung der übrigen Gene CMPK1, DCTD, RRM1, RRM2, DCK, NT5C3, CDA, SHH, PTCH1, SMO, ENT1 sind einer früheren Dissertation der Abteilung Klinische Pharmakologie zu entnehmen (Schaudinn 2013).

2.5 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Abkürzung	Masse
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer), als 10x konzentriert hergestellt, mit HCl auf pH 8.3 eingestellt	Tris	1 M
	Borsäure	1 M
	EDTA	30 mM
TE-Puffer, pH 7.5 und 8,0, eingestellt mit HCl	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
TBS Waschpuffer, pH 7.4, eingestellt mit HCl	Tris	0.05 M
	NaCl	0.15 M
Citratpuffer, pH 6.0, eingestellt mit HCl	Citronensäure	0.1M
	Natriumcitrat	0.1M
BSA (bovines Serumalbumin)	4g auf 200 ml TRIS Puffer	

2.6 Kits

Kits	Hersteller
Allprep DNA/RNA FFPE Kit	Qiagen, Hilden
EZ1 DNA Blood 350µl Kit	Qiagen, Hilden
miScript II RT Kit	Qiagen, Hilden
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
SNaPshot™ Multiplex Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden

2.7 Antikörper

Antikörper	Hersteller
RRM2 Maus monoklonal (ab115701)	Abcam, Cambridge, UK
PTCH1 Kaninchen polyklonal (ab39266)	Abcam, Cambridge, UK
ENT1 Maus monoklonal (MC-9777)	MBL International Corporation, USA

2.8 Software

Adobe Illustrator CS3: Bildbearbeitung

Adobe Photoshop CS3: Bildbearbeitung

Avery Dennison Design Pro5: Etikettendruck

3100 Data Collection Software Version 1.0 (Applied Biosystems): Computer-Sequenzierer Kommunikation und Datensammlung

GeneMapper® Software (Applied Biosystems) v3.7: Auswertung von DNA Fragmentlängenanalysen des Sequenzierers

HaploView-Software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>): Analyse und Visualisierung von Daten aus genetischen Datenbanken

MS Office 2007: Textverarbeitung, Präsentationen und Tabellenkalkulation

Phase-Software (Version 2.1): Software zum Berechnen der Haplotypen

Quantity One S Version 4.2.1 (BioRad): Auswertung von Gelläufen mit Bestimmung von Fragmentlängen

SDS 2.1 (Applied Biosystems): Auswertung von Expressionsmessungen des TaqMan 9100 HT

SPSS Version 20: Statistik und Analyse von erhobenen Messdaten

Zymed Mosaic Immunosteuern Programm: Programmierung des Antikörperfärbroboters

2.9 Datenbanken

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

Verzeichnis, in dem die zahlreiche Genotypen des menschlichen Genoms kartographiert sind.

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

Die genomweite Sequenzierungsdatenbank „1000 humane genome-Projekt“ wurde nach Einzel-Nukleotid-Polymorphismen in den Genen des Gemcitabin-Metabolismus und – transports durchsucht. Eine Analyse und Visualisierung der extrahierten Daten erfolgte unter Zuhilfenahme der Haploview Software.

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

Das *National Center for Biotechnology Information* bietet einen umfassenden Zugang zu biomedizinischen und genetischen Daten.

3 Methoden

3.1 Auswahl der Studienteilnehmer

Für die retrospektiv angelegte Studie kamen ausschließlich Patienten in Frage, bei denen ein histo-pathologisch gesichertes und mit Gemcitabin behandeltes duktales Adenokarzinom des Pankreas vorlag. Weitere Einschlusskriterien waren eine gute bis niedrige Differenzierung (G2-G3) sowie die makroskopische Resektion (R0-R1) des Tumorgewebes. Die Patienten willigten nach umfassender ärztlicher Aufklärung in die im Rahmen der Studie stattfindenden Analysen ein.

3.1.1 Retrospektive Patientenstudie

Im ersten Teil der retrospektiven Studie wurde der Einfluss von Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) in Genen des Gemcitabin-Metabolismus, des Gemcitabin-Transports und Hedgehog Signalweges auf die Überlebenszeit an einer Patientenkohorte aus der Universitätsklinik Heidelberg untersucht. Alle 97 der vorwiegend kaukasischen Patienten (davon 46 Frauen) im Alter von 33 bis 81 Jahren (medianes Alter: 62 Jahre) erhielten eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin im Zeitraum von 2002 bis 2009. Die im Vergleich mit der Göttinger Kohorte am stärksten mit dem Überleben assoziierten Genpolymorphismen wurden an einem gleichwertigen Patientenkollektiv aus dem UKE Hamburg überprüft. Diese Kohorte bestand aus 159 Patienten (davon 64 Frauen) im Alter von 28 bis 88 Jahren (medianes Alter 65 Jahre).

Der zweite Studienabschnitt beschäftigte sich mit microRNA und immunhistochemischen Analysen. Das Kollektiv bestand aus 103 Patienten die in der Allgemeinchirurgie der UMG wegen eines duktales Adenokarzinom des Pankreas operiert und anschließend Gemcitabin chemotherapiert worden sind. Das operativ entfernte Tumorgewebe wurde paraffiniert und im Archiv der pathologischen Abteilung asserviert.

Die verwendeten klinischen Daten, insbesondere die Überlebenszeit sowie die Genotypisierungsdaten der Patienten wurden im Rahmen der einer Dissertationen des Instituts für Klinische Pharmakologie in Göttingen erhoben (Schaudinn 2013).

3.2 Genotypisierung der Genvarianten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Genotypisierung von 36 Polymorphismen in den Genen des Gemcitabin-Transporters SLC28A (CNT1 und CNT3) etabliert. Die optimalen Amplifizierungsbedingungen wurden anhand einer Multiplex-Gradienten-PCR (siehe Kapitel

3.2.2) mit anschließender Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 3.5) bestimmt. Bei der Genotypisierung weiterer Genpolymorphismen des Gemcitabin-Metabolismus und –transports ist auf bereits in früheren Dissertationen etablierte Assays aus dem Institut für Klinische Pharmakologie zurückgegriffen worden. Die Identifizierung der Einzel Nukleotid Polymorphismen erfolgte im sogenannten Primerextensionverfahren (SNaPshot™, siehe 3.2.4).

3.2.1 Isolierung und Quantifizierung der genomischen DNA

Die Isolierung der genomischen DNA der Heidelberger Patienten erfolgte aus EDTA-Blut. Das Blut wurde nach Abnahme unter Einhaltung einer viertelstündigen Abkühlungsphase bei -20°C eingefroren und gelagert. Die DNA-Extraktion aus Leukozyten erfolgte automatisch im BioRobot EZ1 unter Verwendung des EZ1 DNA *Blood* 350 µl *Kit*. Es wurde dabei nach dem Protokoll des Herstellers verfahren und ein Gesamtvolumen von 200 µl eluiert. Die photometrische Quantifizierung der DNA erfolgte mit der Mikroliter Zelle von Implen. Eine ausführliche Beschreibung dieser Methode ist in Abschnitt 3.5 „Quantifizierung- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren“ zu finden.

Entsprechend der Menge an kernhaltigen Zellen in den Blutproben lag in den Eluaten ein unterschiedlicher DNA-Gehalt vor. Daher wurden alle zu analysierenden Proben auf eine Konzentration von 10 ng DNA/µl mit ddH₂O eingestellt, auf eine 96 *well*-Platte pipettiert und anschließend bei -20°C eingefroren.

3.2.2 Multiplex-Gradienten-PCR

Zur Ermittlung der optimalen Amplifizierungsbedingungen (*annealing*-Temperatur, Q-Solution) des SLC28A Primerassays (Tab. 4) wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes mit einem Gesamtvolumen von 21 µl ergibt sich aus dem Protokoll in Tab. 3. Im Temperaturbereich zwischen 60-72°C wurden für den Ansatz mit Q-Solution vier und für den Ansatz ohne Q-Solution fünf Temperaturpunkte ausgewählt. Die Thermocyclerbedingungen bei der Multiplex-Gradienten-PCR werden in Tab. 4 darstellt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden im Anschluss in einem Agarosegel entsprechend der Länge der Amplifikate aufgetrennt (siehe Kapitel 3.2.3). Bei Auswertung des Gels war es wichtig, dass sich alle Fragmentbanden deutlich abbilden.

Reagenz	Volumen in μl
ddH ₂ O	1,6
Qiagen Multiplex PCR Master Mix	6
Q-Solution	1,2
Primer Mix	1,2
gDNA	11

Tab. 3 Reaktionsansatz (21 μl) für Multiplex-Gradienten-PCR mit Q-Lösung. Im Ansatz ohne Q-Lösung wurden entsprechend 1,2 μl mehr ddH₂O zugegeben.

Phase	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Dauer	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95	15 min	1
Denaturierung	94	30 s	39
Annealing	60-72	1 min 30 s	
Elongation	72	1 min 30 s	
Finale Elongation	72	10 min	1

Tab. 4 Thermocyclerprotokoll für Multiplex-Gradienten-PCR.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Das Prinzip der Gelelektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld durch eine Agarose-Matrix. Dabei macht man sich die Eigenschaft der Nukleinsäuren zunutze das die Phosphatgruppen bei neutralem bzw. schwach basischem pH-Wert negativ geladen sind. Daher wandern sie im elektrischen Feld stets zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist direkt proportional zur angelegten Spannung und daher umgekehrt proportional zur Länge der PCR-Produkte und Dichte der Gel-Matrix. Lange Nukleinsäureketten werden in Gelen mit niedrigprozentigem Agarosegehalt aufgetrennt, kurze hingegen in höherprozentigen Gelen.

Für ein 2%-iges Gel wurde 1g Agarose mit 50 ml TBE Puffer in Lösung gebracht und anschließend kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 60 $^{\circ}\text{C}$ wurde die Lösung mit 2,5 μl Ethidiumbromid versetzt und auf einen Gelträger mit 2 Kämmen gegossen. Das Ethidiumbromid interkaliert mit den Basen der DNA was unter UV Licht der Wellenlänge 260 bis 360 nm detektiert werden kann. Der TBE Laufpuffer enthielt ebenfalls Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0.5 $\mu\text{l}/\text{ml}$. Als Marker zur späteren Größenbestimmung der DNA- Fragmente wurde ein 1000 bp Längenstandard aufgetragen. In die Geltaschen kamen jeweils 15 μl Probenvolmen (bestehend aus 12 μl PCR Produkt plus 3 μl blaufarbigem Ladepuffer). Bei einer Spannung von 120V benötigte ein Gel ca. 30 min, bis alle Banden ausreichend voneinander abgrenzbar waren. Zum Scannen der Fluoreszenz und zur Dokumentation der Gele wurden der Fluor-S MultiImager von BioRad und die Software Quantity One S Version 4.2.1. verwendet.

Die Auswertung des Gels erfolgte hinsichtlich der optimalen PCR-Bedingungen (*annealing* Temperatur, Q-Solution) für die Amplifizierung der SNP enthaltenden Fragmente. Dabei wurde anhand des aufgetragenen Längenstandards überprüft, ob sich ausschließlich die Bande mit der richtigen Fragmentlänge abgebildet haben (Spezifität der Reaktion). Die optimierten PCR Bedingungen wurden auf alle DNA-Proben angewandt. Exemplarisch ist in Abb. 2 ein Agarosegel bei Etablierung des SLC28A1+3 Primerassays dargestellt.

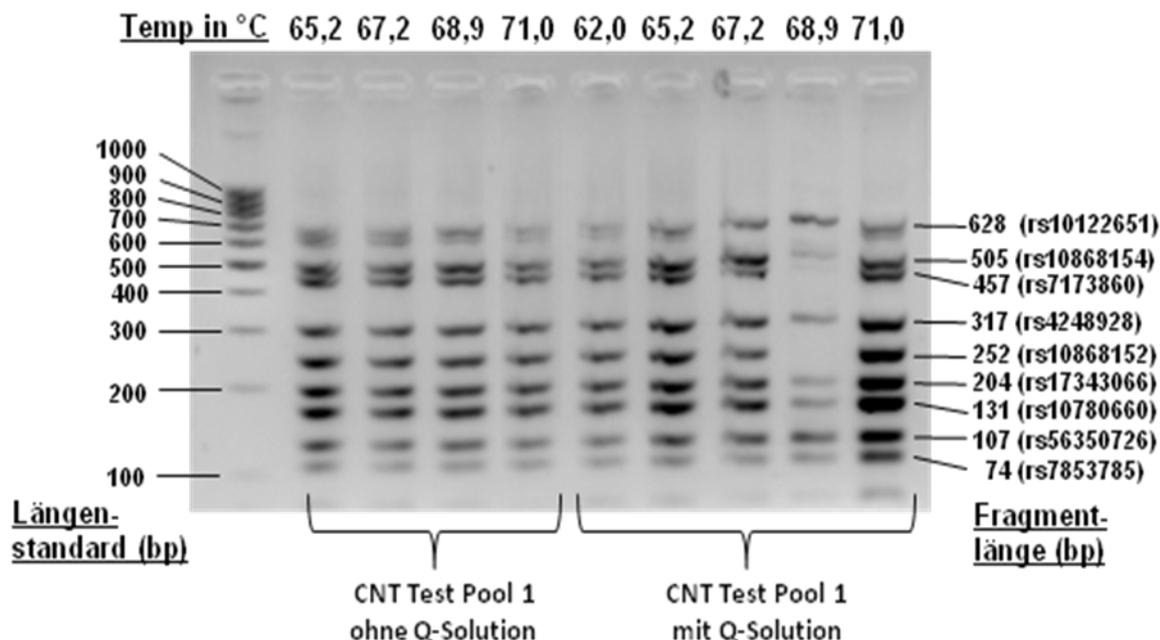


Abb. 2 Agarosegelelektrophorese bei Etablierung des SLC28A-Assays. Auftrennung der neun DNA Fragmente aus vorheriger Gradienten PCR. In der ersten Geltasche (*slot*) befindet sich der 1kb Längenstandard. Jedes SNPs enthaltende Fragment (rechter Bildrand) wurde bei verschiedenen Temperaturen (siehe oberer Bildrand) sowohl ohne als auch mit Q-Solution amplifiziert.

3.2.4 Genotypisierung mit Primer-Extension-Methode (SNaPshot™)

Durch genetische Polymorphismen kann die Expression von Genen die für den Stoffwechsel der Zelle kodieren und damit auch für die Aufnahme von Medikamenten wie Gemcitabin verantwortlich sind gesteuert werden. Die Ermittlung der Genotypen erfolgte im Primerextensionsverfahren (SNaPshot Reaktion) nach o.g. Amplifizierung der für die Regulierung des Transports und des Metabolismus von Gemcitabin verantwortlichen Genabschnitte. Zuvor war es notwendig die Multiplex-PCR-Produkte mittels FAST-AP und ExoI enzymatisch aufzureinigen, um die restlichen dNTPs zu dephosphorylieren und freie Oligonukleotid-Primer zu verdauen (Tab. 5).

Reagenz	Volumen je Probe (μl)
Rx-Puffer (10 \times)	0,95
Fast AP [1 U/ μl]	1,70
ExoI [20 U/ μl]	0,35
PCR-Produkt	6,0

Tab. 5 Reaktionsansatz (9 μl) zur enzymatischen Aufreinigung von PCR-Produkten

Der SNaPshot-Reaktionsansatz und die entsprechenden PCR-Bedingungen sind in Tab. 6 und Tab. 7 zusammengefasst. Das Prinzip der SNaPshot-Reaktion ist die Bindung eines für den Genpolymorphismus spezifischen Primers vor dem 5'-Ende des zu identifizierenden Einzelnukleotid-Polymorphismus. Durch den Einbau eines Didesoxy-Nukleosidtriphosphats (ddNTPs) am 3'-Ende des Primers kann es aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe zu keiner weiteren Strangverlängerung kommen, was damit unweigerlich zum Kettenabbruch führt. Je nach entsprechendem Allel wird eine der vier flourezenzmarkierten ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP, siehe Tab. 8) eingebaut. Die entstandenen Fragmente können aufgrund ihrer Länge und Flourezenzmarkierung elektrophoretisch im Sequenzer differenziert werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Gene Mapper von Applied Biosystems (Abb. 3).

Reagenz	Volumen pro Probe (μl)
SNaPshot TM -Mastermix	0,5
Primermix	0,5
ddH ₂ O	2,0
aufgereinigtes PCR-Produkt	2,0

Tab. 6 Reaktionsansatz (insgesamt 5 μl) für die SNaPshotTM-Reaktion

Phase	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Dauer	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	96	10 s	26
Annealing	50	5 s	
Elongation	60	30 s	

Tab. 7 Thermocycler Protokoll zur SNaPshotTM-Reaktion.

ddNTP	Flourezenzfarbstoff	Farbe
Adenin (A)	dR6G	Grün
Cytosin (C)	dTAMRA	Schwarz
Gyanin (G)	dR110 Blue	Blau
Thymin (T)	dROX	Rot

Tab. 8 Zuordnung der Flourezenzfarbstoffe zu den ddNTPs.

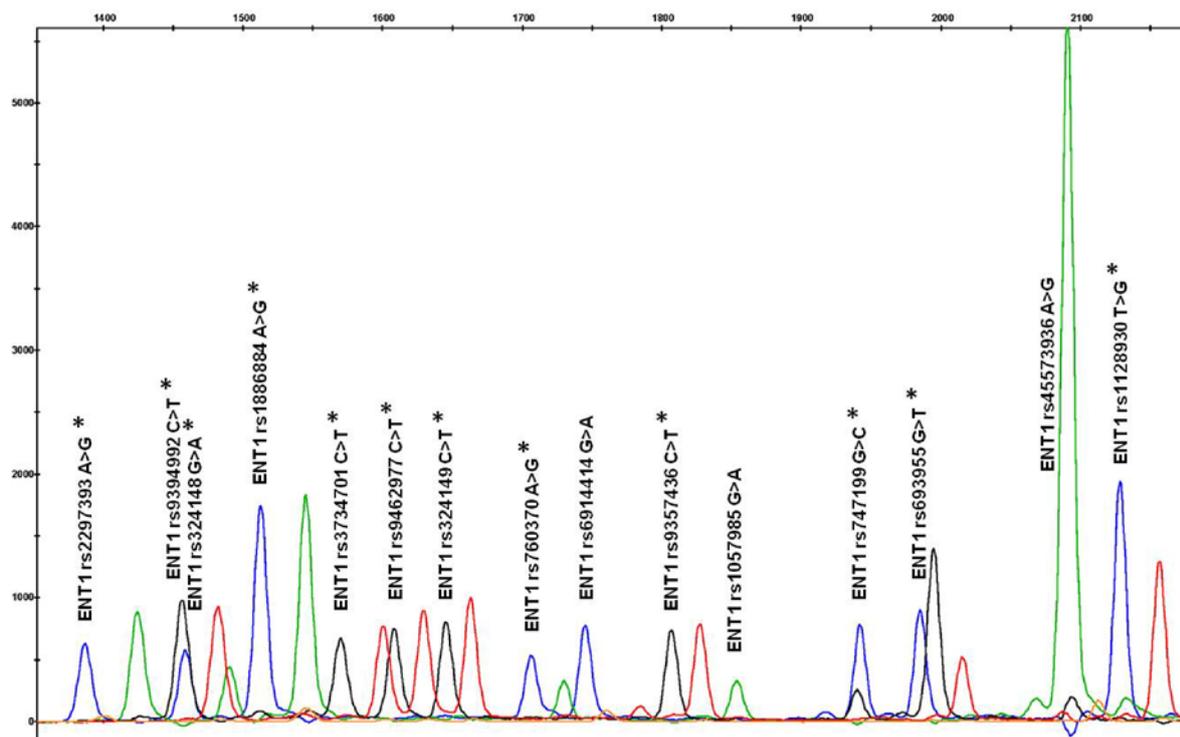


Abb. 3 Elektropherogramm der SNaPSHOT™-Reaktion. Beispielhaft sind 15 SNPs (rs-Nummer) eines Patienten mit Pankreaskarzinom dargestellt. Jeder farbige Peak zeigt die Genotyp Ausprägung (homozygot Wildtyp, heterozygot, homozygot Variante) im ENT1 Gen an und steht für ein gebundenes farbmarkiertes ddNTP-Molekül (Tab. 8). Für die mit * markierten SNPs lag Heterozygotie vor.

3.3 Immunhistochemische Methoden Kollektiv und Tumormaterial

In Zusammenarbeit mit der pathologischen Abteilung der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) wurden asservierte Paraffinblöcke für immunhistochemische Analysen sowie zur miRNA Isolierung verwendet. Es handelt sich dabei um paraffinierte Tumorpräparate von 103 Patienten (53 Männer und 50 Frauen), die im Zeitraum von 2004 bis 2010 wegen eines duktales Adenokarzinom des Pankreas in der Allgemein Chirurgie der UMG in kurativer oder palliativer Absicht operiert und mit Gemcitabin chemotherapiert worden sind. Von diesen Patienten lagen bereits klinische Nachsorgedaten und Genotypisierungsdaten vor. Der jüngste Patient war bei Feststellung des Tumors 44 Jahre und der älteste Patient 89 Jahre alt. Das mittlere Erkrankungsalter betrug 68 Jahre.

Das Tumorkollektiv setzte sich aus 6 (5,8%) gut bis mäßig differenzierten (G1-2), 66 (64%) mäßig differenzierten (G2), 9 (8,7%) mäßig bis wenig differenzierten (G2-3) und 22 (21,3%) wenig differenzierten (G3) duktales Adenokarzinomen zusammen. Davon waren 42 Patienten R0, 47 Patienten R1 und 2 Patienten R2 reseziert. Das Tumormaterial von 12 Patienten stammte aus Schnellschnitten eines während einer explorativen Laparoskopie diagnostizierten inoperablen Tumors.

Um die Tumorexpression der Gene ENT1, RRM2 und PTCH1 semiquantitativ beurteilen zu können, wurden die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte zunächst auf das Vorhandensein von Tumorzellen untersucht. Die Lokalisierung der Tumorzellen im Schnittpräparat erfolgte durch eine erfahrene Pathologin. Anhand der Präparatenummer konnten die korrespondierenden tumortragenden Paraffinblöcke aus dem Archiv der Pathologie herausgesucht werden.

3.3.2 Paraffineinbettung der Tumorresektate

Das während einer Pankreasresektion entnommene Gewebe ist unmittelbar nach Entnahme einem Selbstzersetzungsprozess ausgesetzt. Außerdem weist es keine geeignete Konsistenz und Stabilität auf, um davon Schnitte im Bereich von wenigen μm herzustellen. Formaldehyd dient der Vernetzung von Aminosäuren. Aus diesem Grund wurde das Gewebe zunächst in Formaldehyd für 24 Stunden fixiert und anschließend in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Im nächsten Schritt erfolgte eine Verdrängung des Alkohols durch Zugabe von Xylol. Das Xylol wiederum wurde durch heißes Paraffinwachs ersetzt und zu einem Block ausgegossen. Nach Abkühlung des Paraffinblocks war es möglich, aus dem Gewebe histologische Schnitte anzufertigen. Die Paraffineinbettung war nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit und findet an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber Erwähnung.

3.3.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Nach dem Abkühlen der FFPE-Blöcke auf einer Gefrierplatte (-20°C), wurden am Schlittenmikrotom durch Wärmeausdehnung 1-2 μm dicke Schnitte angefertigt und anschließend in ein warmes Wasserbad überführt. Durch das Warmwasserbad wurde der Schnitt gestreckt und von Falten befreit. Die schwimmenden Schnitte wurden auf positiv geladene Super Frost Plus Objektträger aufgezogen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Bis zur Verwendung lagerten die Schnitte bei Raumtemperatur in lichtgeschützten Präparatekästen.

3.3.4 Verwendete Antikörper

Im Rahmen der Studie fanden ausschließlich paraffintaugliche Antikörper Anwendung. Zur Untersuchung der Genexpression von RRM2 (ab115701) wurde ein monoklonaler Mausantikörper in einer 1:2000 Verdünnung verwendet. Die Darstellung von PTCH1 (ab39266) erfolgte mit einem aus Kaninchenserum gewonnenen polyklonalen Antikörper in einer 1:300 Verdünnung. Hersteller der verwendeten RRM2- und PTCH1-Antikörper ist die Firma Abcam. Zur Detektion des hENT1-Proteins wurde ein polyklonaler

Kaninchenantikörper der Firma MBL International Corporation (MC-9777) in der Verdünnung 1:500 benutzt.

3.3.5 Immunhistochemische Färbung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von RRM2, ENT1 und PTCH1 in Pankreaskarzinomzellen untersucht. Die drei Antikörperfärbungen der Paraffinschnitte erfolgte durch Mitarbeiterinnen der pathologischen Abteilung der UMG. Die Entparaffinierung der Schnitte geschah in zwei Xylol-Tauchbädern (jeweils 5 Minuten), gefolgt von einer Rehydrierung des Gewebes in absteigender Alkoholreihe und Wasser. Zur Wiederherstellung der Epitope wurden die Schnitte in Citratpuffer (pH 6.0) bei 100°C für 40 Minuten im Dampfgerar gekocht (betrifft nur RRM2- und PTCH1-Färbungen). Für die hENT1-Antikörperfärbung wurde zur Epitopdesmaskierung statt des Citratpuffer basischer TE-Puffer (pH 8,0) verwendet. Durch den Kochvorgang der sogenannten Hitze-induzierte Epitopdesmaskierung (HIED engl. *HIER*) wird das *crosslinking* der Proteine rückgängig gemacht, was eine Epitopbindung des Antikörper ermöglicht. Nach einem Eiswasserbad wurden die unspezifischen endogenen Biotin-Bindungsstellen mit 2% BSA in TRIS-Puffer für 10 Minuten geblockt.

Bei Gebrauch der primären Antikörper wurde nach den Empfehlungen des Herstellers vorgegangen. Die Inkubation der Schnitte erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem Austesten der optimalen Antikörperkonzentration in einer Verdünnungsreihe wurden die Präparate im computergesteuerten Zymed Mosaic Färbeautomaten mit dem Dako REAL *Detection System*, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse behandelt. Es handelt sich dabei um ein Verfahren zum Nachweis des primären Antikörpers, das in vier Schritten nach der sogenannten ABC-Methode abläuft (Abb. 4). Nach Inkubation mit dem Primärantikörper (1.Schritt) wurde ein sekundärer biotinylierter Antikörper (2.Schritt), der gegen die Maus- bzw. Kaninchen-Antigene des Primärantikörpers gerichtet ist, dazugegeben. Das angehängte Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, das sich durch eine hohe Affinität zu Streptavidin (aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*) auszeichnet. Nach Zugabe von Streptavidin Alkaline Phosphatase bindet jedes der sieben Biotinatome mehrere mit alkalischer Phosphatase konjugierte Streptavidinmoleküle (3.Schritt). Zwischen den dargestellten Einzelschritten wurden überschüssige Reagenzien mit TBS Waschpuffer (pH 7,4) ausgespült.

Zur Visualisierung der vorangegangenen Reaktionen wurde ein Substrat-Chromogen, das ebenfalls im Kit enthalten ist, verwendet. Die Umsetzung des Chromogen durch die anwesende alkalische Phosphatase wird in einer Rotfärbung am Ort des Zielantigens sichtbar (4. Schritt). Außerhalb des Färbeautomaten wurden die Tumorschnittpräparate per Hand in

aufsteigender Alkoholreihe entwässert und anschließend mit Xylol geklärt. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte durch Eintauchen in Hämalaun für 45 Sekunden. Zur Konservierung und Fixierung wurden die Schnitte mit Hilfe von Xylol eingedeckelt.

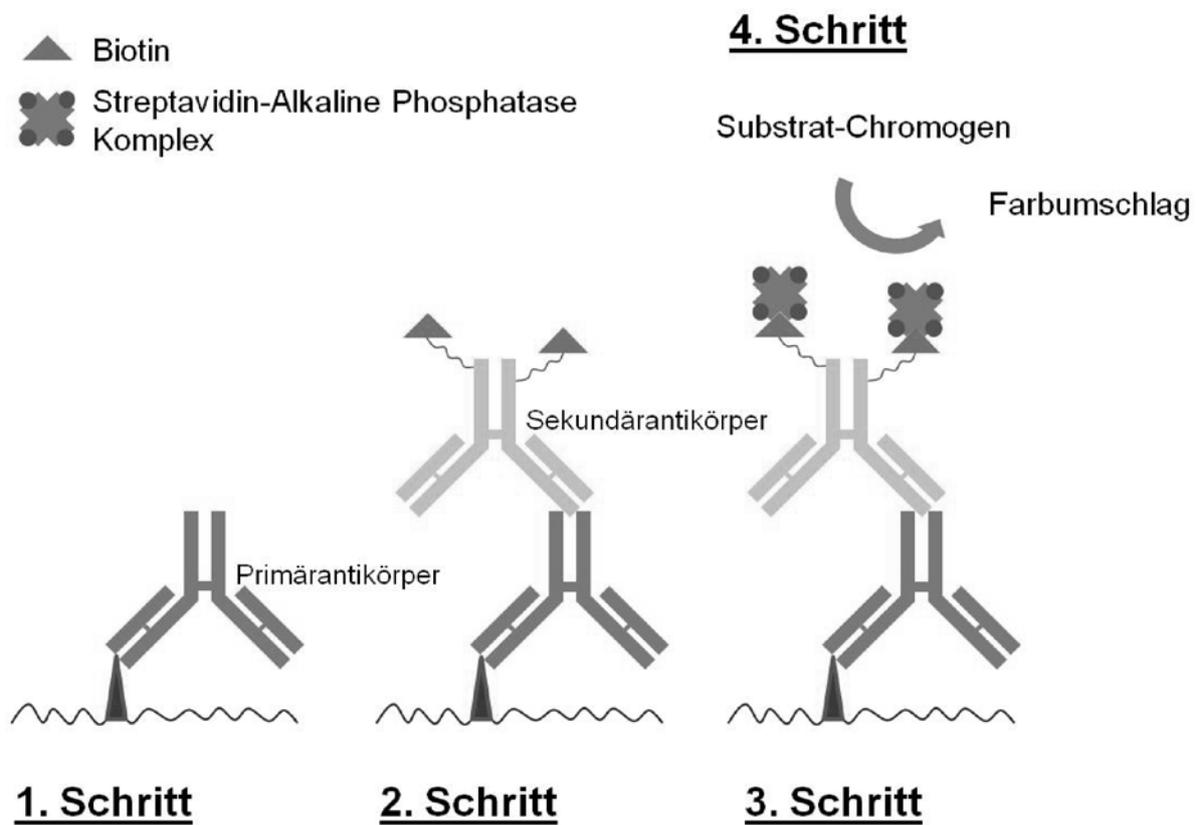


Abb. 4 Funktionsprinzip der immunhistochemischen Färbung. Schematische Darstellung der vier Teilschritte unter Verwendung des Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED Rabbit/Mouse (eigene Grafik).

3.3.6 Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate erfolgte semiquantitativ anhand des geringfügig abgewandelten immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner. Dazu wurde lichtmikroskopisch die Farbintensität und deren prozentualer Anteil in Bezug auf alle Tumorzellen im jeweiligen Präparat ermittelt. Die Bewertung der Farbeintensität erfolgte im Bereich von 0 bis 3 wobei 0 eine negative; 1+ eine schwach positive; 2+ eine mittel positive; 3+ eine stark positive Antigen-Antikörperreaktion anzeigt. Durch Multiplikation der Farbintensität mit den Prozentpunkten ergab sich für die Proteinexpression folgende Bewertungsskala: 0 negativ, 1-99 schwach positiv, 100-199 mäßig positiv, 200-300 stark positiv. Zur Unterscheidung der Fälle mit niedriger und hoher Proteinexpression wurden die IRS-Werte von 0-99 zu einer Negativ-Gruppe und die Werte

von 100-300 zu einer Positiv-Gruppe zusammengefasst. Eine unabhängige Zweitbewertung der Präparate erfolgte durch eine erfahrene Pathologin der UMG.

3.3.7 Statistische Auswertung des immunoreaktiven Scores

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS 20. Zur Verblindung des Untersuchers wurden die Überlebensdaten erst im Anschluss an die mikroskopische Auswertung hinzugefügt. Die Prüfung eines Zusammenhangs mit der Überlebenszeit erfolgte unter Verwendung des Cox-Regressions-Modells (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$). In die Analysen wurden bekannte prognostische Parameter wie Alter, Geschlecht, Grading, Resektions- und TNM-Staus einbezogen. Das therapiespezifische Überleben ergibt sich aus dem Zeitraum des Therapiebeginns bis zum Datum des durch die Krankheit verursachten Todes oder bis zum Ende der Nachbeobachtungszeit. Stellte sich im univariaten Cox-Modell der Einfluss der Proteinexpressionshöhe auf die Überlebenszeit als statistisch signifikant heraus, erfolgte der Vergleich der o.g. Negativ-Gruppe mit der Positiv-Gruppe im Log-Rank-Test und Kaplan-Meier-Diagramm. Um den Einfluss des immunoreaktiven Scores auf Genvarianten und prognostische Parameter zu untersuchen, wurden die bivariate Korrelationsanalyse nach Spearman und der nicht-parametrische Jonckheere-Terpstra-Test verwendet. Auch hier wurde ein p-Wert kleiner gleich 0,05 als statistisch signifikant erachtet.

3.4 Auswahl der microRNAs für die Expressionsanalyse

Die Expressionsanalysen erfolgten basierend auf Literaturberichten für fünf miRNAs mit potenziellem Einfluss auf die Prognose der Gemcitabin-Therapie beim Pankreaskarzinom.

3.4.1 Gewinnung von miRNA und DNA aus Tumorzellen

Die zuvor durch die Pathologin im Hämatoxylin-Eosin-Schnittpräparat markierte Tumorzellregion wurde durch Makrodissektion aus dem FFPE-Block entnommen. Hierfür war es notwendig, die entsprechende Region zunächst mit dem Skalpell im Block zu umreißen und anschließend mit dem Mikrotom in dünnen Schnitten abzutragen. Die Genexpressionsmessung erfolgte auf micro-RNA-Ebene, da durch die Paraffineinbettung Nukleotid-Sequenzen mit einer Länge über 150 Basenpaaren (mRNA) degradiert werden.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA, inklusive miRNA und DNA aus den insgesamt 103 Proben wurden der QiaCube und das Allprep DNA/RNA FFPE Kit (beides Qiagen) verwendet. Prinzipiell wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen, zusätzlich wurde jedoch die Zugabe von Xylol zur Entfernung des Paraffins sowie die Rehydratisierung des Gewebes mit 100%igem Alkohol zweimalig wiederholt. Des Weiteren lieferte ein Verdau der

Gewebeproben mit PDK und Proteinase K von 30 Minuten quantitativ mehr RNA. Bei der DNA-Isolierung war eine Verlängerung des Verdau nicht notwendig. Nach dem Verdau konnte die automatische Isolierung im QiaCube erfolgen. Das Gesamtvolumen des RNA-Eluats betrug 30 µl, das des DNA-Eluats 50 µl.

3.4.2 Synthese der cDNA

Das Tumorexpressionsprofil der fünf microRNAs 10b, 21, 34a, 141, 200c und der drei *house keeping genes* SNORD 96A, SNORD 68D, RNU6-2 wurde in zwei Schritten analysiert. Im ersten Schritt erfolgt die Synthese komplementärer DNA-Stränge aus reifer miRNA, durch die nachfolgende quantitative RT-PCR ließ sich im zweiten Schritt der ursprüngliche miRNA-Gehalt der jeweiligen Probe bestimmen.

Das Funktionsprinzip der miRNA lässt sich vereinfacht folgendermaßen erklären: In Abhängigkeit von der Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA erfolgt die Feinregulierung der Genexpression. Bei hoher Komplementarität wird die komplette Ziel-mRNA degradiert, eine geringe Übereinstimmung bewirkt lediglich eine Hemmung der Translation. Der Nachweis reifer miRNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 20 Nukleotiden erfolgt nach einer reversen Transkription indirekt über cDNA. Zur Umschreibung in cDNA wurde das miScript II RT Kit (Qiagen) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben verwendet. An die reife miRNA wird ein Polyadeninschwanz synthetisiert, der als Bindungsstelle für den Oligo-dT-Primer dient. Durch Primerverlängerung wird die miRNA-Matrize in 3' Richtung abgelesen und ein dazu komplementärer DNA-Strang synthetisiert.

Für die cDNA-Synthese wurden pro Probe 660 ng Gesamt-RNA eingesetzt. In 20 µl Reaktionsansatz sind 4 µl 5x miScript HiSpec Buffer, 2 µl 10x miScript Nucleics Mix und 2 µl miScript Reverse Transcriptase Mix enthalten. Das fehlende Volumen wurde mit RNase-freiem Wasser ergänzt. Nach vorsichtigem Durchmischen mit der Pipette und kurzer Zentrifugation wurde der Ansatz im Thermocycler erst bei 36°C für 60 Minuten und später zur Enzyminaktivierung bei 95°C für 5 Minuten inkubiert.

3.4.3 Nachweis von microRNAs durch quantitative RT- PCR

Die Analyse des microRNA-Expressionsprofils erfolgte mittels quantitativer RT-PCR unter Verwendung des miScript SYBR[®] Green Kit (Qiagen) und des 7900HT Sequence Detection System von Applied Biosystems. Bei der exponentiellen Amplifikation der zu bestimmenden miRNA fanden die in Tab. 9 genannten Primer Verwendung. Die Normierung dieser Ziel-miRNA erfolgte anhand von drei Referenzgenen, den sogenannten *housekeeping*-Genen (Tab. 10). Die Quantifizierung der miRNAs und Referenzgene in den jeweiligen Proben beruht auf

der Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR[®]Green mit doppelsträngiger DNA. Nach jedem Zyklus verdoppelt sich in etwa die Anzahl der PCR-Produkte und proportional dazu die Fluoreszenzstärke. Nach welcher Zyklenanzahl ein bestimmter Schwellenwert der Fluoreszenz (*cycle threshold, Ct*) erreicht wird, gibt Aufschluss über die ursprünglich in der Probe enthaltene cDNA-Menge. Das bedeutet, je höher die Anzahl der Zyklen bis zum Erreichen des Ct-Wertes ist, desto weniger cDNA und damit miRNA war vor der Amplifikation vorhanden. Durch die qRT-PCR wird ein Vergleich des miRNA-Expressionsprofils zwischen unterschiedlichen Proben möglich. Nach stattgehabter qRT-PCR wurde die Spezifität der Amplifikate durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. Dazu wird die Temperatur in der PCR-Kammer kontinuierlich erhöht und gleichzeitig die Fluoreszenzintensität gemessen. Bei einer für das PCR-Produkt (abhängig von der Anzahl der Nukleotide) charakteristischen Schmelztemperatur trennt sich der Doppelstrang, was durch eine Fluoreszenzabnahme detektiert werden kann. Das erlaubt die Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen PCR Produkten.

microRNA-Primer	Katalog-Nummer
Hs_miR-34a_1 miScript Primer Assay	MS00003318
Hs_miR-21_2 miScript Primer Assay	MS00009079
Hs_miR-141_1 miScript Primer Assay	MS00003507
Hs_miR-200c_1 miScript Primer Assay	MS00003752
Hs_miR-10b_3 miScript Primer Assay	MS00031269

Tab. 9 Verwendete miRNA-Primer mit Katalog-Nummer der Herstellerfirma Qiagen. Die entsprechenden Primersequenzen wurden von der Herstellerfirma bisher nicht veröffentlicht.

Referenzgen	Primersequenz
RNU6-2	AATTCGTGAAGCGTTCCAT
SNORD96A	GACATGTCCTGCAATTCTGA
SNORD68-D	ATTGAACCCTTTTCCATCTGA

Tab. 10 Bestimmte mi-RNA-Referenzgene mit Primersequenz.

Der Reaktionsansatz (Tab. 11) mit einem Gesamtvolumen von 10 µl wurde entsprechend der Empfehlungen des Herstellers auf eine 384 *well*-Platte gebracht, wobei für alle Proben eine doppelte Bestimmung erfolgte. Danach wurde die zu messende Platte im Taq-Man Abi Prism 7900HT platziert und das Reaktionsprotoll über das Programm SDS 2.1 eingestellt. Dabei wurde in Abweichung zum Standard ein modifiziertes Protokoll (siehe Tab. 12) verwendet. Die sich anschließende Längenmessung der PCR-Amplifikate erfolgte unter Verwendung in SDS 2.1 voreingestellten Standardbedingungen. Die Zyklus-Schwellenwerte (*ct*) und Schmelzkurven wurden ebenfalls mit dieser Software ausgewertet.

Reagenz	Volumen je Probe (μ l)
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	5
10x miScript Universal Primer	1
10x miScript Primer Assay	1
cDNA	3

Tab. 11 Reaktionsansatz (10 μ l) einer SYBR[®]Green RT-PCR.

Phase	Temperatur in $^{\circ}$ C	Dauer	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95	15 min	1
Denaturierung	94	15 s	40
Annealing	55	30 s	
Elongation	70	30 s	

Tab. 12 Taq-Man-Protokoll für die quantitative RT-PCR.

3.5 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA und RNA inkl. microRNA erfolgte durch UV-Spektrometrie im Eppendorf Photometer. Unter Verwendung der Labelguard[™] Mirkoliter Zelle waren 3 μ l Probenvolumen zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration ausreichend. Die Messung der optischen Dichte (OD) stützt sich auf den Sachverhalt, dass das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Lichtwellenlänge von 260 nm liegt. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht einer Konzentration 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA und 40 μ g/ml RNA.

Eine Verunreinigung der Proben, beispielsweise mit aromatischen Aminosäuren kann photometrisch über den Quotienten aus OD_{260nm} und OD_{280nm} ermittelt werden. Ein Quotient von 1,8 deutet auf hohe Reinheit der DNA, ein Quotient von 2,0 auf hohe Reinheit der RNA hin.

3.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der erhobenen Daten (Genotypen, Immunhistochemie, miRNA, klinische Daten) kamen deskriptive und analytische Methoden zur Anwendung.

3.6.1 Deskriptive Statistik

Mittels deskriptiver Statistik wurden Häufigkeiten und Verteilung (Mittelwerte, Streuung) von Parametern erfasst. Auf diese Weise wurden die Basisdaten der Patienten (Alter, Geschlecht), die Tumorcharakteristika (TNM, Resektionsstatus und histopathologisches Grading), die betrachteten Genotypen und bei den immunhistochemischen Messungen die immunreaktiven Scores dargestellt. Die Darstellung erfolgte in Tabellenform bzw. als Boxplots.

3.6.2 Analytische Statistik

Beziehungen zwischen unterschiedlichen Parametern, insbesondere mögliche Einflüsse von untersuchten Messgrößen (als unabhängige Variablen) auf die Hauptzielgröße Überlebenszeit (als abhängige Variable), wurden mit Methoden der analytischen Statistik getestet. Die Auswahl des geeigneten Tests war dabei von der Datenstruktur abhängig.

In der vorliegenden Arbeit waren Überlebenszeitanalysen meist von kategorialen Faktoren (Genotypen, Resektionsstatus, Grading) abhängig. Der Einfluss einer einzelnen Variablen wurde mittels Log-rank-Test geprüft. In Cox-Regressions-Modellen wurden die Überlebenszeit in Abhängigkeit mehrerer Parameter (wie Genotypen, miRNA, Resektionsgrad, Grading, Überlebenszeit, Alter bei Therapiebeginn) analysiert.

Unabhängig von der Überlebenszeitanalyse wurden auch die erhobenen Messgrößen untereinander in Beziehung gesetzt. Ein Zusammenhang zwischen zwei stetigen Parametern (z.B. immunhistochemische Expression eines Proteins in zwei unterschiedlichen Zellkompartimenten) wurde mittels nicht-parametrischer Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht. Eine Differenzierung einer stetigen Messgröße durch eine diskrete Variable wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bzw. dem Jonckheere-Terpstra-Test bei zwei bzw. mehreren, in diesem Falle ordinal skalierten Ausprägungen (insbesondere Genotypen) geprüft. Mehrere unabhängige Variablen wurden in einem linearen Regressionsmodell (nach Prüfung der einzelnen Variablen auf die Vereinbarkeit mit einer Normalverteilung) kombiniert untersucht. Das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts für jeden der gemessenen genetischen Marker wurde mit dem χ^2 -Test geprüft.

Die hohe Wahrscheinlichkeit zufällig falsch positiver Befunde beim multiplen Testen wurde durch entsprechende Anpassung des Alpha-Fehlers (bei einem Test nominaler p-Wert $\leq 0,05$) berücksichtigt. Alle Analysen erfolgten unter Verwendung der SPSS-Software (Version 20) des Herstellers IBM.

3.7 Bioinformatik

Das menschliche Genom enthält etwa 3,3 Milliarden Basenpaare, davon sind 99,9% von Mensch zu Mensch identisch (Collins et al. 1997). Nicht identische Sequenzen können quantitativ in Genpolymorphismen (Häufigkeit des selteneren Allels $\geq 1\%$ in der Allgemeinbevölkerung) und seltene Mutationen (*de novo* oder familiär bedingt) unterteilt werden. Etwa 90% dieser Genvarianten sind Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphisms* SNPs, Collins et al. 1998), wovon bis heute ca. 52 Millionen identifiziert wurden (Ni et al. 2012). Für die Auswahl von SNPs als potenzielle Biomarker für

die Prognose der Gemcitabin-Therapie beim Pankreaskarzinom wurde der Kandidatengenansatz verfolgt.

3.7.1 Auswahl der Kandidatengene

Der Einfluss von Polymorphismen in den Kandidatengen des Metabolismus und Transports sowie des Hedgehog-Signalweges auf die Überlebenszeit wurde bereits an einer Patientenkohorte aus Göttingen explorativ untersucht (Schaudinn 2013). Die dabei gewonnenen Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit an einer weiteren Kohorte auf Replizierbarkeit überprüft. Darüber hinaus wurden die Gene des Transporters CNT1 und 3 (SLC28A1 und SLC28A3), für die sich aufgrund von Literaturdaten und funktionellen Überlegungen ein Zusammenhang mit dem Therapieansprechen von Gemcitabin vermuten lässt, hinsichtlich bedeutsamer Polymorphismen analysiert. Insgesamt wurden in 13 Kandidatengen 143 genetische Varianten bestimmt (Abb. 5).

Kandidatengen	Anzahl der untersuchten Genvarianten
Metabolismus	
CDA	18
CMPK1	7
DCK	5
DCTD	14
NT5C3	8
RRM1	11
RRM2	5
Transport	
ENT1	16
SLC28A1	21
SLC28A3	15
Hedgehog-Signalweg	
PTCH1	10
SHH	7
SMO	6

Abb. 5 Untersuchte Kandidatengene mit Anzahl der bestimmten Genpolymorphismen.

3.7.2 Kriterien zur Auswahl der Genvarianten

Die 143 untersuchten Genpolymorphismen wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

1. alle Varianten mit einer Frequenz des selteneren Allels (MAF, *minor allele frequency*) $\geq 0,02$, denen laut Literatur eine klinische oder funktionelle Relevanz zugesprochen wurde;
2. alle kodierenden Varianten, die eine $MAF \geq 0,05$ besaßen;
3. weitere Genvarianten aus der HapMap-Datenbank (Kaukasier), die repräsentativ für die genetische Variabilität mit einer MAF von mindestens 5% sind. Letztere wurden nach Visualisierung der HapMap-Daten mit der Software HaploView durch den darin enthaltenen paarweisen Tagging-Algorithmus mit

einer Stringenz von $r^2 = 0,8$ ermittelt. Dies bedeutete, dass bei Genvarianten mit einem paarweisen Kopplungsungleichgewicht von $r^2 \geq 0,8$ eine Variante zu mindestens 80% durch die andere bestimmt war und demzufolge nur eine der beiden genotypisiert wurde.

Das Design von Primern für die PCRs und das Primerextensionsverfahren (SNaPshot[®]) erfolgte mit Hilfe der Software OLIGO (<http://www.oligo.net>) und dem Programm Clone Manager Suite (Scientific & Educational Software, USA). Synthetisiert wurden die Primer von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland). Die Primer für die micro-RNA-Analysen wurden von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen.

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation von molekularen Biomarkern für die Prognose der Gemcitabin-Therapie beim Pankreaskarzinom. Die Kenntnis solcher Marker bietet im Sinne einer personalisierten Medizin die Grundlage für eine maßgeschneiderte, wirkungsvolle und nebenwirkungsarme Chemotherapie des Patienten. Man geht davon aus, dass bei der hohen inter-individuellen Variabilität des Therapieansprechens genetische Determinanten eine wesentliche Rolle spielen.

Hierzu wurde im ersten Teil der Arbeit der Einfluss von 143 Genpolymorphismen in den Kandidatengenen des Gemcitabin-Transports, des Gemcitabin-Metabolismus und des Hedgehog-Signalwegs auf das Gesamtüberleben evaluiert. Zudem wurden etablierte prognostische Parameter wie Resektionsstatus und histopathologisches Grading bezüglich ihres Effektes auf die Überlebenszeit als Zeitspanne zwischen Beginn der Chemotherapie und dem Tod des Patienten untersucht. Wegen der meist sehr kurzen Überlebenszeit bei diesem Tumor konnte hier das Gesamtüberleben dem krankheitsfreien Überleben weitestgehend gleichgesetzt werden. Im zweiten Teil wurden Kandidatengene, in welchen Genvarianten mit Assoziation zum Gesamtüberleben gefunden wurden, immunhistochemisch analysiert werden. Die erhaltenen Daten wurden wiederum mit den Überlebensdaten in Beziehung gesetzt. Im letzten Teil der Arbeit wurde der potenzielle Einfluss von microRNAs, für welche es anhand von Literaturdaten ein Hinweis auf das Überleben mit Gemcitabin behandelter Patienten gibt, untersucht. Die nachfolgenden Abschnitte sind entsprechend der beschriebenen Abfolge gegliedert.

4.1 Homogenität der Studienkohorten aus Heidelberg und Göttingen

Der Einfluss von Polymorphismen in Kandidatengenen für die Prognose der Gemcitabin-Therapie wurde bereits an einer Patientenkohorte aus Göttingen untersucht (Schaudinn 2013). Die dabei gewonnenen Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Dissertation an einer Kohorte aus Heidelberg auf Replizierbarkeit geprüft. Die Nachsorgedaten wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Werner aus der Abteilung für Allgemeine, Viszerale und Transplantationschirurgie der Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die wichtigsten klinischen und pathologischen Charakteristika der Kohorten aus Göttingen und Heidelberg sind in Tab. 13 gegenübergestellt.

Die Größe beider Kohorten ist nahezu identisch, die Heidelberger Kohorte besteht aus 97, die Göttinger aus 98 Patienten. In den Basisdaten unterscheiden sich die Kohorten im Alter bei Therapiebeginn, wobei die Heidelberger Patienten jünger waren (61 vs. 67 Jahren). In beiden Gruppen lag für das Alter eine Normalverteilung vor. Frauen und Männer waren in beiden

Kohorten zu etwa gleichen Teilen repräsentiert. Beim Vergleich der Tumorgröße (T-Status) zeigte sich eine leichte Abweichung zwischen den Kohorten ($p = 0,03$), diese war bedingt durch nur einen Fall mit $T \leq 2$ in Heidelberg versus 9 Fälle in Göttingen. Bei den lokal fortgeschrittenen Stadien T3 und T4 gab es keine signifikanten Unterschiede. In der Heidelberger Kohorte hatten etwas mehr Patienten Lymphknotenmetastasen. Den M-Status betreffend zeigten sich keine nennenswerten Diskrepanzen zwischen Heidelberg und Göttingen. Gleiches gilt auch für den Resektionsstatus und das Grading. Bei Abschluss der Datenerhebung lebten von insgesamt 97 Heidelberger Patienten noch 36.

	Göttinger Kohorte, n = 98	Heidelberger Kohorte, n = 97	p-Wert GÖ/HD
Alter [Jahren], Median (Bereich)	68 (44-88)	62 (34-81)	0,0002 ¹
Geschlecht, Anzahl (%)			0,4 ²
Frauen	41 (42)	46 (47)	
Männer	57 (57)	51 (53)	
T-Status, Anzahl (%)			0,03 ²
klassifiziert	98	97	
≤ 2	9 (9)	1 (1)	
3 oder 4	89 (91)	96 (99)	
N-Status, Anzahl (%)			0,01 ²
klassifiziert	96	96	
0	19 (20)	7 (7)	
1	77 (80)	89 (93)	
M-Status, Anzahl (%)			0,7 ²
klassifiziert	34	96	
0	31 (91)	85 (89)	
1	3 (9)	11 (11)	
Resektionsstatus, Anzahl (%)			0,7 ²
klassifiziert	98	97	
0	45 (46)	43 (44)	
1	51 (52)	50 (52)	
2	2 (2)	4 (4)	
Grading, Anzahl (%)			0,4 ²
klassifiziert	98	97	
G1	0 (0)	2 (2)	
G2	67 (68)	66 (68)	
G3	31 (32)	29 (30)	
Überlebenszeit [Monate] Median (min-max)	13 (1-124)	23 (1-87)	0,003 ³

Tab. 13 Allgemeine und klinische Charakteristika der Patientenkohorten aus GÖ und HD. Daten der Göttinger Patienten mit freundlicher Genehmigung von A. Schaudinn (Schaudinn 2013). Die Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede erfolgte mittels ¹Mann-Whitney-U-Test, ² χ^2 -Test nach Pearson bzw. ³Log-rank-Test.

4.2 Einfluss von Grading und Resektionsstatus auf die Überlebenszeit

In der früheren Untersuchung konnte an der Göttinger Kohorte ein Einfluss von Resektionsstatus und Grading auf das Überleben der Patienten unter Gemcitabin-Therapie aufgezeigt werden (Schaudinn 2013). In der genotypisierten Heidelberger Kohorte waren nur resezierte Patienten enthalten. Der Vergleich beider Kohorten bezog sich deshalb auch nur auf diese Patienten, d.h. 43 Patienten aus Göttingen, welche aufgrund des fortgeschrittenen Tumorleidens nicht mehr operiert wurden, fanden hier keine Berücksichtigung.

Die Überlebenszeiten der Heidelberger und Göttinger Patienten in Abhängigkeit der Resektionsgrade 0, 1 und 2 sind in Abb. 6 im Kaplan-Meier-Diagramm aufgetragen. Der Einfluss des Resektionsstatus auf das Gesamtüberleben war in der Göttinger Kohorte mit einem p-Wert von 0,03 signifikant. An der Heidelberger Kohorte konnte dieses Ergebnis nicht repliziert werden ($p = 0,2$). Bei Gegenüberstellung von R0 und R1, zeigte sich kein signifikanter Überlebensvorteil zugunsten der R0 Resektion ($p = 0,7$). Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Log-rank-Testverfahren.

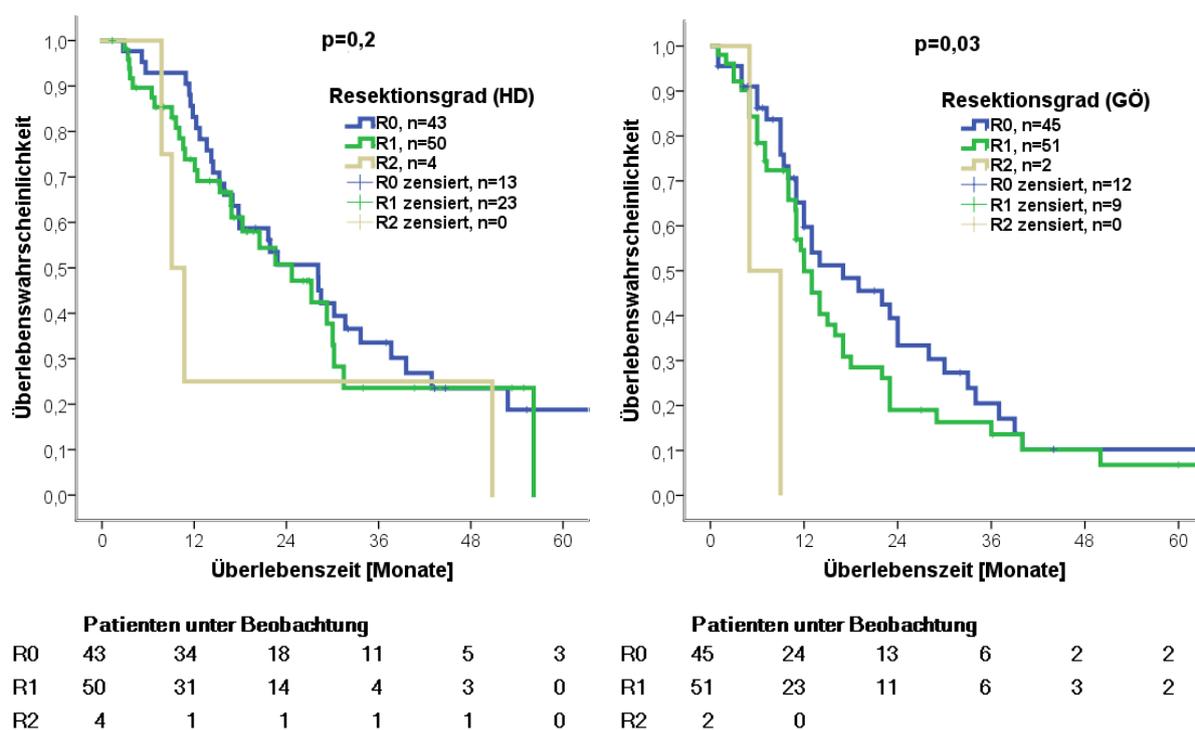


Abb. 6 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Resektionsstatus. Zum Vergleich ist links die Kaplan-Meier-Grafik der Heidelberger und rechts der Göttinger Kohorte gezeigt. Der p-Wert gibt die statistische Signifikanz des Log-rank-Tests an, wobei zwischen den Variablen R0, R1 und R2 ein linearer Trend angenommen wurde. Die Anzahl der Patienten unter Beobachtung ist in 12-Monats-Abständen unterhalb der Grafik aufgeführt.

In Abb. 7 ist die Überlebenszeit in Abhängigkeit vom histopathologischen Grading des Tumors dargestellt. Die Einteilung des Differenzierungsgrades fand in G1 (gut differenziert), G2 (mäßig gut differenziert) und G3 (schlecht differenziert) statt. Ein statistisch signifikanter

Einfluss auf das Gesamtüberleben zeigte sich in der Göttinger Kohorte ($p = 0,0003$ nach Log-rank-Test). Dieser Einfluss konnte in der Heidelberger Kohorte nicht bestätigt werden ($p = 0,9$ nach Log-rank-Test).

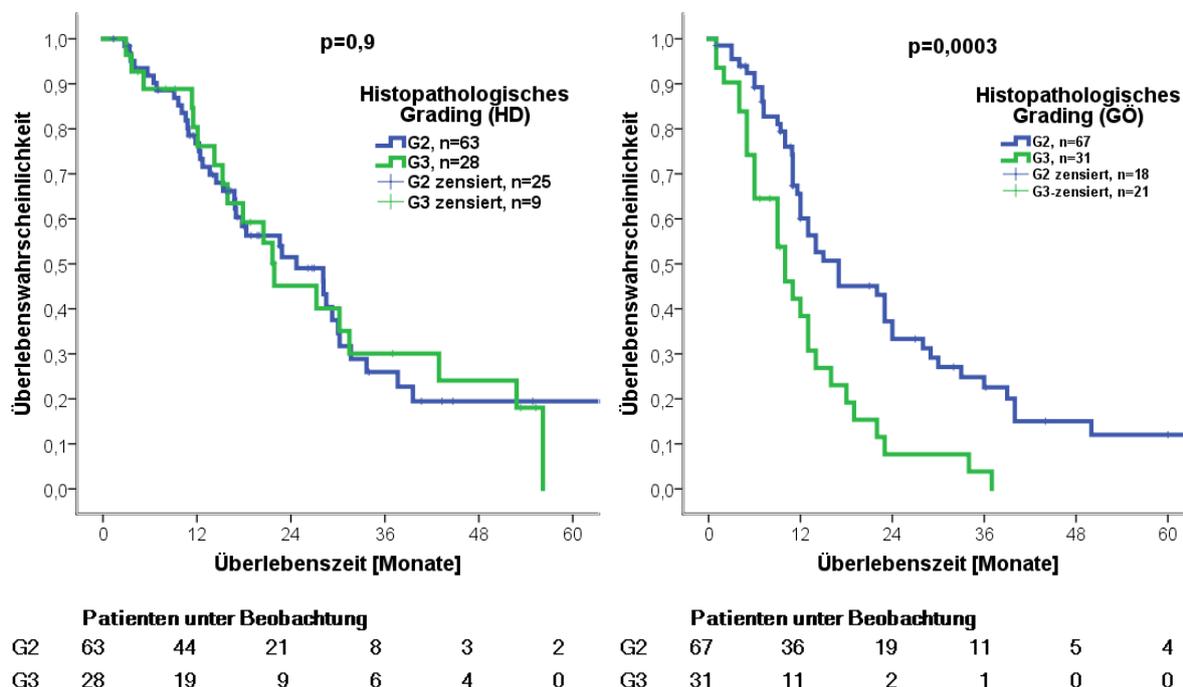


Abb. 7 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom histopathologischen Grading (G2 und G3). Zum Vergleich ist links das Kaplan-Meier-Diagramm der Heidelberger und rechts der Göttinger Kohorte gezeigt. Der p-Wert gibt die statistische Signifikanz des Log-rank-Tests an, wobei zwischen den Variablen G2 und G3 ein linearer Trend angenommen wurde. Die Anzahl der Patienten unter Beobachtung ist in 12-Monats-Abständen unterhalb der Grafik aufgeführt.

Wegen der besonders schlechten Prognose wurde bei den Heidelberger Patienten die sehr kleine Gruppe ($n = 4$) mit einem Resektionsstatus von 2 von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Ähnliches galt in umgekehrter Weise für das Grading, wo ein Grad von 1 ($n = 2$) nicht mehr weiter berücksichtigt wurde.

4.3 Einfluss des Alters und der Tumorausbreitung auf die Überlebenszeit

Das Alter besaß bei Aufteilung der Heidelberger Patienten in 2 Gruppen ober- und unterhalb des Mittelwertes von 67 Jahren einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit ($p = 0,03$) mit einer geringfügig besseren Prognose für die jüngeren Patienten. Der Nachweis von Fernmetastasen hatte erwartungsgemäß einen höchst signifikanten Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit ($p = 0,0001$ nach Log-rank-Test, Abb. 8). Das Kaplan-Meier-Diagramm zeigt, dass alle Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom (M1) aus der Heidelberger Studienkohorte innerhalb von 28 Monaten nach Therapiebeginn verstarben. Die mediane Überlebenszeit für M0 und M1 lag bei 28 versus 11 Monaten. Bei einem Patienten war keine Aussage zu Metastasierungsstatus möglich. Die Ausdehnung des Primärtumors (T-Status) in

peripankreatisches Gewebe war mit einer schlechteren Prognose verbunden ($p = 0,02$). Patienten mit Lymphknotenmetastasen (N-Status) zeigten im Kaplan-Meier-Plot (nicht dargestellt) eine kürzere Überlebenszeit, der Einfluss ist allerdings statistisch nicht signifikant. ($p = 0,14$).

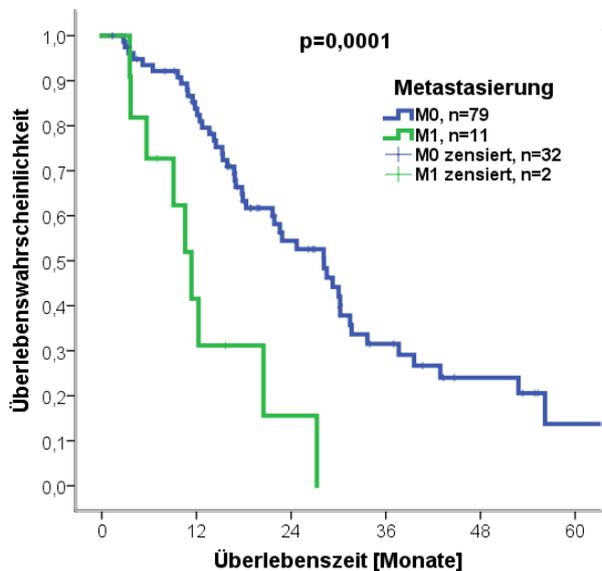


Abb. 8 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Vorliegen von Fernmetastasen. Dieser Kaplan-Meier-Grafik liegen die Daten der Patienten aus der Heidelberger Kohorte zu Grunde. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Log-rank-Test ermittelt und ist als p-Wert angegeben. Die Anzahl der Patienten unter Beobachtung befindet sich unterhalb der Grafik.

	Patienten unter Beobachtung					
M0	79	68	29	14	7	2
M1	11	4	1	1	0	0

4.4 Keimbahnvarianten in Kandidatengen für Gemcitabin

Die Primerassays zur Genotypisierung von 107 *single nucleotide polymorphisms* (SNP) in den Kandidatengen SHH, SMO, CDA, PTCH1, RRM1, RRM2, CMPK1, DCTD, DCK, NT5C3 und ENT1 des Gemcitabinmetabolismus und -transports sowie des Hedgehogsignalweges wurden aus einer früheren Dissertation der Abteilung für klinische Pharmakologie in Göttingen übernommen (Schaudinn 2013). Die Assays für 36 Genpolymorphismen der Gene SLC28A1 und A3 wurden selbst etabliert. Die Bestimmung aller polymorphen Gene für Gemcitabin erfolgte an den 97 Proben aus Heidelberg. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung der 36 SLC28A -Genvarianten an den Proben aus Göttingen, sodass insgesamt 195 Proben bezüglich dieser Genvarianten analysiert worden sind. Die Tab. 20 im Anhang fasst die Charakteristika der Genotypisierungen zusammen. Für Hintergründe zur Auswahl der Polymorphismen in den Kandidatengen sei auf den Methodenteil Kapitel 3.7.1. verwiesen.

Zur Überprüfung, ob die beobachtete Allelverteilung der untersuchten Genvarianten der zu erwartenden Verteilung entspricht, wurde mit dem Chi-Quadrat-Test geprüft, ob das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erfüllt war. Dies war für ein (stringentes) Signifikanzniveau von $p = 0,05$ für alle Genvarianten mit Ausnahme von DCTD rs5016499 ($p = 0,04$) und SMO

rs2566871 ($p = 0,04$) gegeben. In Anbetracht der großen Anzahl der untersuchten Genpolymorphismen war dies akzeptabel. Die *call rate* gibt Auskunft über den Anteil der für eine Genvariante erfolgreich genotypisierten Proben. 105 der insgesamt 143 untersuchten Genvarianten konnten mit einer *call rate* von 100% genotypisiert werden, die restlichen 38 Genvarianten waren zu mindestens 98% bestimmbar. Die Gesamt *call rate* über alle SNPs gemittelt betrug 99,6%. Die Genotypisierung wurde für 10% der Proben wiederholt, hierbei zeigte sich keinerlei Abweichung zur Erstbestimmung.

4.5 Einfluss der Genpolymorphismen auf die Überlebenszeit

4.5.1 Univariate Signifikanzen in der Heidelberger Kohorte

Im Log-rank-Test wurde der potenzielle Einfluss von 143 genetischen Polymorphismen auf die Gesamtüberlebenszeit analysiert. Ein linearer Trend entsprechend der Anzahl der Variantenallele wurde vorausgesetzt. Die Ergebnisse der Analyse sind im Anhang in Tab. 20 dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde für diese explorative univariate Analyse ohne Berücksichtigung multiplen Testens eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angenommen, entsprechende Genvarianten sind fett hervorgehoben. Dieses Kriterium erfüllten 14 Polymorphismen, welche sich in den Genen SLC28A1, RRM1, RRM2, ENT1, PTCH1 und DCTD befinden. Die stärksten Assoziationen zeigten sich bei den Genvarianten RRM1 rs10498198 ($p = 0,0001$) und RRM2 rs1130609 ($p = 0,008$).

4.5.2 Kombinierte Analyse mit nicht-genetischen Einflussfaktoren

Für die in 4.5.1 mit einem p -Wert $\leq 0,05$ mit dem Überleben assoziierten Genvarianten wurde ein möglicher Einfluss nicht-genetischer Faktoren mittels eines Cox-Modells (proportionales Hazard-Modell, Tab. 14) geprüft. Nicht-genetische Parameter wurden zunächst einzeln im Cox-Modell und Log-rank-Test untersucht. Für die kombinierte Analyse kamen daraufhin ausschließlich Parameter mit einem p -Wert unter 0,2 in Frage.

Unter Einbeziehung der potenziellen *Confounder* TNM-Status und Alter bei Therapiebeginn wiesen noch 10 genetische Polymorphismen einen p -Wert $\leq 0,05$ auf. Diese sind fett gedruckt hervorgehoben.

Gen	Kovariaten	p-Wert ¹	Hazard Ratio pro Variableneinheit (95% KI) ²
DCTD	rs5016499	0,008	2 (1,2–3,4)
	T-Status	0,005	20,5(2,5–169,8)
	N-Status	0,2	2,4(0,6–10,4)
	M-Status	0,001	3,6(1,7–8)
	Alter bei Therapiebeginn	0,11	1(1–1,1)
RRM1	rs9937	0,27	0,6 (0,4–1)
	T-Status	0,002	30,3 (3,5–261,4)
	N-Status	0,6	1,5 (0,3–6,4)
	M-Status	0,0003	4,4 (2–9,6)
	Alter bei Therapiebeginn	0,1	1 (1–1,1)
	rs10498198	0,09	2,3(0,9–5,9)
	T-Status	0,002	28 (3,4–234,1)
	N-Status	0,4	1,9 (0,5–8,1)
	M-Status	0,09	2,4 (0,9–6,3)
	Alter bei Therapiebeginn	0,1	1(1–1,1)
	rs183484	0,008	0,6 (0,4–0,9)
	T-Status	0,002	32,2 (3,7–280,6)
	N-Status	0,7	1,4 (0,3–6)
	M-Status	0,0002	4,5 (2–9, 8)
	Alter bei Therapiebeginn	0,079	1 (1–1,1)
rs7932702	0,06	0,6 (0,4–1)	
T-Status	0,002	31,8 (3,7–275,8)	
N-Status	0,4	2 (0,5–8,5)	
M-Status	0,001	3,7 (1,7–8)	
Alter bei Therapiebeginn	0,2	1 (1–1,04)	
rs10835613	0,03	0,6 (0,4–1)	
T-Status	0,002	30,8 (3,6–266,3)	
N-Status	0,7	1,4 (0,3–6,3)	
M-Status	0,001	3,8 (1,8–8,2)	
Alter bei Therapiebeginn	0,09	1 (1–1,1)	
RRM2	rs1130609	0,02	0,5 (0,3–0,9)
	T-Status	0,004	20 (2,6–155,7)
	N-Status	0,3	2 (0,5–9)
	M-Status	0,01	2,8 (1,3–6,2)
	Alter bei Therapiebeginn	0,1	1 (1–1,1)
	rs6741290	0,03	0,6 (0,4–0,9)
	T-Status	0,002	28,8 (3,5–237,6)
N-Status	0,4	1,8 (0,4–7,8)	
M-Status	0,001	4,1 (1,8–9)	
Alter bei Therapiebeginn	0,4	1 (1–1,04)	
ENT1	rs1057985	0,05	0,6 (0,4–1)
	T-Status	0,002	29,1 (3,5–242,4)
	N-Status	0,5	1,7 (0,4–7,4)
	M-Status	0,0004	4,2 (1,9–9,1)
	Alter bei Therapiebeginn	0,2	1 (1–1,04)
	rs45573936	0,04	8,8 (1,1–71,1)
	T-Status	0,002	27,6 (3,3–228,3)
N-Status	0,4	2 (0,4–8,5)	
M-Status	0,001	3,8 (1,7–8,3)	
Alter bei Therapiebeginn	0,2	1 (1–1,04)	

Gen	Kovariaten	p-Wert ¹	Hazard Ratio pro Variableneinheit (95% KI) ²
SLC28A1	rs11853372	0,03	0,6 (0,4–0,9)
	T-Status	0,002	29,9 (3,6–250,3)
	N-Status	0,2	2 (0,6–11,1)
	M-Status	0,002	3,5 (1,6–7,2)
	Alter bei Therapiebeginn	0,2	1 (1–1,1)
	rs4980346	0,05	1,5(1–2,2)
	T-Status	0,003	24,5 (3–197,3)
	N-Status	0,3	2,1 (0,5–8,9)
	M-Status	0,001	3,6 (1,6–7,7)
	Alter bei Therapiebeginn	0,2	1 (1–2,18)
PTCH1	rs2236407	0,06	1,5(1–2,4)
	T-Status	0,001	37 (4,2–326,2)
	N-Status	0,3	2,24 (0,5–9,7)
	M-Status	0,002	3,42 (1,6–7,3)
	Alter bei Therapiebeginn	0,3	1 (1–1,04)
	rs357564	0,008	0,6 (0,4–0,9)
	T-Status	0,001	32,2 (3,9–263,2)
	N-Status	0,2	2,6 (0,6–11,3)
	M-Status	0,001	3,6 (1,7–7,6)
	Alter bei Therapiebeginn	0,1	1 (1–1,04)

Tab. 14 Einfluss von SNP und nicht-genetischen Faktoren auf die Überlebenszeit. Die Genvarianten wurden unter Einbeziehung von TNM-Status und Alter bei Therapiebeginn in einem Cox-Modell analysiert. Beim TNM-Status wurde die übliche Codierung verwendet. Die Genvarianten wurden nach der Anzahl der Variantenallele kodiert, d.h. Homozygotie für das häufigere Allel (entsprechend Tab. 20 im Anhang) wurde null zugewiesen. ¹p-Wert entsprechend dem Cox-Modell als Option „Einschluss“ in SPSS. ²Die Hazard Ratio gibt das relative Sterberisiko für die entsprechenden Variablen (Risikofaktor) mit dem 95%-Konfidenzintervall an.

4.5.3 Vergleich mit der Göttinger Kohorte

Nach Adjustierung auf nicht-genetische Einflussfaktoren im Cox-Modell (Kapitel 4.5.2) wurden die am stärksten mit dem Überleben assoziierten Genvarianten der Heidelberger und der Göttinger Kohorte verglichen. Die Genotypverteilung (GV) dieser Polymorphismen unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Göttinger und Heidelberger Proben. Dies wurde mittels des Chi-Quadrat-Tests (χ^2) geprüft. Die Überlebenszeiten sind in Abhängigkeit der jeweiligen Genvarianten anhand von Kaplan-Meier-Diagrammen (Abb. 9, Abb. 10, Abb. 11, Abb. 13, Abb. 13 und Abb. 14) für beide Kohorten gegenübergestellt.

In Abb. 9 wird die Assoziation der mit 32% Allelfrequenz häufigen Promotorvariante ENT1 rs1057985 auf die Überlebenszeit veranschaulicht. In Abhängigkeit des T-Variantenallels zeigte sich ein insgesamt besseres Überleben in beiden Kohorten ($p = 0,05$ bzw. $0,03$ jeweils entsprechend des Log-rank-Tests bei Berücksichtigung der Anzahl der Variantenallele). Die beste Prognose hatten jeweils die Patienten mit homozygotem Variantenallel-Genotyp (TT). Heterozygote Träger (CT) verhielten sich in der Heidelberger

Kohorte ähnlich wie diejenigen mit TT-Genotyp, in der Göttinger Kohorte mehr wie diejenigen mit CC.

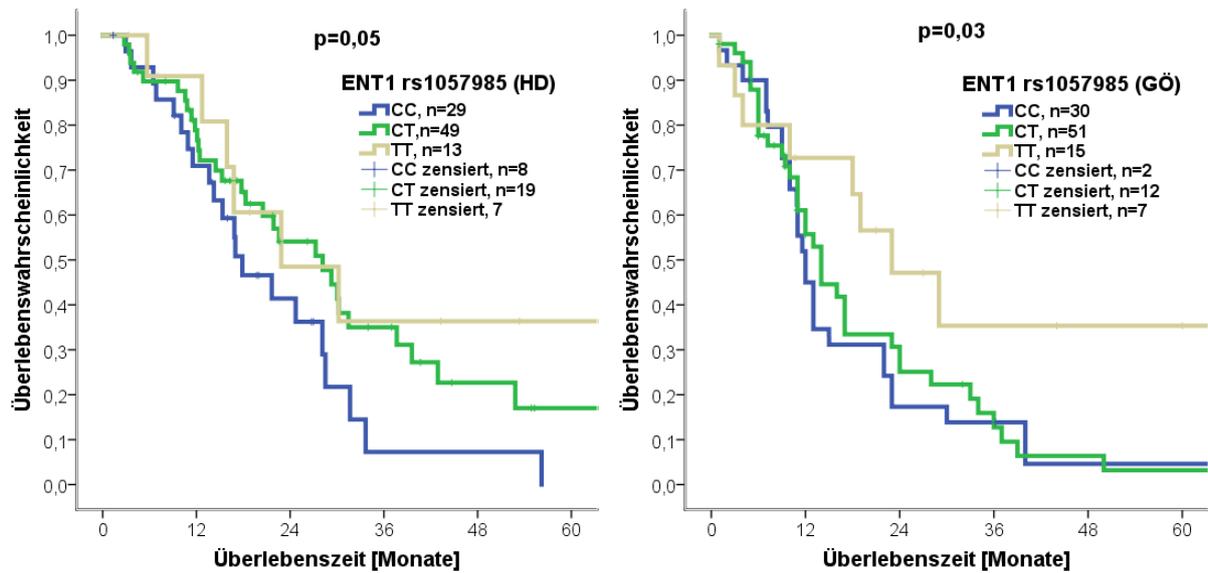
Für eine weitere ENT1-Genvariante (rs45573936), ein mit etwa 1,6% Häufigkeit in der deutschen Bevölkerung seltener Aminosäureaustausch, wurde für Patienten mit R0- bzw. R1-Operationsstatus und anschließender Gemcitabin-Therapie eine Assoziation mit dem Gesamtüberleben postuliert (Abb. 10 rechts, $p = 0,000001$; Schaudinn 2013). Träger des Variantenallels hatten dabei ein deutlich verkürztes Überleben. Dieser Effekt zeigte sich zwar auch in der Heidelberger Kohorte mit einem p -Wert $< 0,05$ (Abb. 10 links). Da letzteres jedoch auf nur einer einzigen Person mit dieser genetischen Konstellation beruht, konnte hier *de facto* keine Aussage getroffen werden.

Bezüglich des konzentrativen Nukleosidtransporters CNT1 (SLC28A1) sah man in den beiden Patientenkohorten einen gegenläufigen Einfluss des Variantenallels von rs4980346 auf die Überlebenszeit (Abb. 11 links und rechts). Dies sprach gegen eine tatsächliche Bedeutung dieses Polymorphismus im untersuchten medizinischen Kontext und wurde daher in der dritten Kohorte aus Hamburg (siehe unten) nicht mehr analysiert.

Für die in Bezug auf den Gemcitabin-Metabolismus katabole DCTD war die Wildtyp-Konfiguration für den Promotor-Polymorphismus rs5016499 in den Kohorten aus Heidelberg und Göttingen mit einer etwas günstigeren Prognose im Vergleich mit dem heterozygoten Genotyp verbunden (Abb. 12). Für die wenigen Patienten mit homozygotem Variantenallel stellte sich der Verlauf uneinheitlich dar.

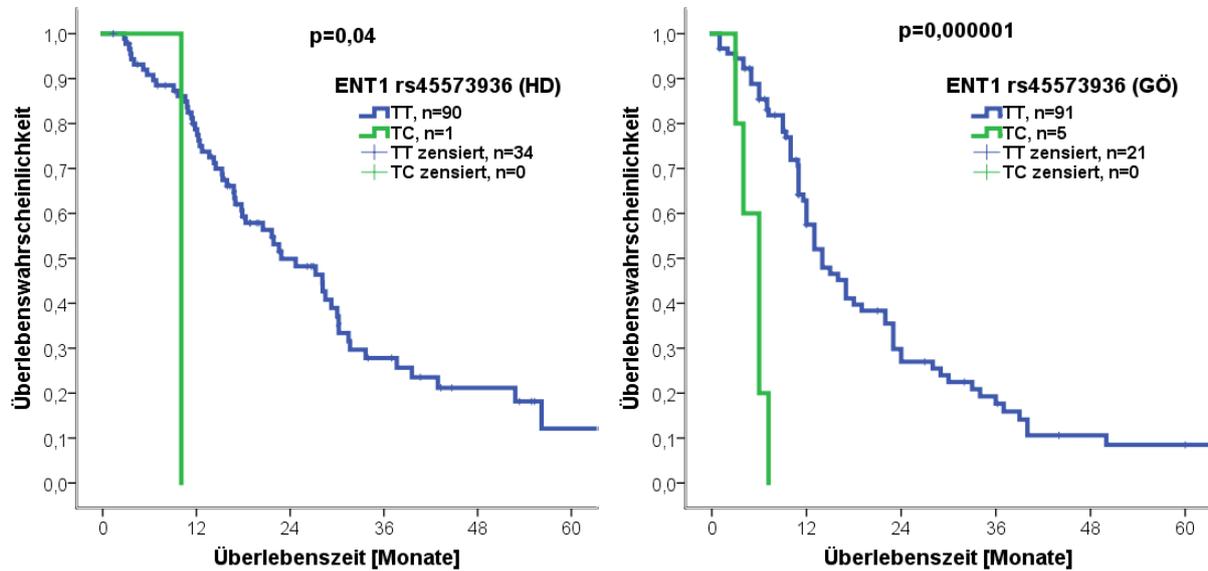
Ein konsistenter Effekt war auch für die Variante rs1130609 in der 5'-UTR von RRM2 zu beobachten (HD: $p = 0,008$, GÖ: $p = 0,04$ nach Log-rank, Abb. 12links). Hier wirkte sich das Variantenallel günstig auf das Gesamtüberleben aus. Homozygotie für die Variante trat in der Kohorte aus Göttingen zehnmal auf und erwies sich hier als besonders vorteilhaft, in der Heidelberger Kohorte trugen nur drei Personen diese Genotyp-Konfiguration.

Hinsichtlich des Polymorphismus PTCH1 rs2236407 (Abb. 14) führte das Vorliegen des Variantenallels in beiden Patientenkohorten zu einem verkürzten Überleben ($p = 0,05$ bzw. $0,04$). Der Verlauf der einzelnen Genotyp-Konfigurationen in den Kaplan-Meier-Diagrammen, insbesondere des homozygoten Variantenallel-Status, ist jedoch uneinheitlich.



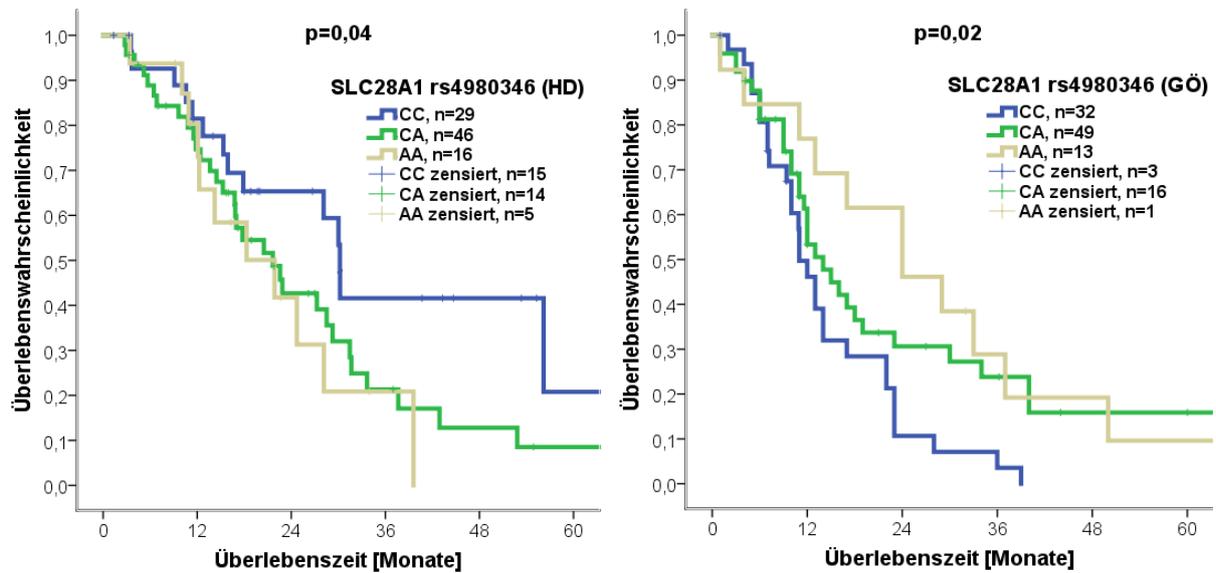
Patienten unter Beobachtung						Patienten unter Beobachtung						
	0	12	24	36	48		0	12	24	36	48	
CC	29	19	8	1	0	CC	30	16	5	4	1	
CT	49	35	18	10	4	1	CT	51	23	11	5	2
TT	13	9	4	3	1	1	TT	15	9	5	3	2

Abb. 9 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Promotorvariante ENT1-rs1057985. Zum Vergleich ist links die Kaplan-Meier-Grafik der Heidelberger und rechts der Göttinger Kohorte gezeigt, wobei die Farbkodierung der Genotypen korrespondiert. Der p-Wert gibt die statistische Signifikanz des Log-rank-Tests an, wobei zwischen den Variablen Wildtyp (CC), Heterozygotie (CT) und Varianten (TT) ein linearer Trend angenommen wurde. Die Anzahl der Patienten unter Beobachtung ist in 12-Monats-Abständen unterhalb der Grafik aufgeführt.



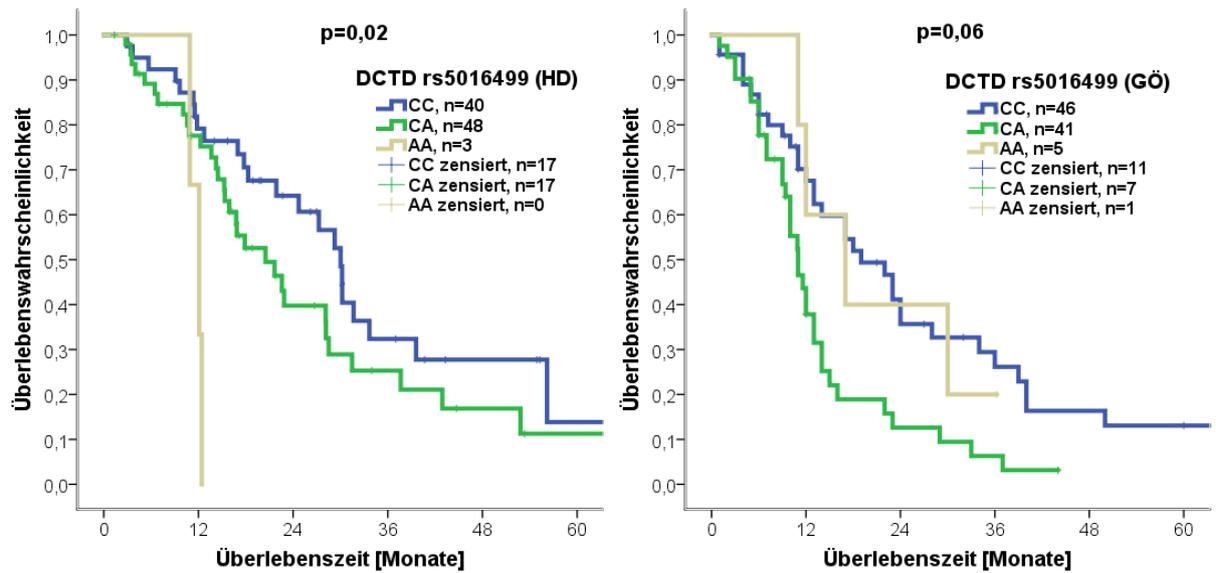
Patienten unter Beobachtung						Patienten unter Beobachtung					
	0	12	24	36	48		0	12	24	36	48
TT	90	63	30	14	7	2	TT	91	47	21	14
TC	1	0					TC	5	0		

Abb. 10 Überlebenszeit in Abhängigkeit der Aminosäurevariante ENT1-rs45573936. Weitere Erläuterungen zur verwendeten Darstellungsweise und statistischen Auswertung siehe Text unter Abb. 9.



Patienten unter Beobachtung							Patienten unter Beobachtung						
CC	29	21	12	7	4	1	CC	32	14	3	2	0	
CA	46	31	14	6	3	1	CA	49	23	10	7	3	3
AA	16	11	4	1	0		AA	13	10	8	3	1	1

Abb. 11 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Genvariante SLC28A1-rs4980346. Für Erläuterungen zu Darstellungsweise siehe Text unter Abb. 9.



Patienten unter Beobachtung							Patienten unter Beobachtung						
CC	40	29	18	8	4	1	CC	46	27	15	9	5	4
CA	48	32	12	6	3	1	CA	41	15	4	2	0	
AA	3	2	0				AA	5	4	2	1	0	

Abb. 12 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Promotorvariante DCTD-rs5016499. Weitere Erläuterungen zu den Diagrammen befinden sich unterhalb der Abb. 9.

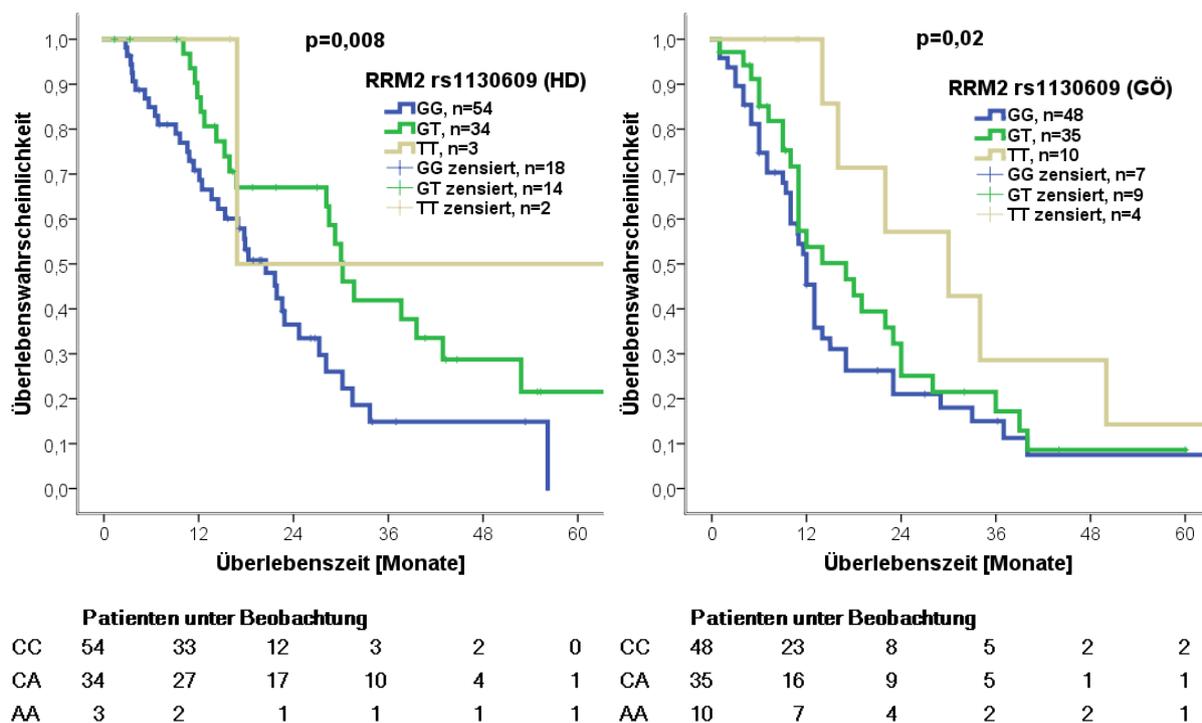


Abb. 13 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Genvariante RRM2-rs1130609. Die Darstellungsweise und statistische Testung ist analog zu der in Abb. 9.

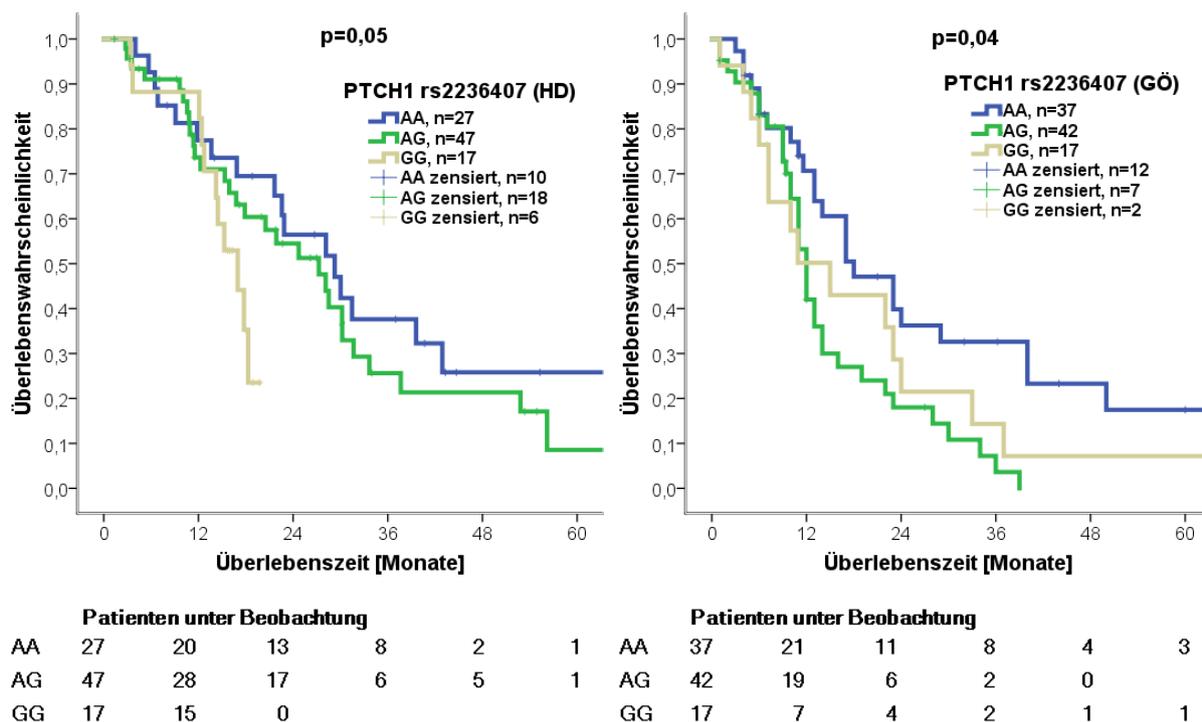


Abb. 14 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Genvariante PTCH1-rs2236407. Für Erläuterungen zu den Diagrammen siehe Text unter Abb. 9.

4.5.4 Überprüfung der stärksten Assoziationen an weiterer Kohorte (HH)

Die reproduzierbar mit der Überlebenszeit in der Heidelberger und Göttinger Kohorte assoziierten fünf Genpolymorphismen (Kapitel 4.5.3) wurden an einer weiteren Patientenkohorte aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) erneut auf

Replizierbarkeit geprüft. Die Kohorte bestand aus 159 Patienten, davon waren 64 Frauen und 95 Männer. Zu Beginn der Gemcitabin-Therapie war der jüngste Patient 28 und der älteste 88 Jahre alt, der Altersmedian lag bei 65 Jahren und ist damit vergleichbar mit den Kohorten aus Heidelberg und Göttingen (Tab. 13). Patienten mit einem Tumor-Resektionsstatus von 2 ($n = 19$) wurden wegen der *a priori* schlechteren Prognose von weiteren Analysen ausgeschlossen. Gleiches galt in umgekehrter Weise für 16 Patienten mit einem G1-Differenzierungsgrad des Pankreaskarzinoms. Somit gingen in die Analyse 124 Patienten aus Hamburg ein. Im Vergleich mit der Heidelberger und Göttinger Kohorte (Tab. 13) war der prozentuale Anteil von Patienten mit Lymphknotenmetastasen geringer (HD: 89%, GÖ: 77%, HH: 69%). Der prozentuale Anteil an Patienten mit T3/4 Tumoren war in der Hamburger Kohorte etwas geringer (HD: 96%, GÖ: 89%, HH: 82%). Auf die Heidelberger Kohorte bezogen hatten mehr als dreimal so viele Patienten Fernmetasen ($n = 54$). Die mediane Überlebenszeit betrug 11,5 Monate (Bereich 2-69 Monate). Zum Abschluss der Datenerhebung waren bereits alle Patienten der HH-Kohorte verstorben.

In Tab. 15 sind für die fünf Kandidaten-Polymorphismen die Ergebnisse des Log-rank-Tests und der Cox-Regression – basierend auf den jeweiligen Genotypausprägungen – zusammengefasst (ein möglicher Alleldosis-Effekt ist dabei auch berücksichtigt). Dabei zeigte sich nur für die ENT1-Promotorvariante rs1057985 nach Adjustierung auf die nicht genetischen Einflussfaktoren Patientenalter sowie TNM-Status in einer Cox-Regression ein mit $p = 0,03$ besseres Überleben durch das Variantenallel. Wurden die Patienten mit homozygotem Variantenallel der kombinierten Gruppe aus homozygotem Wildtyp-Allel und heterozygotem Genotypstatus gegenüber gestellt, zeigte sich in der univariaten Cox-Analyse ein Überlebensvorteil für diejenigen mit homozygotem Variantenallel ($p = 0,02$). Auch bei Betrachtung mit o.g. Faktoren bestätigte sich dieser Einfluss mit einem p-Wert von 0,006. Dieser Befund ist somit auch unter Berücksichtigung multiplen Testens (Grenzwert bei fünf Varianten 0,01) statistisch signifikant. Das homozygote Variantenallel des Genpolymorphismus PTCH1 rs2236407 war bei Gegenüberstellung mit der kombinierten Gruppe aus homozygotem Wildtyp und heterozygotem Genotyp mit einem verlängerten Überleben verknüpft ($p = 0,03$ nach univariater Analyse).

Gen	rs-Nummer	Log-rank-Test, p-Wert ¹	Cox-Regression	
			p-Wert ²	HR (95%KI) ³
ENT1	rs45573936	0,7	1	1 (0,5–2,2)
	rs1057985	0,2	0,03	0,7 (0,6–1)
PTCH1	rs2236407	0,2	0,1	0,8 (0,7–1,1)
RRM2	rs1130609	0,1	0,2	0,9 (0,7–1,3)
DCTD	rs5016499	0,9	0,7	0,8 (0,6–1,1)

Tab. 15 Weitere Replikationsstudie (HH) für die oben assoziierten Genvarianten (siehe 4.5.3). ¹Die Berechnung des p-Wertes erfolgte im univariaten Log-rank-Test, zwischen den verschiedenen Genotypausprägungen der Genvarianten wurde ein linearer Trend angenommen. ²p-Wert entsprechend einem kombinierten Cox-Modell unter Einschluss der nicht-genetischen Faktoren Patientenalter und TNM-Status, wobei die diskreten Variablen (alle außer Alter) nicht-kategorial definiert wurden. ³Die Hazard Ratio gibt für die Genpolymorphismen das relative Sterberisiko mit dem 95% Konfidenzintervall im kombinierten Cox-Modell an.

4.6 Patientendaten der Präparate für IHC-Analysen

Die immunhistochemischen Untersuchungen (IHC) erfolgten an in Paraffin eingebetteten Tumorgewebeschnitten von 103 in Göttingen wegen eines duktales Adenokarzinom des Pankreas kurativ bzw. palliativ operierten Patienten. Die allgemeinen und klinischen Charakteristika der Patienten finden sich in Tab. 16. In einem univariaten Cox-Modell war der Einfluss auf Überlebenszeit für den Resektionsstatus $p = 0,005$, für das Grading 0,008, für den T-Status 0,04, für den Lymphknoten-Status 0,1 und für die Fernmetastasierung 0,1.

Anzahl der Patienten	103
Alter [Jahren], Median (Bereich)	67 (44 - 89)
Geschlecht, Anzahl (%)	
Frauen	51 (49)
Männer	52 (51)
T-Status, Anzahl (%)	
klassifiziert	103
≤ 2	9 (9)
3 or 4	94 (91)
N-Status, Anzahl (%)	
klassifiziert	101
0	20(20)
1	81(80)
M-Status, Anzahl (%)	
klassifiziert	42
0	34 (81)
1	8 (19)
Resektionsstatus, Anzahl (%)	
klassifiziert	103
0	42 (41)
1	47 (45)
2	2 (2)
nicht reseziert	12 (12)
Grading, Anzahl (%)	
klassifiziert	103
G1-2	6 (6)
G2	65 (63)
G2-3	9 (9)
G3	23 (22)
Überlebenszeit [Monate], Median (Min-Max)	11 (1 - 124)

Tab. 16 Allgemeine und klinische Charakteristika des IHC-Kollektivs

Das Vorgehen bei der immunhistochemischen Färbung und der anschließenden semiquantitativen Auswertung der Schnittpräparate wird im Methodenteil Kapitel 3.3.5 und 3.3.6 ausführlich dargestellt. Alle Schnitte wurden durch mich und eine erfahrene Ärztin der Abteilung für Pathologie unabhängig voneinander ausgewertet und mit Punktwerten versehen. Für die statistische Analyse wurden beide Auswertungen unabhängig voneinander betrachtet.

Die Morphologie der Tumorzellen in den einzelnen Präparaten stellte sich erwartungsgemäß heterogen dar. Die Tumordrüsen waren unregelmäßig im Stroma angeordnet und bei einigen Präparaten zeigten sich Nervenscheideninvasionen. In Präparaten von zwei Patienten waren keine Tumorzellen nachweisbar, diese wurden daher von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

4.7 Immunhistochemie ENT1

In Anbetracht der festgestellten Abhängigkeit des Gesamtüberlebens von der Promotorvariante rs1057985 (siehe Kapitel 4.5.3 und 4.5.4) wurde die ENT1-Proteinexpression in Tumorzellen immunhistochemisch untersucht. Wie in der Einleitung dargelegt, wurde in der Literatur bereits mehrfach ein Einfluss der ENT1-Expression auf die Überlebenszeit. Die zu erhebenden immunhistochemischen Daten sollten demzufolge sowohl mit der Überlebenszeit als auch mit dem Polymorphismus rs1058985 in Beziehung gesetzt werden.

Für die Analyse standen insgesamt 101 Paraffinschnitte mit Nachweis von Tumorzellen (Tab. 16) zur Verfügung. Eines der Präparate wurde wegen eines zu geringen Tumorzellanteils nicht weiter berücksichtigt. Eine positive ENT1-Expression ließ sich im Zytoplasma, im Kern und in der Zellmembran nachweisen, die Färbeintensität wurde jeweils mit vier Kategorien bewertet (0-3). Dabei wurden alle drei Kompartimente von zwei unabhängigen Personen (von einer ärztlichen Mitarbeiterin der Abteilung Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen [P1] und von mir [P2]) ausgewertet. Eine starke Korrelation war zwischen Zellkern und Zytoplasma zu sehen, eine geringere zwischen Zellkern und Zellmembran und nahezu keine zwischen Zytoplasma und Zellmembran (Tab. 17).

Parameter	P1		P2	
	Zytoplasma	Zellkern	Zytoplasma	Kern
Zellmembran	rho=0,06; p=0,6	rho=0,24; p=0,02	rho=0,17; p=0,1	rho=0,30; p=0,002
Zytoplasma		rho=0,46; p<0,001		rho=0,70; p<0,001

Tab. 17 Korrelation der ENT1-Expression zwischen den Zellkompartimenten. Die Berechnung des p-Wertes und des Korrelationskoeffizienten (rho) erfolgte in der bivariaten Korrelationsanalyse nach Spearman. P1 = Person 1, P2 = Person 2, welche unabhängig voneinander die immunhistochemische Bewertung vornahmen.

Eine Analyse der ENT1-Expression in den drei genannten Kompartimenten in Bezug auf Überlebenszeit, Tumorstatus, Resektionsstatus, Alter und Geschlecht der Patienten sowie die Genvariante rs1057985 ist in den folgenden Unterkapiteln dargestellt.

4.7.1 Zytoplasmatisches ENT1-Protein

Die vier Farbintensitäten der zytoplasmatischen ENT1-Färbung (siehe Methodenteil 3.3.6) sind beispielhaft in Abb. 15 gezeigt. Entsprechend der jeweiligen Anteile der Färbintensitäten wurde für jedes der 100 Pankreaskarzinom-Präparate ein immunoreaktiver Score für die ENT1-Expression ermittelt (Abb. 16). Diese war bei einem Großteil der Präparate schwach bis mäßig ausgeprägt. Die Zahlenwerte des immunoreaktiven Scores für die ENT1-Expression wurden in einer univariaten Cox-Regression-Analyse auf eine Beeinflussung der Überlebenszeit der Patienten getestet. Dabei ergab sich ein längeres Überleben bei einer höheren ENT1-Expression, sowohl für die von der Pathologin als auch für die von mir ausgewerteten Färbungen (in beiden Fällen *Risk Ratio* = 0,994 [95% Konfidenzintervall: 0,990-0,998], $p=0,01$). Auch bei Betrachtung unter Einbeziehung der Parameter Resektionsstatus, Grading, Geschlecht und Alter hatte die ENT1-Expressionsstärke einen Einfluss auf die Überlebenszeit (in der immunhistochemischen Auswertung der Pathologin $p = 0,05$ und in meiner 0,03).

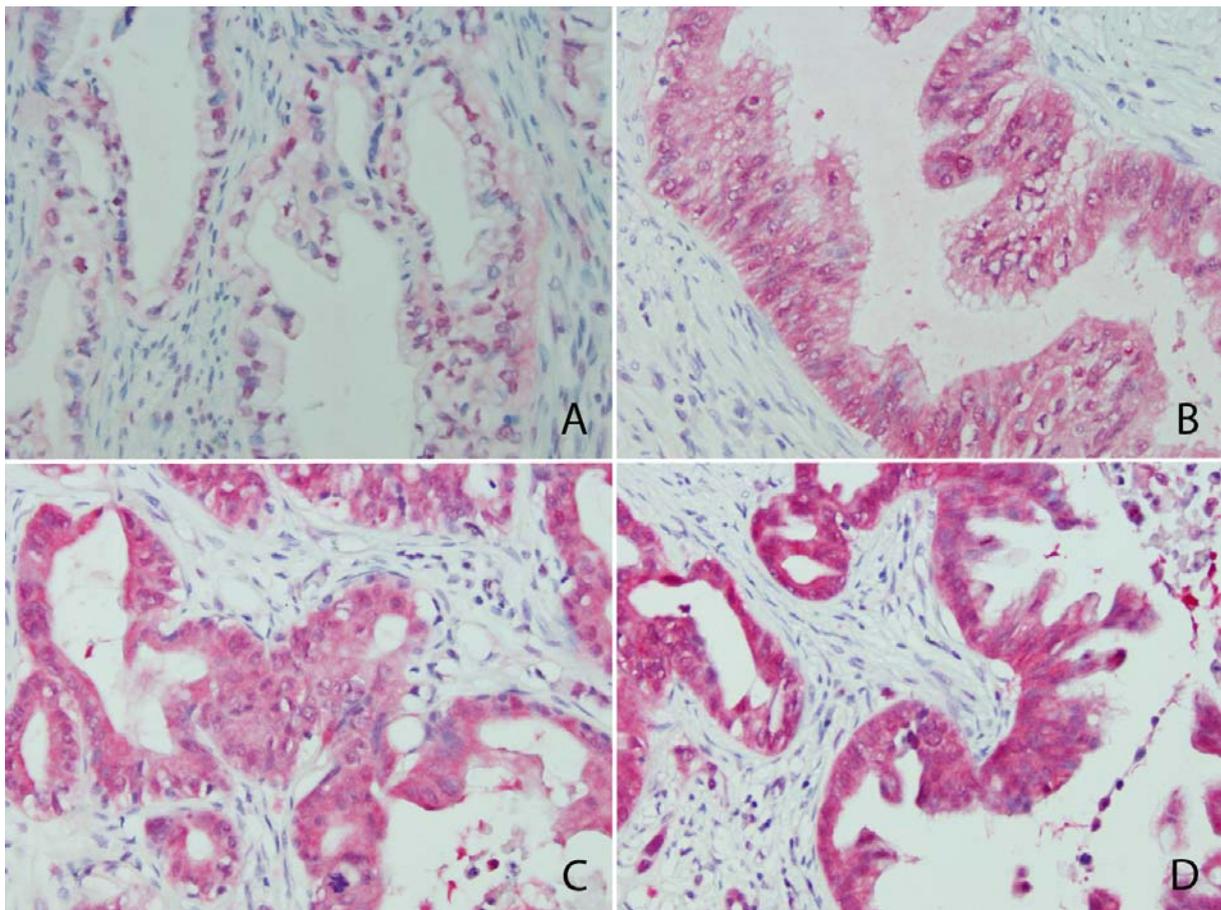


Abb. 15 Beispiel für die vier Kategorien der zytoplasmatischen ENT1-Färbintensität (rot). A) negativ, B) einfach positiv (1+), C) zweifach positiv (2+) und D) dreifach positiv (3+). Die Kerne wurden mit Hämalaun (blau) gegengefärbt. Die mit Wärmeausdehnung geschnittenen Präparate hatten einen durch Messer von 1-2 μm und sind in 20-facher Vergrößerung dargestellt.

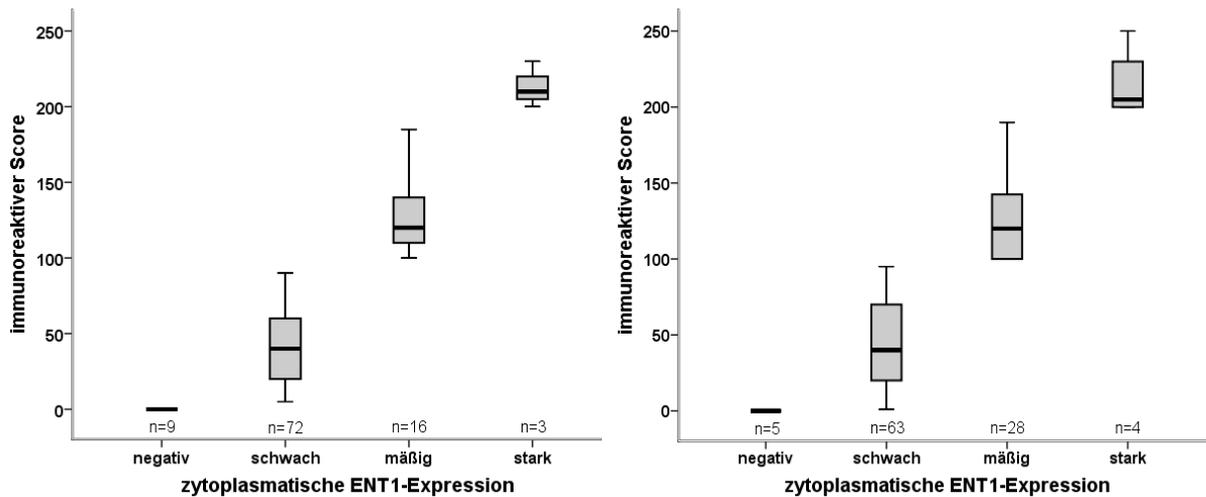


Abb. 16 Zytoplasmatische ENT1-Expression in Abhängigkeit der immunoreaktiven Scores. Bei der Darstellung mittels Boxplots ist der Median der Verteilung durch einen horizontalen schwarzen Strich gekennzeichnet, in der grau markierten Box liegen 50% der Werte mit dem Q1-Quartil als unterer und dem Q3-Quartil als oberer Grenze. Außerhalb davon liegende Werte sind in Abhängigkeit des Abstandes von der Box als vertikale Striche mit horizontaler Begrenzung dargestellt, wenn die Abweichung von Q1 bzw. Q3 nicht mehr als das 1,5-fache des Interquartilabstandes (IQA) $Q3-Q1$ beträgt. Zur Berechnung dieses Scores wurde für jede der vier Kategorien die Farbintensität (d.h. 0-3) mit dem jeweiligen quantitativen Anteil (d.h. 0-100%) multipliziert und dann diese vier Zahlen addiert (möglicher Score-Bereich 0-300). Demzufolge wurden die Präparate in die vier Gruppen „negativ“ (Score von 0), „schwach“ (1-99), „mäßig“ (100-199) und „stark“ (≥ 200) eingeteilt (siehe auch Methodenteil Kapitel 3.3.6). Links ist das Boxplot-Diagramm für die Auswertung der Pathologin und rechts für meine dargestellt.

Wurden die Werte für den immunoreaktiven Score in zwei Gruppen eingeteilt, hatten Patienten mit einer hohen (mäßig bis starken) ENT1-Expression im Zytoplasma der Tumorzellen eine bessere Prognose als diejenigen mit niedrigen (negativ bis schwachen). Dieser Sachverhalt wird in den Kaplan-Meier-Diagrammen in Abb. 17 veranschaulicht.

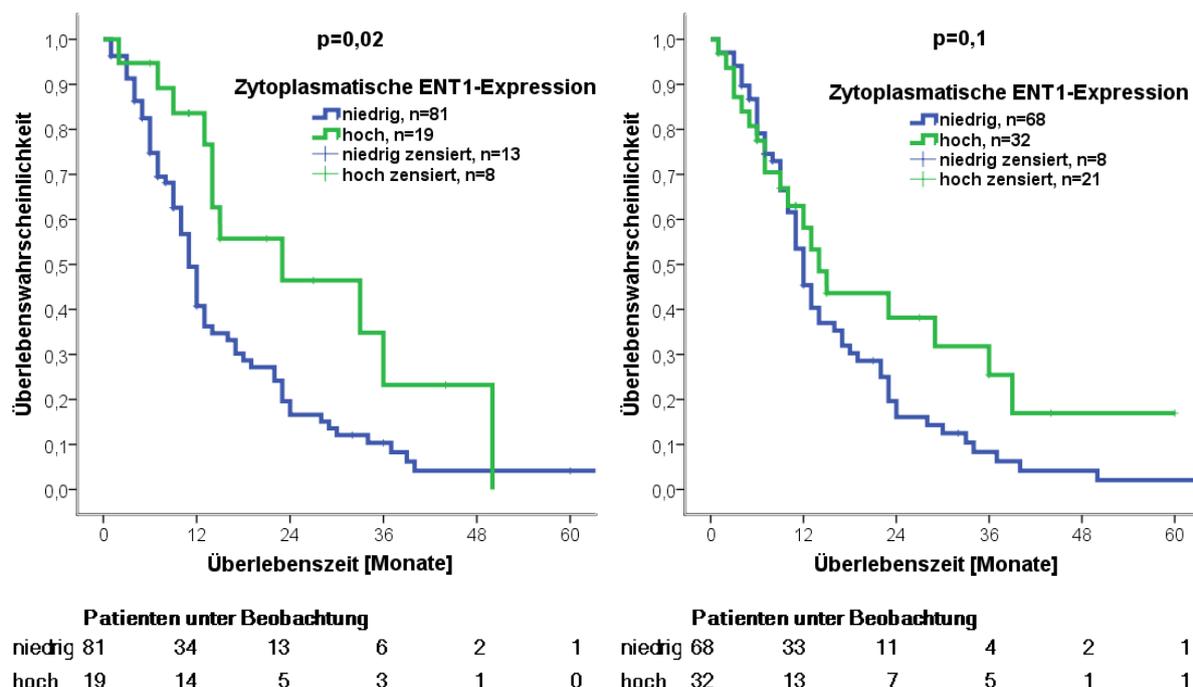


Abb. 17 Relation zwischen Überlebenszeit und ENT1-Expression im Tumorzellzytoplasma. Nach Einteilung des immunoreaktiven Scores in die zwei Gruppen wurde eine niedrige Expression einerseits mit einer hohen andererseits verglichen. Der p-Wert gibt die statistische Signifikanz des Log-rank-Tests an. Zum Vergleich ist links die Kaplan-Meier-Grafik für die Auswertung der Pathologin und rechts für meine gezeigt. Die Anzahl der Patienten unter Beobachtung befindet sich unterhalb der Kaplan-Meier-Grafik.

Bezüglich der TNM-Klassifikation des Tumors zeigte sich tendenziell ein fortgeschritteneres Stadium bei geringerer ENT1-Expression. Ein Zusammenhang zwischen der oben erwähnten Genvariante rs1057985 und der Expression des ENT1-Proteins ließ sich nicht feststellen.

4.7.2 Nukleäres ENT1-Protein

Die Bewertung der Intensität des nukleären ENT1-Proteins erfolgte in analoger Weise wie zuvor für das Zytoplasma beschrieben. Hier zeigten fast alle Präparate ein positives Färbeverhalten (Abb. 18). Dabei war die Höhe der nukleären in ähnlicher Weise wie die der zytoplasmatischen ENT1-Proteinexpression unabhängig vom Untersucher mit der Überlebenszeit verknüpft ($p = 0,02$ im univariaten Cox-Modell). Unter Einbeziehung von Resektionsstatus, Grading, Geschlecht und Alter war der Einfluss des nukleären ENT1-Proteins auf das Überleben geringer ($p = 0,1$ bzw. $p = 0,08$).

Die Abhängigkeit des Gesamtüberlebens von einer dichotomisierten ENT1-Expression ist mittels Kaplan-Meier-Diagrammen (Abb. 19) dargestellt. Auch hier ging eine hohe Expression des ENT1-Proteins mit einer besseren Prognose einher.

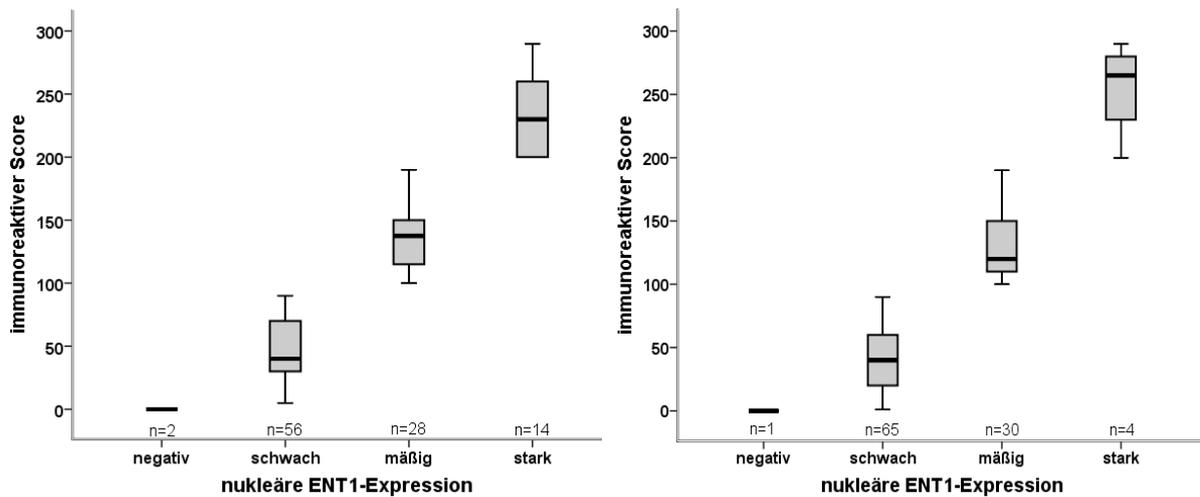
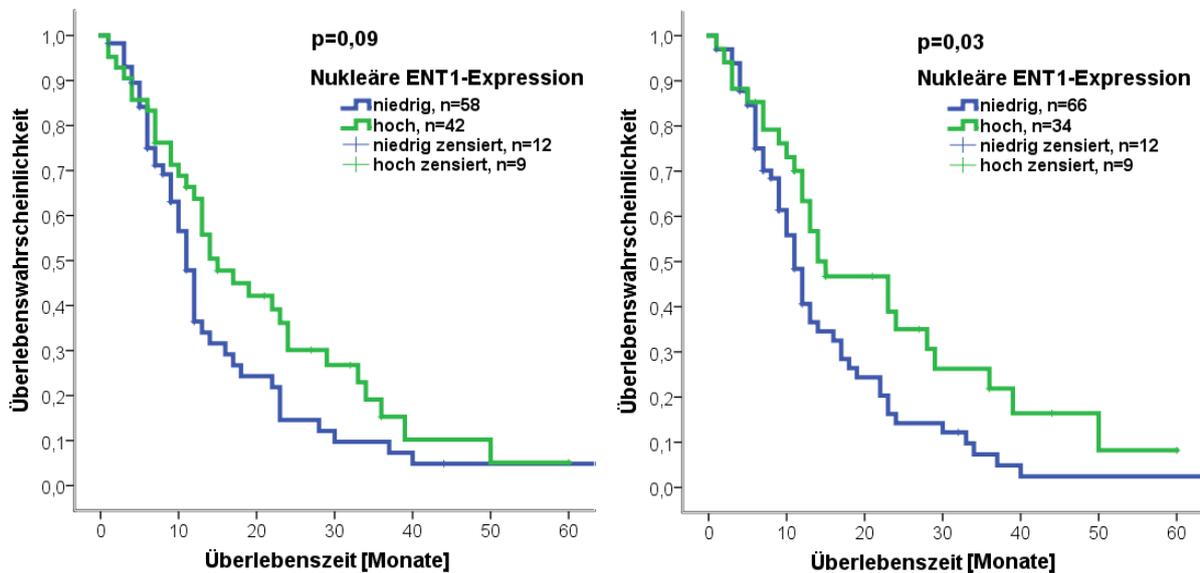


Abb. 18 Nukleäre ENT1-Expression in Abhängigkeit der immunreaktiven Scores. Die Berechnung und Darstellung des immunreaktiven Scores ist analog zu der in Abb. 16. Links ist das Boxplot-Diagramm für die Auswertung der Pathologin und rechts für meine dargestellt.



Patienten unter Beobachtung						Patienten unter Beobachtung					
niedrig	58	21	6	4	1	niedrig	66	25	8	3	1
hoch	42	25	12	5	2	hoch	34	21	10	6	1

Abb. 19 Relation zwischen Überlebenszeit und nukleärer ENT1-Expression in Tumorzellen. Bei der Dichotomisierung der ENT1-Expression wurde wie bereits zu Abb. 17. Der p-Wert gibt die statistische Signifikanz des Log-rank-Tests an. Zum Vergleich ist links die Kaplan-Meier-Grafik für die Auswertung der Pathologin und rechts für meine gezeigt.

Eine niedrige ENT1-Expression im Kern war sowohl in den Bestimmungen der Pathologin als auch in meinen mit einem höheren Grad an Entdifferenzierung assoziiert ($p = 0,03$ nach Spearman). Bei Vorliegen der Variante des Promotorpolymorphismus rs1057985 lag untersucherunabhängig mehr ENT1-Protein vor ($p = 0,04$ nach Jonckheere-Terpstra-Trend-Test).

4.7.3 Zellmembran gebundenes ENT1-Protein

Rund zwei Drittel der untersuchten Präparate zeigten keine Antigen-Antikörper-Reaktion der Zellmembran. Eine starke ENT1-Expression ließ sich in keinem der gefärbten Schnitte erkennen (Abb. 20). Eine Abhängigkeit der Überlebenszeit von der zellmembranösen ENT1-Expression bestand nicht. Es fand sich keinerlei Assoziation der ENT1-Expression in der Zellmembran mit den in Tab. 16 genannten Parametern sowie der Genvariante rs1057985.

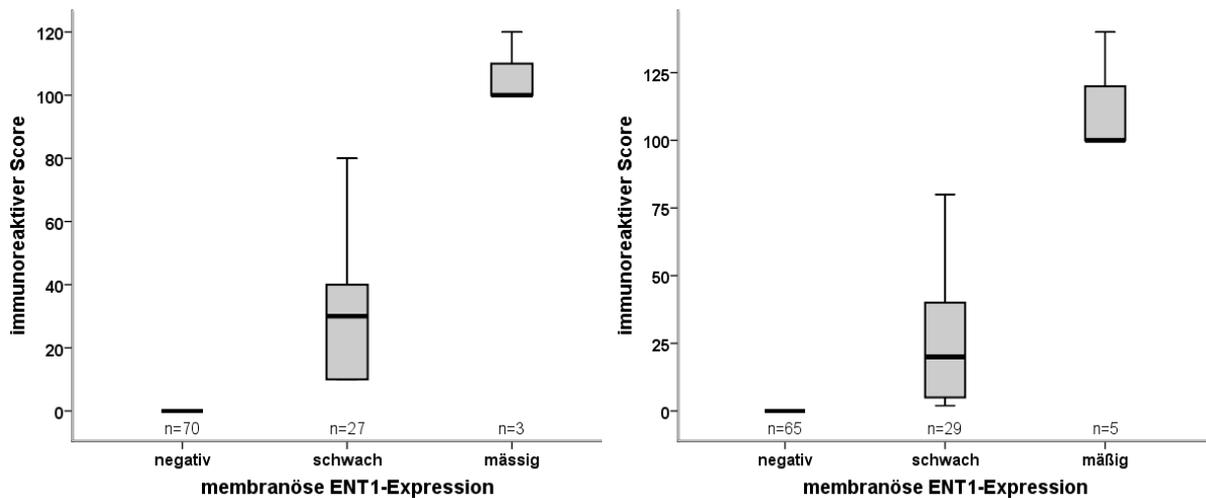


Abb. 20 Zellmembranöse ENT1-Expression in Abhängigkeit der immunoreaktiven Scores. Die Berechnung und Darstellung des immunreaktiven Scores ist analog zu der in Abb. 16. Links ist das Boxplot-Diagramm für die Auswertung der Pathologin und rechts für meine dargestellt.

4.8 Immunhistochemie RRM2

Die immunhistochemische Untersuchung von RRM2 erfolgte aufgrund der beobachteten Abhängigkeit des Gesamtüberlebens vom Genpolymorphismus rs1130609 (siehe Kapitel 4.5.3 und 4.5.4). Die erhobenen RRM2-Expressionsdaten wurden mit der Überlebenszeit sowie der Genvariante rs1130609 in Beziehung gesetzt. In die Untersuchung konnten 101 Paraffin-Schnitte mit histologisch gesicherten Tumorzellanteilen eingeschlossen werden (Kapitel 4.6). Eine positive RRM2-Expression wurde im Zytoplasma, in der Zellmembran und im Kern beobachtet. Nebenbefundlich zeigten sich in nahezu allen Präparaten stark positiv gefärbte Inselzellen. Die Kategorisierung der Farbintensitäten erfolgte auch hier von 0 bis 3 und wurde wie im Kapitel 4.7 beschrieben, von zwei unabhängigen Untersuchern (P1 und P2) durchgeführt. Zunächst wurde überprüft, welche Beziehungen zwischen der RRM2-Expression in den drei untersuchten Zellkompartimenten bestehen (Tab. 18). Dabei ergaben sich abhängig vom Untersucher zum Teil unterschiedliche Korrelationen, am ehesten scheint ein schwach positiver Zusammenhang in der RRM2-Expression zwischen Zytoplasma und Zellmembran vorzuliegen.

Parameter	P1		P2	
	Zytoplasma	Zellkern	Zytoplasma	Zellkern
Zellmembran	rho=0,2; p=0,09	rho=0,05; p=0,6	rho=0,3; p=0,007	rho=0,05; p=0,6
Zytoplasma		rho=0,2; p=0,09		rho=0,1; p=0,3

Tab. 18 Wechselbeziehungen der RRM2-Expression zwischen den Zellkompartimenten. Die Berechnung des p-Wertes und des Korrelationskoeffizienten (rho) erfolgte in der bivariaten Korrelationsanalyse nach Spearman.

Die Analyse der RRM2-Expression in den drei erwähnten Zell-Kompartimenten in Bezug auf Überlebenszeit, Tumorstatus, Resektionsstatus, Alter und Geschlecht der Patienten sowie die Genvariante rs1130609 wird in den folgenden drei Unterkapiteln dargestellt.

4.8.1 Zytoplasmatisches RRM2

Die vier Farbintensitäten der zytoplasmatischen RRM2-Färbung sind beispielhaft in Abb. 21 gezeigt. Auch hier galt die Höhe des immunoreaktiven Scores als Maß für die RRM2-Expression, welche in der Mehrzahl der Präparate schwach bis mäßig ausgeprägt war (Abb. 22). In etwa einem Fünftel der Präparate konnte kein RRM2 nachgewiesen werden. Die RRM2-Expression im Zytoplasma zeigte im Cox-Regressions-Modell keinen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten.

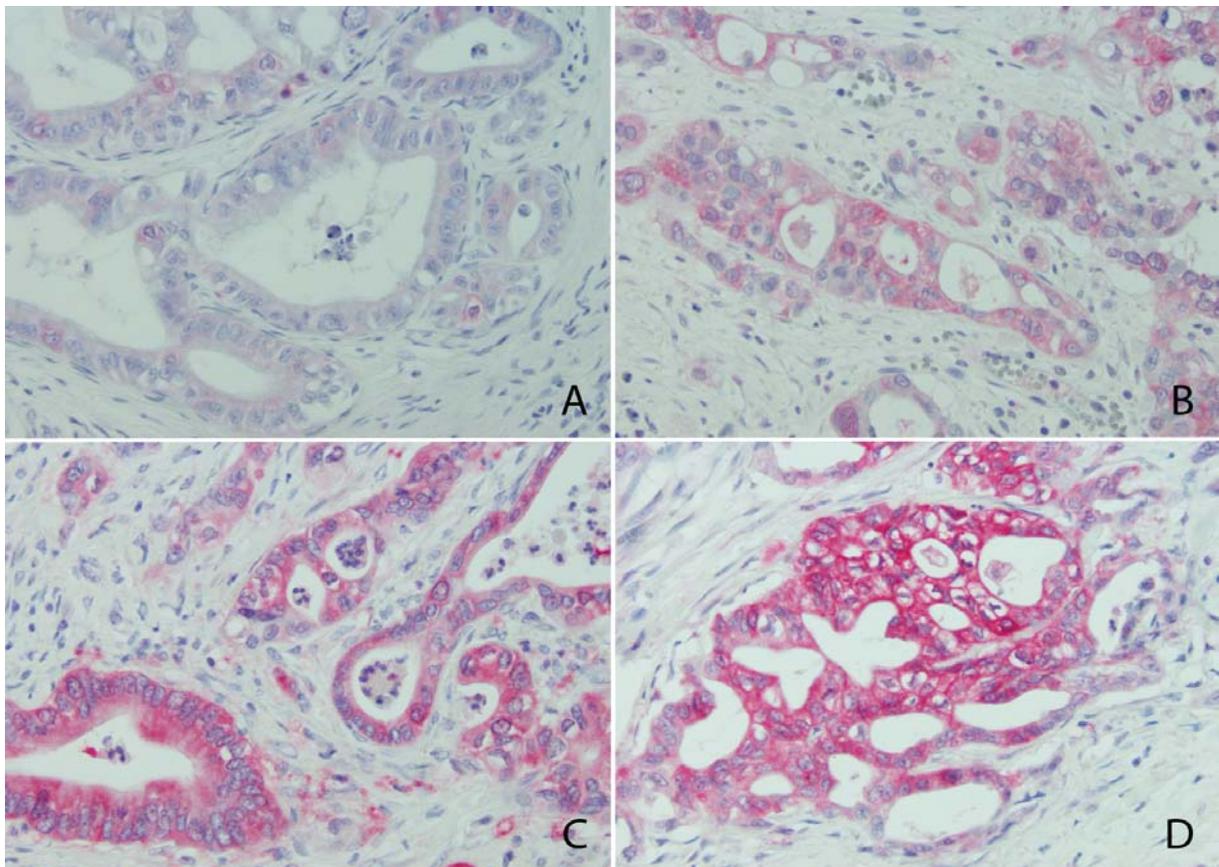


Abb. 21 Bildbeispiel für die vier Kategorien der zytoplasmatischen RRM2-Färbeintensität (rot). A) negativ, B) einfach positiv (1+), C) zweifach positiv (2+) und D) dreifach positiv (3+). Die Kerne wurden mit Hämalaun gebläut. Die Aufnahme der Bilder erfolgte bei 20-facher Vergrößerung.

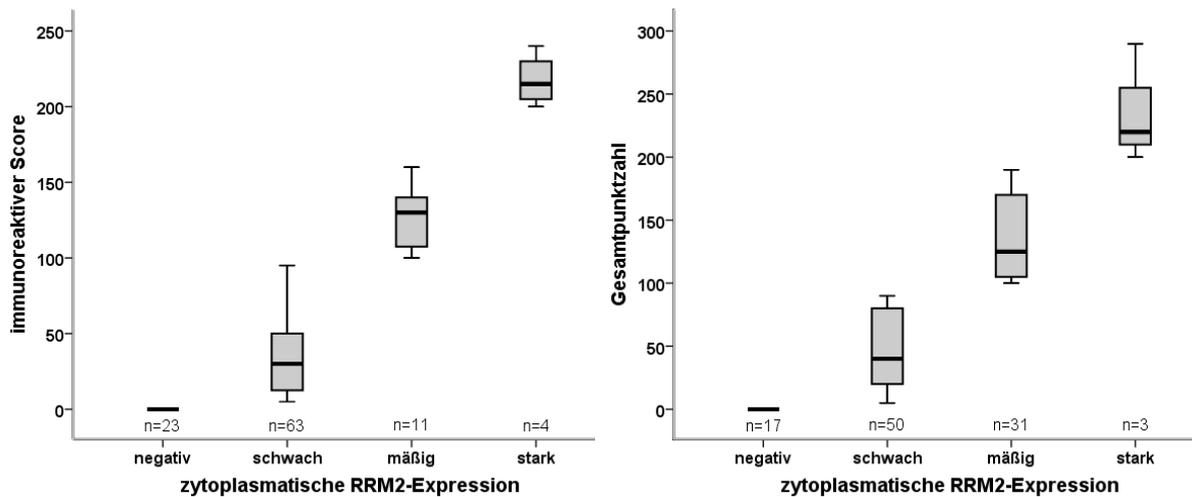


Abb. 22 Zytoplasmatische RRM2-Expression in Abhängigkeit der immunoreaktiven Scores. Die Berechnung und Darstellung des immunreaktiven Scores ist analog zu der in Abb. 16. Links ist das Boxplot-Diagramm für die Auswertung der Pathologin und rechts für meine dargestellt.

Hohes Alter bei Therapiebeginn war in sowohl in den Bestimmungen der Pathologin ($p = 0,005$ nach Spearman) als auch tendenziell in meinen ($p = 0,08$) mit einer niedrigen RRM2-Expression verbunden. Das Vorliegen des Variantenallels von rs1130609 in der 5'-UTR war in den von mir erhobenen Daten mit einer geringeren RRM2-Expression verknüpft ($p = 0,05$ nach Jonckheere-Terpstra-Test), in den entsprechenden Auswertungen der Pathologin jedoch nicht ($p = 0,6$).

4.8.2 Nukleäres RRM2

In 6 der insgesamt 101 untersuchten Präparate konnte eine schwache nukleäre Färbung beobachtet werden. Die Höhe der RRM2-Expression zeigte weder in univariaten noch multivariaten Analysen einen Einfluss auf die Überlebenszeit. Es gab keine Assoziationen der RRM2-Expression im Kern zu den in Tab. 16 aufgelisteten Parametern sowie zur Genvariante rs1130609.

4.8.3 Zellmembran-gebundenes RRM2

Bei etwa drei Viertel der Präparate war keine Antikörper-Färbung der Zellmembran nachweisbar. Bei den übrigen variierte die Expression des RRM2-Proteins zwischen schwach und mäßig, wobei eine schwache Expression den Großteil ausmachte (Abb. 23). Eine membranöse RRM2-Expression zeigte in der univariaten Analyse keinen Einfluss auf die Überlebenszeit.

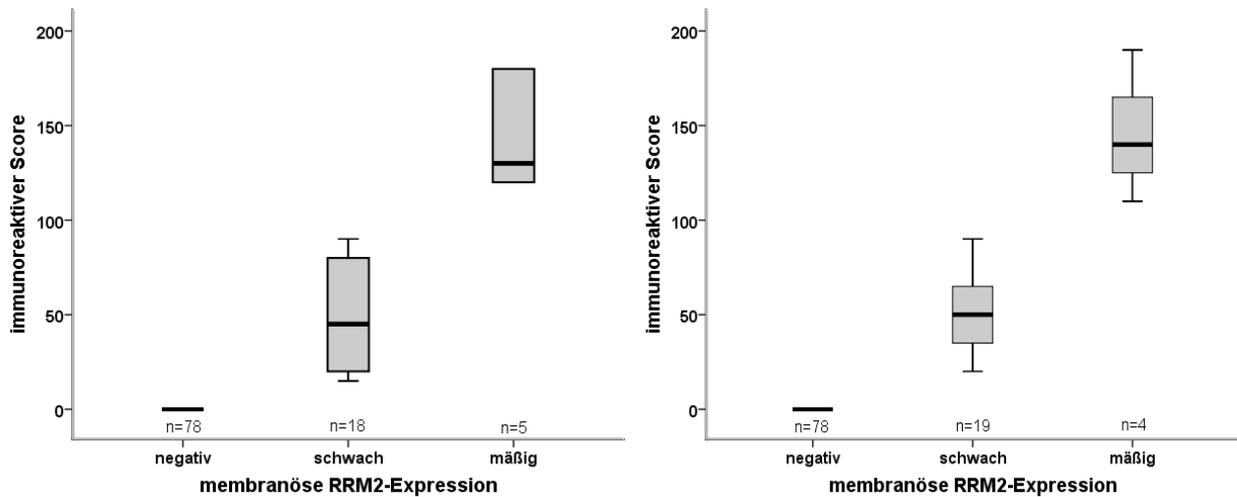


Abb. 23 Membranöse RRM2-Expression in Abhängigkeit der immunreaktiven Scores. Die Berechnung und Darstellung des immunreaktiven Scores ist analog zu der in Abb. 16. Links ist das Boxplot-Diagramm für die Auswertung der Pathologin und rechts für meine dargestellt.

In Präparaten mit einer hohen Expression von RRM2 in der Zellmembran war ein besseres Ergebnis bezüglich des Resektionsgrades erzielt worden ($p = 0,006$ nach Spearman, Zusammenhang unabhängig vom Auswerter der IHC-Färbungen). Ein Zusammenhang zwischen der Genvariante rs1130609 und der Höhe der RRM2-Expression konnte nicht festgestellt werden.

4.9 Immunhistochemie PTCH1

Von den auf Genpolymorphismen untersuchten Komponenten des Hedgehog-Signalwegs hatte sich eine Assoziation der PTCH1-Variante (rs2236407) mit der Überlebenszeit in den Kohorten aus Heidelberg und Göttingen gezeigt (siehe Kapitel 4.5.3). Daher sollte auch die PTCH1-Proteinexpression an den Paraffinschnitten bestimmt werden. Diese immunhistochemischen Daten wurden sowohl mit der Überlebenszeit als auch mit dem Polymorphismus rs2236407 in Beziehung gesetzt.

Über 95% untersuchten Präparate zeigten eine positive PTCH1-Expression im Zytoplasma. Eine membranöse oder nukleäre Expression von PTCH1 wurde nicht festgestellt. Der verwendete Antikörper färbte neben den Tumorzellen ebenfalls Inselzellen und Enterozyten positiv, was aber bei der Auswertung der Präparate nicht weiter berücksichtigt wurde.

4.9.1 Zytoplasmatisches PTCH1

Die vier Intensitäten der zytoplasmatischen PTCH1-Färbung sind exemplarisch in Abb. 24 gezeigt. In etwa drei Viertel der Präparate wiesen die Karzinomzellen eine schwache bis mäßige zytoplasmatische PTCH1-Proteinexpression auf (Abb. 25). Gemäß der univariaten Cox-Regression-Analyse war die Proteinexpression von PTCH1 nicht mit der Überlebenszeit

assoziiert. Dies galt sowohl für die von mir ($p = 0,3$) als auch für die von einer erfahrenen Pathologin ($p = 0,13$) vorgenommenen immunhistochemischen Bestimmungen. Auch in Betrachtung mit den Faktoren Resektionsstatus, Grading, Geschlecht und Alter zeigte sich keine Beeinflussung der Überlebenszeit durch die Expression von PTCH1.

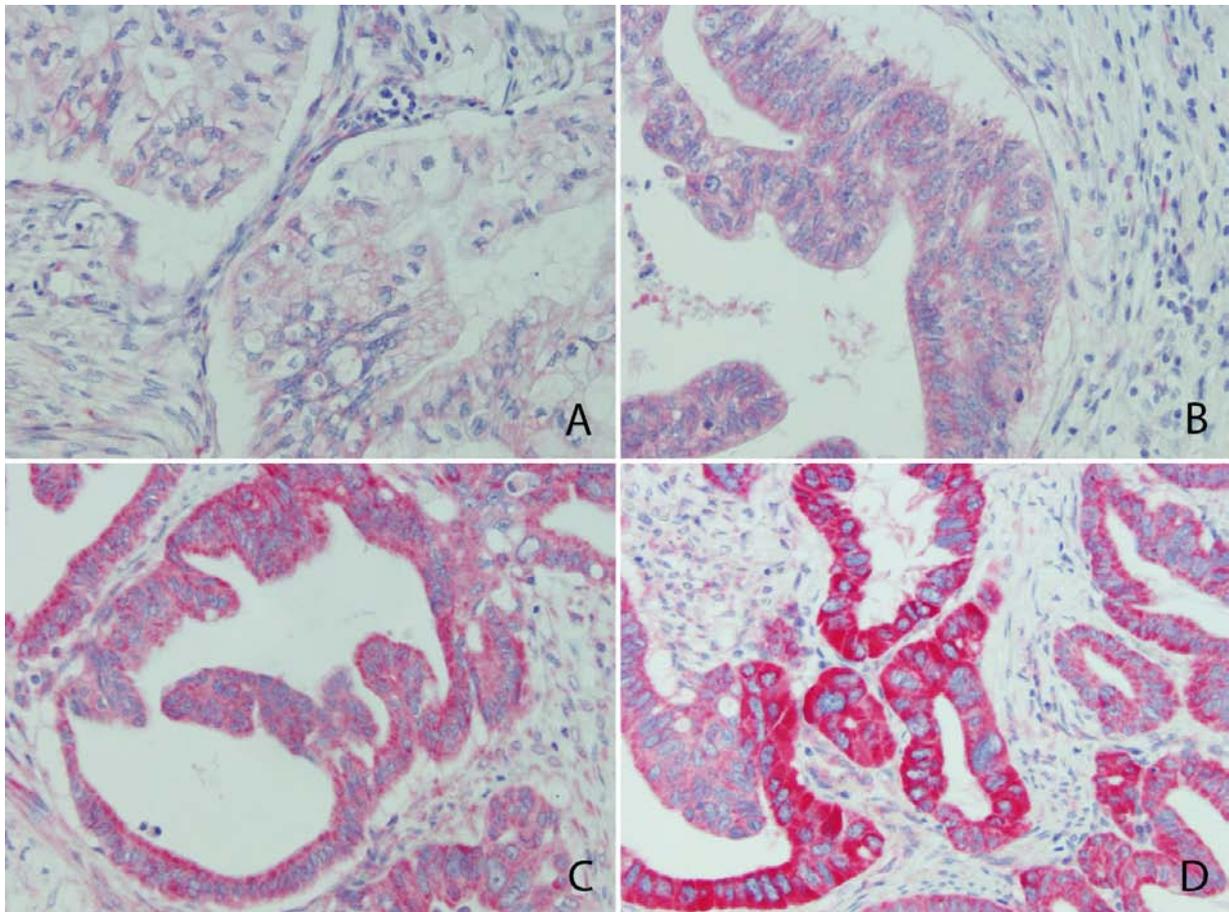


Abb. 24 Beispiel für die vier Kategorien der zytoplasmatischen PTCH1-Färbeintensität (rot). A) negativ, B) einfach positiv (1+), C) zweifach positiv (2+) und D) dreifach positiv (3+). Die Färbung der Kerne erfolgte mit Hämalaun (blau). Die Bilder sind bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

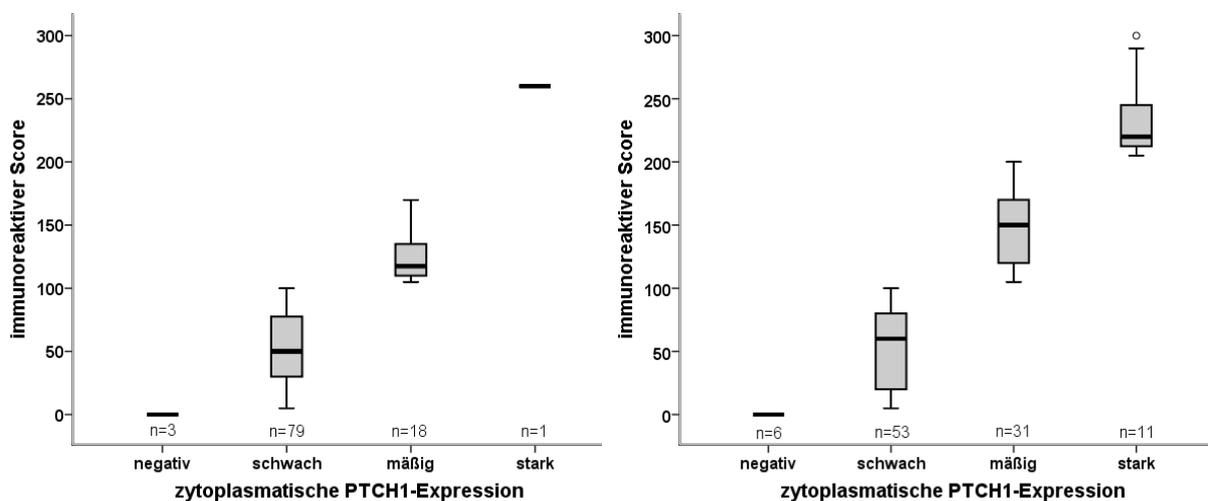


Abb. 25 Zytoplasmatische PTCH1-Expression in Abhängigkeit des immunoreaktiven Scores. Die Berechnung und Darstellungsweise des immunreaktiven Scores ist analog zu der in Abb. 16. Links ist das Box-Plot-Diagramm für die Bestimmungen der Pathologin und rechts für meine dargestellt. Mit dem Kreis ist ein Wert außerhalb des Q3-Quartils markiert.

Auffällig war, dass eine niedrigeren PTCH1-Expression mit einem höheren Patientenalter unabhängig vom Auswerter ($p = 0,02$ bzw. $0,001$ nach Spearman) und tendenziell mit einem häufigeren Auftreten von Fernmetastasen ($p = 0,02$ und $p = 0,14$ nach Jonckheere-Terpstra-Test) einherging. Die eingangs erwähnte PTCH1-Genvariante rs2234607 zeigte keine Assoziation zur Proteinexpression ($p = 0,2$).

4.10 Micro-RNA-Analysen

Die micro-RNA wurde aus in Paraffin eingebettetem Karzinomgewebe, wie im Methodenteil in Kapitel 0 beschrieben, extrahiert. Die untersuchten Gewebeproben entstammen den in Tab. 16 aufgeführten 103 Patienten, abzüglich der beiden nicht Tumor-tragenden Blöcke. Die mit Hilfe der RT-PCR gemessenen Expressionswerte der auf Basis von Literaturberichten ausgewählten micro-RNAs (miR10b, miR141, miR34a, miR21, miR200c) wurden zunächst auf ein gewichtetes Mittel der Expression von SNORD96A, SNORD68D und RNU6-2 als Referenz normiert. Diese Daten wurden dann auf mögliche Assoziationen mit der ENT1-, RRM2- und PTCH1-Proteinexpression sowie der Überlebenszeit analysiert.

4.10.1 Micro-RNA-Expression und Immunhistochemie

Die Expressionshöhe der fünf o.g. micro-RNAs wurde hinsichtlich eines potenziellen Einflusses auf die Proteinexpression von ENT1, RRM2 und PTCH1 untersucht. Jedoch zeigten sich zwischen den normierten Expressionsdaten der micro-RNAs paarweise starke Korrelationen untereinander (zumeist $p \leq 0,0001$ nach Spearman). Um einen artifiziellen Einfluss durch die Referenzgene auszuschließen, wurde deren Verwendung permutiert. Dazu wurden jeweils drei unterschiedliche Kombinationen aus den drei Referenzgenen gebildet und die darüber durchgeführte Normierung der fünf Zielgene mit der Normierung auf die Kombination aller drei Referenzgene in Bezug auf eine Korrelation mit den IHC-Daten verglichen. Dabei zeigten sich unabhängig von der Permutation höhere Transkriptzahlen von miR141c, 34a und 200c bei mehr zytoplasmatischem RRM2. Ein analoger, jedoch gegenüber der Permutation etwas weniger robuster Zusammenhang ergab sich zwischen miR34a und 10b mit dem ENT1-Protein in der Zellmembran.

4.10.2 Genexpression von micro-RNAs in Pankreaskarzinomzellen

Da sich bei der in Kapitel 4.10.1 durchgeführten Permutierung kaum Unterschiede zeigten, wurde für die Assoziationsanalyse mit der Überlebenszeit als Normierung das gewichtete Mittel aller drei miRNA-Referenzgene verwendet. Nach Analyse im univariaten Cox-Modell zeigte die Expressionshöhe der fünf untersuchten miRNAs im Tumorzellgewebe keinen Effekt auf das Gesamtüberleben. Auch in der Cox-Regression war unter Einbeziehung der

Einflussfaktoren Grading und Resektionsstatus die Expressionshöhe der miRNAs nicht mit dem Gesamtüberleben korreliert (Tab. 19).

miRNA	Cox-Regression	
	p-Wert ¹	HR (95%KI) ²
miR10b	0,9	1,3 (0,8–1,3)
miR34a	0,9	1,0 (0,8–1,2)
miR21	0,2	0,9 (0,7–1,1)
miR141	0,09	0,8 (0,7–1,1)
miR200c	0,2	0,9 (0,8–1,1)

Tab. 19 Einfluss der Expressionshöhe von miRNAs in Pankreaskarzinomzellen auf die Überlebenszeit. Die miRNA wurden unter Einbeziehung von Resektionsstatus und Grading in einem Cox-Modell analysiert. Bei den Einflussparametern wurde die übliche Kodierung verwendet. ¹p-Wert entsprechend des Cox-Modells als Option „Einschluss“ in SPSS. ²Die Hazard Ratio gibt das relative Sterberisiko für die entsprechenden Variablen (Risikofaktor) mit dem 95%-Konfidenzintervall an.

Nachfolgend wurde untersucht, ob die Expressionshöhe der miRNAs mit dem Grading, der Tumorausdehnung oder dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen verbunden ist. Dabei zeigte sich im nicht-parametrischen Jonckheere-Terpstra-Test eine Beziehung zwischen dem Grading einerseits und der Expression von miR141 ($p = 0,03$) bzw. 200c ($p = 0,05$) andererseits (Abb. 26). Dabei lag bei zunehmendem Grading auch eine tendenziell höhere Transkription von miR141 und miR200c vor. In ähnlicher Weise war die Expressionsstärke von miR200c sowie von miR21 und miR34a (Abb. 27) mit entsprechend ausgedehnterer lokaler Tumorausbreitung (T-Status) verknüpft.

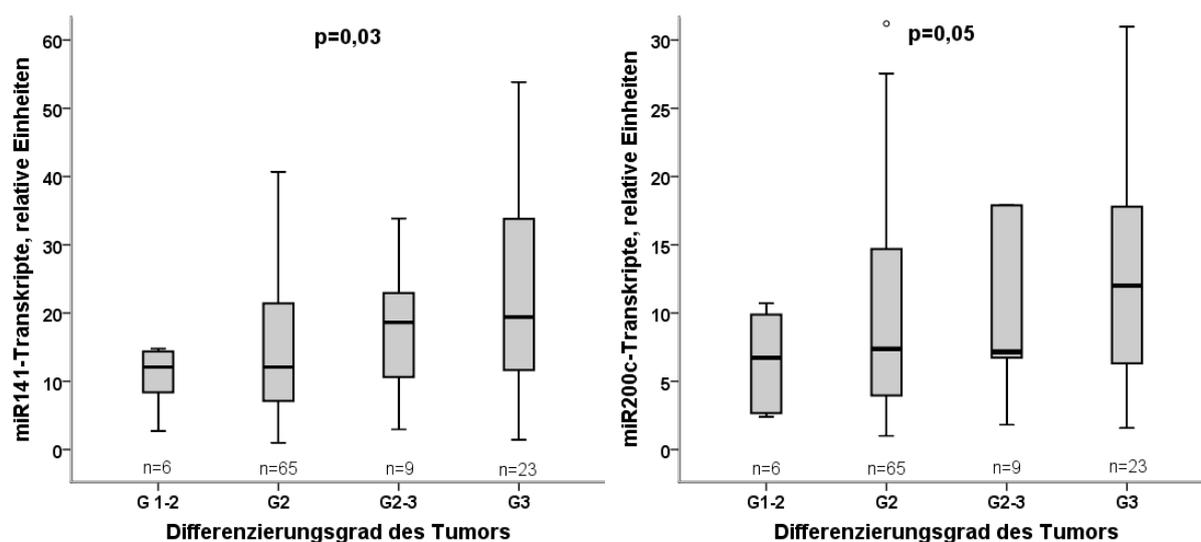


Abb. 26 Tumordifferenzierung in Abhängigkeit der miR141- und 200c-Genexpression. Die miRNA-Transkripte sind auf ein gewichtetes Mittel aus SNORD96A, SNORD68D und RNU6-2 normiert. Als Kreise sind, wenn Abweichungen von Q1 bzw. Q3 dargestellt, die das 1,5 bis 3-Fache des Interquartilabstandes (IQA) Q3-Q1 betragen, bei Sternen ist die Entfernung größer als das 3-Fache des IQA von Q1 bzw. Q3.

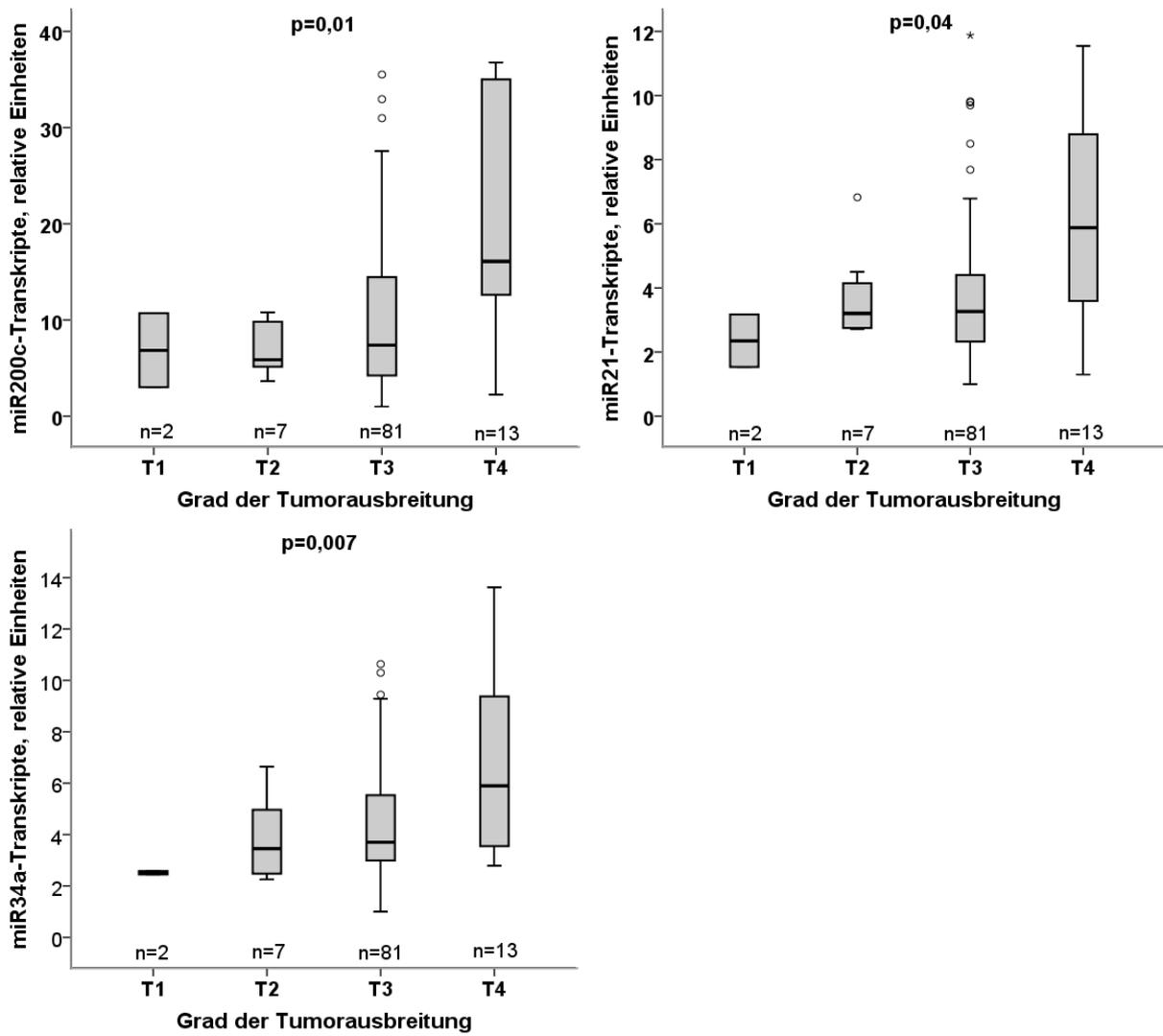


Abb. 27 Tumorausbreitung in Abhängigkeit der miR200c, miR21 und miR34a-Genexpression. Die Darstellungsweise und statistische Testung ist analog zu Abb. 26.

5 Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse meiner Arbeit sollen nachfolgend diskutiert und mit bestehenden Daten aus der Literatur bzw. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe verglichen werden. Im Zentrum stehen dabei die Befunde zum ENT1 (Immunhistochemie, Polymorphismen). Als weiteres aussichtsreiches Kandidatengen wurde der RRM2 identifiziert. Keinen eindeutigen Bezug zur primären Zielgröße Gesamtüberleben zeigten dagegen die Polymorphismen in den anderen untersuchten Genen einschließlich des Hedgehog-Signalwegs und auch nicht die auf Basis positiver Literaturdaten ausgewählten microRNAs.

5.1 ENT1

In den folgenden Unterkapiteln wird zunächst der reproduzierbar beobachtete Einfluss des SNPs rs1058985 in der Promotorregion des ENT1 auf die Überlebenszeit bei mit Gemcitabin behandelten Patienten mit Pankreaskarzinom diskutiert. In Anbetracht der Lokalisation dieses SNPs werden die eigenen Daten zur immunhistochemischen Analyse des ENT1 mit denjenigen der Literatur verglichen. Weiterhin konnte ich in meiner Studie zeigen, dass der ENT1-Proteingehalt von rs1057985 abhängig war und dies konsistent zu den Effekten auf die Überlebenszeit war. Eine zuvor postulierte Bedeutung der ENT1-Aminosäurevariante Ile216Thr (rs45573936) konnte hingegen nicht bestätigt werden (Schaudinn 2013).

5.1.1 Abhängigkeit des klinischen Outcome von SNP in Promotorregion

In drei unabhängigen klinischen Kohorten zeigte sich bei Patienten mit reseziertem Pankreaskarzinom jeweils ein gleichsinniger Effekt des SNPs rs1057985 im Promotorbereich von ENT1 auf die Überlebenszeit. In Abb. 28 ist dieser Einfluss für die Patienten aus allen drei Kohorten ($n = 311$) zusammen dargestellt. Träger des homozygoten T-Variantenallels haben dabei einen deutlich günstigeren Verlauf. Diese Daten beziehen sich – wie oben im Ergebnisteil – auf Patienten, bei welchen eine R0- oder R1-Resektion vorlag und deren Tumor histologisch ein Grading ≥ 2 aufwies. Diese Kriterien waren aus Gründen eines möglichst homogenen Untersuchungskollektivs gewählt worden. Wurden die daher aus der Analyse ausgeschlossenen 87 Patienten (histologisch gesichertes adenoduktales Pankreaskarzinom, Therapie mit Gemcitabin, jedoch nicht notwendigerweise reseziert bzw. R2 und einige mit einem Grading von 1) zusätzlich berücksichtigt, ergab sich für die Gesamtgruppe eine Assoziation des Gesamtüberlebens mit rs1057985 von $p = 0,0002$ (nach Log-rank-Test). Dieser Zusammenhang ist auch unter Berücksichtigung multiplen Testens mit 143 unabhängigen Genvarianten statistisch signifikant. Dieser Sachverhalt unterstreicht neben

der Reproduzierbarkeit in den drei einzelnen Kohorten die mutmaßliche klinische Relevanz dieses Polymorphismus.

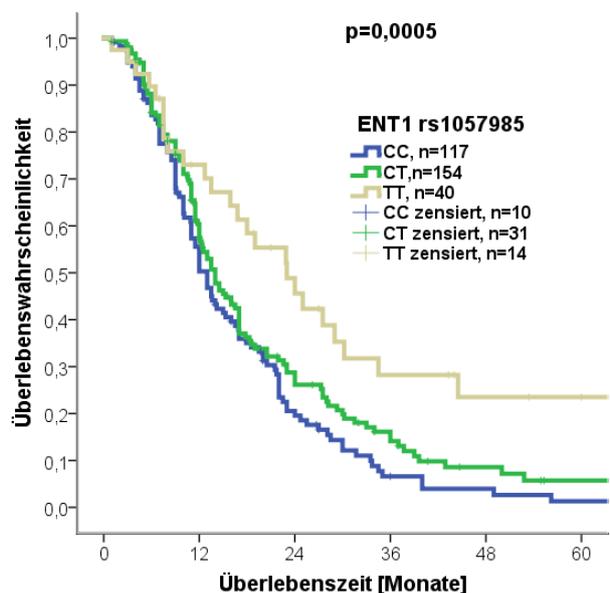


Abb. 28 Gesamtüberleben in Abhängigkeit der ENT1-Promotorvariante rs1057985. Dieser Kaplan-Meier-Grafik liegen die Daten der drei Kohorten (insgesamt 311 Patienten) aus Göttingen, Heidelberg und Hamburg zu Grunde. Dabei handelt es sich ausschließlich um Patienten mit R0 und R1 resezierten Pankreaskarzinomen, mit einem Grad der Entdifferenzierung ≥ 2 . Die statistische Signifikanz wurde mit dem Log-rank-Test ermittelt und ist als p-Wert im Diagramm angegeben. Die Patienten unter Beobachtung sind unterhalb der Grafik aufgeführt.

	Patienten unter Beobachtung					
CC	117	63	21	6	3	1
CT	154	82	33	16	6	2
TT	40	25	15	8	5	4

Ein Bezug dieses Befundes zur Gemcitabin-Wirkung ist zwar wahrscheinlich, weil der ENT1-Transporter für die zelluläre Aufnahme dieser Substanz wichtig ist, aber hier nicht zweifelsfrei zu klären, da hierfür eine Vergleichsgruppe ohne Gemcitabin-Behandlung erforderlich wäre. Prinzipiell kommen dafür zwei Ansätze als Kontrollgruppen in Betracht: zum einen eine Kontrollgruppe ohne Chemotherapie, was jedoch aus ethischen Gründen ausscheidet, es sei denn bei Ablehnung der Chemotherapie seitens der Patienten; zum anderen ein alternatives Chemotherapieregime, z.B. 5-Fluoruracil (Neoptolemos et al. 2010). Für beide Fälle standen im Rahmen dieser Arbeit keine ausreichenden Fallzahlen zur Verfügung. Die Genvariante rs1057985 befindet sich auf Chromosom 6 und kommt bei Kaukasiern mit einer Allel-Frequenz von 33% vor. Mit dieser befindet sich lediglich eine weitere Variante (rs507964) in engem genetischen Kopplungsungleichgewicht (LD, *linkage disequilibrium*) in der kaukasischen Bevölkerung. In funktioneller Hinsicht ist angesichts der Lokalisation im Promotorbereich des ENT1-Gens eine vermehrte Transkription des Gens und folglich eine erhöhte Aufnahme von Nukleosidanaloga wie z.B. Gemcitabin denkbar. Eine andere Dissertation aus der Abteilung Klinische Pharmakologie konnte in Lymphozyten von gesunden Trägern des T-Variantenallels ebenfalls eine deutlich höhere basale Transkription des ENT1-Gens nachweisen. Lag das Variantenallel homozygot vor, war die basale ENT1-Transkription annähernd doppelt so hoch wie die des homozygoten Wildtypallels. Bei *in*

vitro-Versuchen ließ sich jedoch keine erhöhte Zytotoxizität der Lymphozyten gegenüber Gemcitabin bei Vorliegen dieses Variantenallels feststellen (Preuß 2009). Für diesen Polymorphismus liegen bislang – abgesehen von einer Studie zum Transport des Nukleosid-Transporters Ribavirin bei Hepatitis-C (Morello et al. 2010)– keine weiteren funktionellen Daten in der Literatur vor.

5.1.2 ENT1-Expression wirkt sich auf klinisches Outcome aus

Gemäß der im Ergebnisteil beschriebenen immunhistochemischen ENT1-Expression zeigte sich bei separater Betrachtung der drei untersuchten Zellkompartimente ein Zusammenhang für Zytoplasma und Zellkern mit dem Gesamtüberleben (Abb. 17, Abb. 19). Dabei ging ein hoher Gehalt an ENT1-Protein mit einer besseren Prognose einher. Wurde auf eine Zellkompartiment-abhängige Unterteilung verzichtet und stattdessen der jeweils höchste immunreaktive Score eines Kompartiments für die gesamte Zelle gewertet (wie in der Literatur beschrieben, Farrell et al. 2009), war ebenfalls ein verbessertes Überleben bei höherer ENT1-Expression zu verzeichnen. Bei Prüfung des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit aller vier Gruppen des immunreaktiven Scores fand sich eine Assoziation mit $p = 0,02$ (gemäß Log-rank-Test, immunhistochemische Auswertung der Assistenzärztin der Pathologie [P1]) bzw. $p = 0,03$ (meine Erhebung [P2]). Bei Dichotomisierung in niedrige Expression einerseits und hohe Expression andererseits war dieser Zusammenhang ebenfalls erkennbar mit $p = 0,01$ (P1, siehe Abb. 29) bzw. $p = 0,07$ (P2).

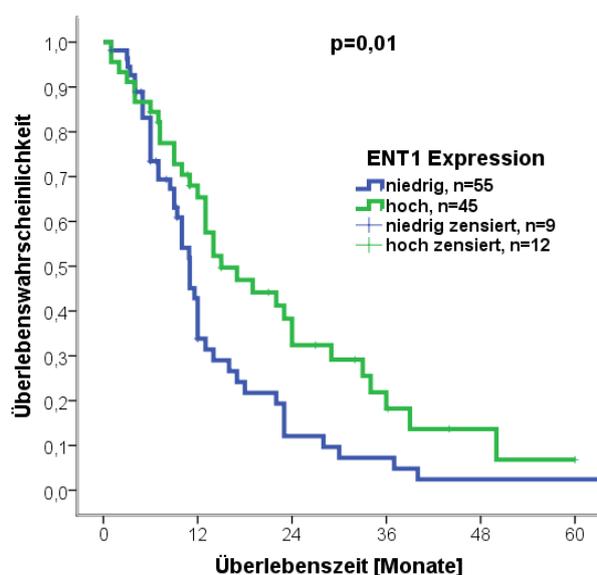


Abb. 29 Gesamtüberleben in Abhängigkeit der ENT1-Expression. Nach Einteilung des immunreaktiven Scores in die vier Gruppen wurde eine niedrige (negative und schwache) Expression einerseits mit einer hohen (mäßigen und starken) andererseits verglichen. Der p-Wert gibt die statistische Signifikanz des Log-rank-Tests an. Die Kaplan-Meier Grafik bezieht sich auf die immunhistochemische Auswertung der Pathologin (P1).

		Patienten unter Beobachtung				
niedrig	55	19	5	3	1	1
hoch	45	25	13	6	1	0

Der Zusammenhang zwischen der ENT1-Expression und der Überlebenszeit von Patienten, die wegen eines Pankreaskarzinoms mit Gemcitabin behandelt wurden, ist in der Literatur mehrfach bestätigt worden und gilt mittlerweile als gut belegt. (Marechal et al. 2009; Farrell et al. 2009; Morinaga et al. 2012).

In den zitierten Arbeiten wurde die ENT1-Expression nicht nach Zellkompartimenten differenziert. Auch in den Daten meiner Dissertation zeigte sich der konsistenteste Effekt, wenn – unabhängig von der subzellulären Lokalisation – der jeweils stärkste immunoreaktive Score verwendet wurde. Eine spezifische Betrachtung einzelner Zellkompartimente scheint die Aussagekraft der ENT1-Expression hinsichtlich des Überlebens nicht zu erhöhen. Bei einer *in vivo*-Untersuchung an einem humanen Pankreaskarzinom-Transplantat wurde mittels Adenoviren eine Überexpression von ENT1 vermittelt, wodurch ein besseres Ansprechen auf die Gemcitabintherapie erzielt wurde (Perez-Torras et al. 2008). Ob sich das ENT1-Expressionslevel auch bei neoadjuvanter Radiochemotherapie mit Gemcitabin positiv auf die Prognose des Pankreaskarzinoms auswirkt, wird in der Literatur derzeit kontrovers diskutiert (Murata et al. 2012; Kawada et al. 2012).

5.1.3 ENT1-Expression determiniert durch Promotor-SNP

So klar mittlerweile die Datenlage zur Bedeutung der immunhistochemischen ENT1-Expression in Bezug auf die Überlebenszeit ist, so wenig ist bislang über die ENT1-Regulation bekannt. Mit den vorliegenden Daten meiner Dissertation habe ich untersucht, ob die ENT1-Promotorvariante rs1057985 darauf einen Einfluss hat. Bei Betrachtung der globalzellulären, d.h. nicht nach Zellkompartimenten unterscheidenden ENT1-Expression (hoch *versus* niedrig), war bei beiden voneinander unabhängigen Untersuchern der histologischen Schnitte eine Assoziation mit rs1057985 erkennbar ($p = 0,04$ bzw. $p = 0,07$). Dabei war das T-Variantenallel mit einer höheren Menge an ENT1-Transportern verbunden. Dass der Effekt der ENT1-Expression auf das Gesamtüberleben von rs1057985 abhängt, wird deutlich, wenn man eine Stratifizierung nach den Genotypen dieses Polymorphismus vornimmt (siehe Abb. 31). Es fällt auf, dass beim CC-Wildtyp die Höhe der ENT1-Expression keinen Einfluss auf die Prognose hat ($p = 0,8$ nach Log-rank-Test), während beim heterozygoten CT-Genotyp ein deutlicher Unterschied zutage tritt ($p = 0,004$). Liegt der TT-Genotyp vor, zeigen die meisten Präparate eine hohe ENT1-Expression und die Patienten haben insgesamt eine bessere Prognose.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das T-Allel von rs1057985 vermutlich über eine verstärkte Transkription zu einer insgesamt erhöhten Expression des ENT1-Gens beiträgt.

Dadurch könnte die zelluläre Aufnahme des Nukleosidanalogons Gemcitabin verbessert sein, was sich folglich positiv auf die Überlebenszeit der Patienten auswirkt.

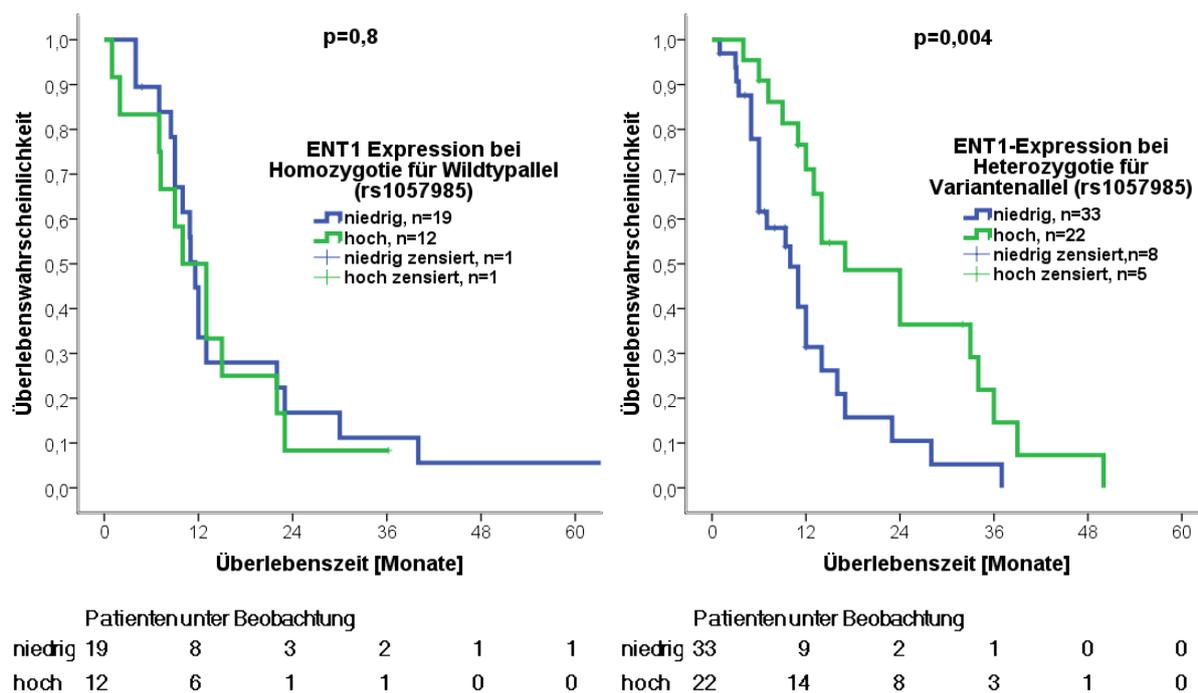


Abb. 30 Überleben in Abhängigkeit der ENT1-Expression und der Genvariante (rs1057985). Nach Einteilung des immunoreaktiven Scores in die vier Gruppen wurde eine negative oder schwache Expression einerseits mit einer mäßigen oder starken andererseits verglichen. Der p-Wert gibt die statistische Signifikanz des Log-rank-Tests an. Beide Kaplan-Meier-Grafiken beziehen sich auf die immunohistochemische Auswertung der Pathologin (P1).

5.1.4 Prognostische Relevanz der ENT1-Aminosäurevariante?

Die Aminosäurevariante rs45573936 des ENT1-Nukleosidtransporters hatte in der Göttinger Kohorte einen starken Einfluss auf die Überlebenszeit mit Gemcitabin behandelter Patienten (Schaudinn 2013). Der Polymorphismus bewirkt einen Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Threonin. Die Threonin-Variante hat in der kaukasischen Bevölkerung eine Allelfrequenz von nur 2%. Patienten der Göttinger Kohorte, die bezüglich der Variante heterozygot waren, verstarben deutlich früher als diejenigen mit homozygotem Wildtyp (TT). In der Heidelberger Kohorte konnte keine Aussage bezüglich dieser Variante getroffen werden, da darin lediglich ein heterozygoter Träger enthalten war. Bei Patienten der Hamburger Kohorte war die Variante nicht mit der Überlebenszeit assoziiert. Somit erscheint gegenwärtig eine klinische Bedeutung dieses Polymorphismus fraglich.

5.2 RRM2

Analog wie beim ENT1 werden hier zunächst die Assoziationen der genetischen Analysen mit der Überlebenszeit und anschließend die immunohistochemischen Daten diskutiert.

5.2.1 Aminosäurevariante von RRM2 Ala59Ser (rs1130609)

In den Kohorten aus Heidelberg und Göttingen wirkte sich das Variantenallel günstig auf das Gesamtüberleben aus. Homozygotie für die Variante trat in der Kohorte aus Göttingen zehnmal auf und erwies sich hier als besonders vorteilhaft; in der Heidelberg Kohorte trugen lediglich drei Personen diese Genotyp-Konfiguration. In den Daten der Hamburger Kohorte zeigte sich diese Tendenz ebenfalls, wenngleich keine Signifikanz erreicht wurde. Insgesamt zeigte sich bei Zusammenfassung aller drei Kohorten ein Einfluss des T-Variantenallels auf die Überlebenszeit mit einem p-Wert von 0,002 (siehe Abb. 31). Dieser Befund ist augenblicklich noch vorsichtig zu bewerten, da eine klare Bestätigung in den Bestätigungskohorten im Unterschied zum ENT1-Promotor-SNP nicht nachweisbar war und im Gesamtkollektiv nach Adjustierung auf 143 getestete Genvarianten die Signifikanzschwelle nicht erreicht wurde.

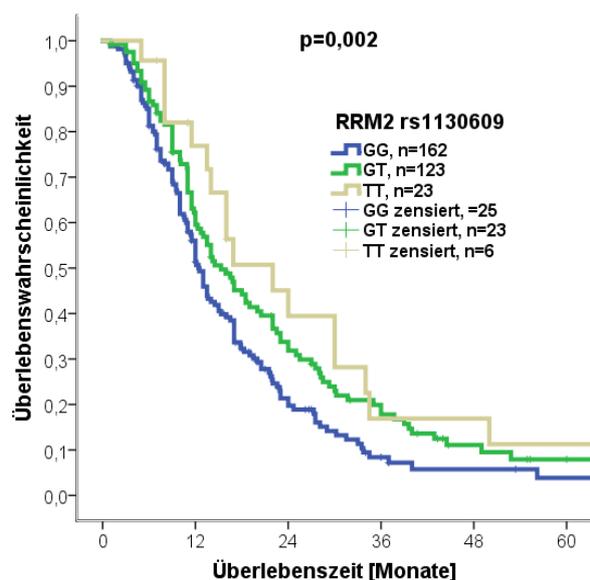


Abb. 31 Gesamtüberleben in Abhängigkeit der RRM2-Aminosäurevariante (rs1130609). Dieser Kaplan-Meier-Grafik liegen die Daten der drei Kohorten (insgesamt 311 Patienten) aus Göttingen, Heidelberg und Hamburg zu Grunde. Drei Patienten bei denen keine Bestimmung des Genotyps möglich war finden hier keine Berücksichtigung. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Log-rank-Test ermittelt und ist als p-Wert im Diagramm angegeben.

	Patienten unter Beobachtung					
GG	162	84	26	8	4	2
GT	123	70	35	19	7	3
TT	23	15	8	3	3	2

In der Literatur wurde dieser Polymorphismus bisher bei Neugeborenen hinsichtlich einer geschlechtsspezifischen pränatalen Selektion untersucht, hatte aber keinen nennenswerten Einfluss (Ucisik-Akkaya et al. 2010). Die Aminosäurevariante rs1130609 befindet sich bezüglich der längeren RRM2-Transkriptvariante in Exon 1 und hinsichtlich der kürzeren in deren 5' untranslatierter Region. Eventuell wirkt sich dieser Polymorphismus daher transkriptspezifisch aus. Mechanistisch ist durch den Austausch von Alanin zu Serin die

Entstehung einer zusätzlichen Phosphorylierungsstelle denkbar, worüber eine Proteinregulation stattfinden könnte.

5.2.2 RRM2-Expression und Überlebenszeit

Für die RRM2-Expression konnte kein Zusammenhang mit der Überlebenszeit gefunden werden. Eine Studie, in der die RRM2-Expression in Pankreaskarzinomgewebe ebenfalls immunhistochemisch untersucht wurde, kam zu dem gleichen Ergebnis (Xie et al. 2012). Zuvor war postuliert worden, dass sich eine niedrige mRNA-Expression von RRM2 in Pankreastumor-Gewebe günstig auf den Verlauf auswirkt (Fujita et al. 2010). Anderen Arbeiten zufolge könnte es sich bei der RRM2-Expression um einen generellen Prognosemarker bei Ovar- und Harnblasenkrebs handeln, wobei eine hohe Expression jeweils ungünstig ist (Wang et al. 2012; Morikawa et al. 2010).

Im Xenograft-Modell war zuvor eine Bedeutung von RRM2 für die Resistenz gegenüber Gemcitabin demonstriert worden (Duxbury et al. 2004).

Die Menge an RRM2-Protein in den histologischen Präparaten wurde in meiner Studie nicht nennenswert durch den oben beschriebenen Polymorphismus rs1130609 moduliert.

5.3 Hedgehog-Signalweg

Die Analyse des Hedgehog-Signalwegs wurde aus zwei Gründen durchgeführt: Zum einen war im Tiermodell bei Hemmung dieses Signalwegs eine bessere Verfügbarkeit von Gemcitabin im Tumor beobachtet worden (Olive et al. 2009); Zum anderen war in der Göttinger Kohorte ein im zugehörigen Gen lokalisierter Polymorphismus (rs2236407) mit dem Gesamtüberleben assoziiert (Schaudinn 2013, Abb. 14). Der Genpolymorphismus befindet sich im nicht-kodierenden Bereich (Intron 12) von Chromosom 9 und kommt bei Kaukasiern mit einer Frequenz des selteneren Allels von 35% vor. Nach der von mir durchgeführten Genotypisierung an den beiden beschriebenen Kohorten aus Heidelberg und Hamburg war in Zusammenschau aller untersuchten Patienten und unter Berücksichtigung nicht-genetischer Faktoren kein Einfluss dieses SNPs auf das Gesamtüberleben feststellbar. Auch die immunhistochemisch bestimmte PTCH1-Expression war nicht mit der Überlebenszeit verknüpft und zeigte zudem keine Abhängigkeit von rs2236407. In der Literatur ist bislang noch nichts zu dieser Genvariante bekannt, abgesehen von einer möglichen Beteiligung bei der Entwicklung von Mund-Kiefer-Gaumenspalten (Mansilla et al. 2006).

5.4 microRNAs

Eine funktionelle bzw. prognostische Bedeutung der fünf untersuchten miRNAs für die Gemcitabin-Therapie beim adenoduktalen Karzinom des Pankreas konnte nicht nachgewiesen werden. Bei Betrachtung mit den immunhistochemischen Daten zeigte sich am ehesten eine positive Korrelation zwischen der miR34a und der Proteinexpression von RRM2. In der Literatur wurde allerdings berichtet, dass miR34a die Proteinexpression von RRM2 herunterreguliert (Kaller et al. 2011). Durch den fehlenden Bezug zum Krankheitsverlauf kann aus meinen Daten eine medizinische Bedeutung der fünf untersuchten und im Pankreasgewebe exprimierten microRNAs nicht abgeleitet werden.

5.5 Kritische Betrachtung

Die reproduzierbaren und in sich konsistenten Befunde zum ENT1-Promotor-SNP rs1057985 machen eine medizinische Bedeutung sehr wahrscheinlich. Allerdings ist die Kausalität dieser Genvariante noch nicht bewiesen. Sie könnte auch mit einer anderen Genvariante in engem genetischen Kopplungsungleichgewicht stehen, welches tatsächlich für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Bei Betrachtung der entsprechenden genetischen Region kommt hier nur ein weiterer Polymorphismus in Frage. In jedem Fall fehlen noch molekularbiologische Untersuchungen, insbesondere mit Allel-spezifischen Konstrukten, um die eindeutige Funktionalität belegen zu können.

Die prognostische Relevanz der im kodierenden Bereich des ENT1-Gens gelegenen Aminosäurevariante rs45573936 (Ile216Thr) konnte durch meine Untersuchungen nicht bestätigt werden. Die Kohorte aus Heidelberg ließ eine Einschätzung nicht zu, da dort nur ein heterozygoter Patient enthalten war. Die fehlende Assoziation mit der Überlebenszeit bei den Hamburger Patienten basiert nur auf sieben heterozygoten Variantenallel-Trägern, weshalb eine mögliche Bedeutung dieser Variante nicht ausgeschlossen werden kann. Zur endgültigen Bewertung sind in Anbetracht der Seltenheit dieses Variantenallels größere Stichprobenzahlen nötig. Der ausgesprochen starke Effekt der Thr216-Variante in der Göttinger Kohorte (Schaudinn 2013) und eine biologische Plausibilität durch Entstehung einer zusätzlichen Phosphorylierungsstelle lässt eine medizinische Bedeutung durchaus möglich erscheinen.

Die in der Literatur mehrfach belegte Beziehung zwischen immunhistochemisch bestimmter ENT1-Expression und der Überlebenszeit konnte in meinen Daten bestätigt werden. Bei dieser Methode ist grundsätzlich zu bedenken, dass sie semiquantitativ und stark Untersucherabhängig ist. Um letztgenannte Unsicherheit zu reduzieren, wurden die Analysen zusätzlich von einer erfahrenen Pathologin vorgenommen. Mit einem exakteren nicht subjektiven

Verfahren zur Bestimmung der Proteinmenge ließen sich genauere Ergebnisse ableiten. Ein solches Verfahren ist beispielsweise die konfokale Laser-*Scanning*-Mikroskopie. Ein derartiges Verfahren stand für meine Auswertung nicht zur Verfügung.

Eine Quantifizierung der ENT1-Expression wäre auch über mRNA möglich. Dafür eignet sich jedoch Paraffinmaterial nicht, da längere RNA-Moleküle dort zu stark degradiert sind. Eine besser geeignete Methode wäre eine Laser-assistierte Mikrodissektion an tiefgefrorenem Gewebe gewesen, was aber im Rahmen dieser Untersuchung zu aufwändig war. Bei den kurzkettigen microRNAs ist eine Quantifizierung auch aus Paraffinblöcken möglich. Einschränkend muss für die Proben meiner Arbeit gesagt werden, dass die Zuordnung zu Tumorgewebe zwar mikroskopisch, aber ohne Mikrodissektion erfolgte und die extrahierten Zellmengen zwischen den Präparaten stark variierten. Der Gehalt an microRNAs kann nicht photometrisch ermittelt werden, sondern die Expressionsniveaus der interessierenden microRNAs müssen auf geeignete Referenz-microRNAs normiert werden. Möglicherweise waren die dafür von mir verwendeten drei microRNAs nicht repräsentativ für den Gesamtgehalt an extrahiertem Zellmaterial. Bei der großen Variabilität der Zellzahlen in meinen Proben ist daher die durchgeführte Normierung fraglich. Abhilfe könnte an dieser Stelle eventuell die Bestimmung eines großen Panels an microRNAs über Arrays schaffen.

5.6 Ausblick

Der stärkste Befund meiner Arbeit, die wiederholte und konsistente Assoziation eines Promotorpolymorphismus im ENT1-Gen mit der Überlebenszeit bei Pankreaskarzinom, berechtigt zu der Annahme, dass es sich hier um einen klinisch bedeutsamen prognostischen Marker handeln könnte. Bevor ein klinischer Einsatz möglich ist, sind weitere Untersuchungen erforderlich. So könnte in einer klinisch-prospektiven Studie vor Therapiebeginn der Genotyp an dieser Stelle bestimmt werden, und die Patienten werden ohne Eingriff in die Therapie engmaschig kontrolliert. Die postulierte Funktionalität dieses Polymorphismus sollte durch molekularbiologische Untersuchungen geklärt werden. Zur Analyse einer etwaigen Allel-spezifischen Bindung von Transkriptionsfaktoren würde sich ein *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) eignen. Ob das Variantenallel, wie aufgrund meiner Daten zu vermuten ist, die Promotoraktivität der Variante steigert, wäre mittels Reporter-gen-Assays zu analysieren. Auch eine RRM2-Aminosäurevariante zeigte über alle drei Patientenkohorten eine Beeinflussung der Überlebenszeit, wenngleich das Effektmaß etwas schwächer als bei der ENT1-Variante war. Daher sollten hier vor Durchführung aufwändiger weiterer Schritte zunächst sondierende Experimente zur Erhärtung bzw.

Widerlegung der Hypothese einer Funktionalität erfolgen. Da diese Variante in Bezug auf die beiden quantitativen RRM2-Transkripte in der 5'-UTR bzw. im Exon 1 lokalisiert ist, wäre z.B. eine Allel-spezifische differenzielle Expression der beiden Transkripte denkbar. Das Fehlen eines Zusammenhangs dieses Polymorphismus mit dem histologisch bestimmten RRM2-Protein könnte auch Ausdruck eines Expressions-unabhängigen Mechanismus sein. Der entsprechende Aminosäureaustausch Ala59Ser führt bei der Translation der einen Transkriptvariante zur Einführung eines potenziell phosphorylierbaren Serinrestes, was gegebenenfalls über einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden kann. Sollte dies der Fall sein, würde das für eine funktionelle Relevanz sprechen, deren eingehende Klärung dann Gegenstand umfassenderer Untersuchungen sein kann.

6 Zusammenfassung

Die Zahl der Neuerkrankungen des adenoduktalen Pankreaskarzinoms beträgt in Deutschland etwa 14.000 pro Jahr. Die 5-Jahres-Überlebenszeit beläuft sich gegenwärtig auf nur 4-8%. Durch die Inzidenz und die schlechte Prognose steht es an vierter Stelle der Tumor-bedingten Letalität. Das Standardtherapeutikum der in kurativer und palliativer Absicht behandelten Patienten ist das Nukleosidanalogen Gemcitabin. Einige Patienten scheinen mehr von dieser Gemcitabin-Therapie zu profitieren als andere. Eine prognostische Bedeutung nimmt in diesem Zusammenhang die Expression des ENT1-Nukleosidtransporters ein. Zahlreiche Studien konstatieren, dass eine höhere ENT1-Expression mit einem besseren Ansprechen einhergeht. Neue Daten einer zuvor durchgeführten Pilotstudie in meiner Arbeitsgruppe weisen auf eine mögliche Bedeutung genetischer Polymorphismen (im Bereich der Gene ENT1, der Ribonukleotidreduktase-Untereinheit RRM2 und dem Liganden des Hedgehog-Signalwegs PTCH1) für das Therapieansprechen hin.

Für meine Studie standen mir Daten über den Krankheitsverlauf von drei Kohorten aus den Universitätskliniken Göttingen, Heidelberg und Hamburg mit insgesamt 311 Patienten zur Verfügung. Bei diesen lag ein mit R0 oder R1 reseziertes adenoduktales Pankreaskarzinom mit Grading G2 oder G3 vor. Alle Patienten erhielten in kurativer Absicht eine Gemcitabin-haltige Chemotherapie. Anhand von Leukozyten-DNA wurden insgesamt 143 Polymorphismen in Kandidatengenen für Transport und Metabolismus von Gemcitabin sowie des Hedgehog-Signalwegs genotypisiert. Zudem führte ich an Tumor-tragenden Paraffinblöcken in einer Untergruppe von 102 Patienten aus der Universitätsklinik Göttingen immunhistochemische Expressionsanalysen der Gene ENT1, RRM2 und PTCH1 durch. Mittels quantitativer *Real time*-PCR bestimmte ich das Tumor-Expressionsprofil der aufgrund von Literaturberichten ausgewählten miRNAs miR10b, miR141, miR34a, miR21 und miR200c. Primäre Zielgröße meiner Analysen, auf deren Beeinflussung die von mir erhobenen Parameter getestet wurden, war die Gesamt-Überlebenszeit mit Beginn der Gemcitabin-Therapie. Zentrales Ergebnis sind die Befunde zum ENT1. Der günstige Einfluss des mit einer Allelfrequenz von 33% häufigen Variantenallels eines Polymorphismus im Promotorbereich konnte in zwei weiteren Patientenkohorten bestätigt werden und kann nun auch unter den Kriterien des Multiplen Testens als statistisch signifikant betrachtet werden (kombiniert mit der Pilotstudie $p = 0,0005$). Auch die in der Literatur mehrfach dokumentierte positive Korrelation zwischen dem am Tumorgewebe immunhistochemisch bestimmten Gehalt des ENT1-Proteins und der Überlebenszeit fand sich auch in meiner Untersuchung. Besonders interessant und bislang nicht beschrieben ist in diesem Zusammenhang, dass die ENT1-

Expression von dem genannten Promotorpolymorphismus abhängig war. Letzterer erwies sich in einer Cox-Regressionsanalyse sogar als der stärkere Prädiktor dieser beiden Variablen für die Überlebenszeit. Hingegen konnte der Effekt der in der Pilotstudie beschriebenen Aminosäure-Variante (Häufigkeit des Variantenallels nur 2%) im ENT1-Gen nicht repliziert werden. Ein weiterer der 143 untersuchten Polymorphismen mit Auswirkung auf die Überlebenszeit war eine Aminosäurevariante in RRM2 (in allen drei Kohorten zusammen $p = 0,002$), wobei Träger des selteneren Allels profitierten. Jedoch modulierte diese Genvariante die entsprechende immunhistochemisch gemessene RRM2-Genexpression nicht. Die untersuchten fünf microRNAs standen in keinerlei Zusammenhang mit der primären Zielgröße.

Der als sehr vielversprechender Biomarker identifizierte ENT1-Genpolymorphismus könnte die in der Literatur klar belegte Korrelation zwischen ENT1-Expression und Therapieansprechen wesentlich bedingen. Für den ENT1 gibt es mehrere Transkriptvarianten, welche sich in der Länge des untranslatierten 5'-Bereichs unterscheiden, jedoch alle für dasselbe Protein kodieren. Der Genpolymorphismus befindet sich in einer mutmaßlichen Promotorregion für die langen ENT1-Transkripte. Die naheliegende Hypothese ist, dass das Variantenallel des Polymorphismus zu einer verstärkten Expression der entsprechenden Transkripte führt. Daraus würde eine insgesamt größere Zahl an ENT1-Transportermolekülen resultieren, wodurch Gemcitabin vermehrt in die Zellen aufgenommen und dadurch eine bessere Wirkung erzielt wird. Gestützt wird diese Annahme auch dadurch, dass in einer früheren funktionellen Studie meiner Abteilung für das Variantenallel des ENT1-Promotorpolymorphismus eine höhere basale Transkriprate des ENT1-Gens nachgewiesen wurde. Für die beobachtete Assoziation der RRM2-Genvariante mit der Überlebenszeit kann aktuell noch kein klarer funktioneller Mechanismus vorgeschlagen werden; möglicherweise wird die enzymatische Aktivität beeinflusst, was durch weitere Untersuchungen zu zeigen wäre.

Der ENT1-Promotorpolymorphismus sollte zur Implementierung als potenzieller Biomarker nun prospektiv getestet werden. Im Bestätigungsfalle sollten homozygote Träger für das Variantenallel wegen der mutmaßlich besseren Wirkung nachdrücklich zur Gemcitabin-Therapie auch angesichts der Schwere der Erkrankung ermutigt werden. Durch meine Daten können weitere funktionelle Untersuchungen zum besseren Verständnis mechanistischer Prozesse angeregt werden, um auch für die Mehrheit der Patienten mit einer an dieser Stelle ungünstigen genetischen Konstellation Fortschritte zu erzielen.

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* 9 (3), 491-498

Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC, Brambs HJ, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr JM et al. (2007): [S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007]. *Z Gastroenterol* 45 (6), 487-523

Ali S, Ahmad A, Banerjee S, Padhye S, Dominiak K, Schaffert JM, Wang Z, Philip PA, Sarkar FH (2010): Gemcitabine sensitivity can be induced in pancreatic cancer cells through modulation of miR-200 and miR-21 expression by curcumin or its analogue CDF. *Cancer Res* 70 (9), 3606-3617

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* 41 (9), 986-990

Badagnani I, Chan W, Castro RA, Brett CM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, Ferrin TE, Carlson EJ et al. (2005): Functional analysis of genetic variants in the human concentrative nucleoside transporter 3 (CNT3; SLC28A3). *Pharmacogenomics J* 5 (3), 157-165

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* 14 (19), 5995-6004

Bergman AM, Pinedo HM, Peters GJ (2002): Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resist Updat* 5 (1), 19-33

Bhat K, Wang F, Ma Q, Li Q, Mallik S, Hsieh TC, Wu E (2012): Advances in biomarker research for pancreatic cancer. *Curr Pharm Des* 18 (17), 2439-2451

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* 15 (6), 2403-2413

Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A (1997): Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 278 (5343), 1580-1581

Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A (1998): A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 8 (12), 1229-1231

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* 364 (19), 1817-1825

Damaraju S, Zhang J, Visser F, Tackaberry T, Dufour J, Smith KM, Slugoski M, Ritzel MW, Baldwin SA, Young JD et al. (2005): Identification and functional characterization of variants in human concentrative nucleoside transporter 3, hCNT3 (SLC28A3), arising from single nucleotide polymorphisms in coding regions of the hCNT3 gene. *Pharmacogenet Genomics* 15 (3), 173-182

Duell EJ (2012): Epidemiology and potential mechanisms of tobacco smoking and heavy alcohol consumption in pancreatic cancer. *Mol Carcinog* 51 (1), 40-52

Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE (2004): RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine. *Oncogene* 23 (8), 1539-1548

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* 136 (1), 187-195

Farrell JJ, Bae K, Wong J, Guha C, Dicker AP, Elsaleh H (2012): Cytidine deaminase single-nucleotide polymorphism is predictive of toxicity from gemcitabine in patients with pancreatic cancer: RTOG 9704. *Pharmacogenomics J* 12 (5), 395-403

Freitas D, Fernandes Gdos S, Hoff PM, Cunha JE (2009): Medical management of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* 9 (3), 223-232

Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Itaba S, Ito T, Nakata K, Yu J, Kayashima T, Souzaki R, Tajiri T et al. (2010): Gene expression levels as predictive markers of outcome in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. *Neoplasia* 12 (10), 807-817

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* 9 (13), 5000-5008

Genkinger JM, Li R, Spiegelman D, Anderson KE, Albanes D, Bergkvist L, Bernstein L, Black A, van den Brandt PA, English DR et al. (2012): Coffee, tea, and sugar-sweetened carbonated soft drink intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of 14 cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21 (2), 305-318

Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, Offerhaus JA (2000): Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 119 (6), 1447-1453

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* 12 (6), 1794-1803

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 gemcitabine. *Cancer Res* 66 (7), 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* 27 (6), 720-725

Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, Del Chiaro M, Erozenski LA, Vasile E, Leon LG, Pollina LE, Groen A, Falcone A et al. (2010): MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer Res* 70 (11), 4528-4538

Gray JH, Mangravite LM, Owen RP, Urban TJ, Chan W, Carlson EJ, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D et al. (2004a): Functional and genetic diversity in the concentrative nucleoside transporter, CNT1, in human populations. *Mol Pharmacol* 65 (3), 512-519

Gray JH, Owen RP, Giacomini KM (2004b): The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pharmacol Ther* 102 (1-2), 728-734

Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ (2008): MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 7 (20), 3112-3118

Habermehl D, Kessel K, Welzel T, Hof H, Abdollahi A, Bergmann F, Rieken S, Weitz J, Werner J, Schirmacher P et al. (2012): Neoadjuvant chemoradiation with Gemcitabine for locally advanced pancreatic cancer. *Radiat Oncol* 7 28

He L, Hannon GJ (2004): MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5 (7), 522-531

Heinemann V, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W (1988): Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 48 (14), 4024-4031

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* 22 (4 Suppl 11), 19-25

Hwang JH, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM, Leon LG, Kim YT, Funel N, Park JK, Kim MA, Kang GH et al. (2010): Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PLoS One* 5 (5), e10630

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* 18 (2), 577-584

Itoi T, Sofuni A, Fukushima N, Itokawa F, Tsuchiya T, Kurihara T, Moriyasu F, Tsuchida A, Kasuya K (2007): Ribonucleotide reductase subunit M2 mRNA expression in pretreatment biopsies obtained from unresectable pancreatic carcinomas. *J Gastroenterol* 42 (5), 389-394

Ji Q, Hao X, Zhang M, Tang W, Yang M, Li L, Xiang D, Desano JT, Bommer GT, Fan D et al. (2009): MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One* 4 (8), e6816

Joerger M, Burgers JA, Baas P, Doodeman VD, Smits PH, Jansen RS, Vainchtein LD, Rosing H, Huitema AD, Beijnen JH et al. (2012): Gene polymorphisms, pharmacokinetics, and hematological toxicity in advanced non-small-cell lung cancer patients receiving cisplatin/gemcitabine. *Cancer Chemother Pharmacol* 69 (1), 25-33

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* 321 (5897), 1801-1806

Jones S, Hruban RH, Kamiyama M, Borges M, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Palmisano E, Brune K, Jaffee EM et al. (2009): Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science* 324 (5924), 217

Kaller M, Liffers ST, Oeljeklaus S, Kuhlmann K, Roh S, Hoffmann R, Warscheid B, Hermeking H (2011): Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis. *Mol Cell Proteomics* 10 (8), M111 010462

Kawada N, Uehara H, Katayama K, Nakamura S, Takahashi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Nagata S, Tomita Y (2012): Human equilibrative nucleoside transporter 1 level does not predict prognosis in pancreatic cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiation including gemcitabine. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 19 (6), 717-722

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* 28 (22), 3617-3622

Ko AH, Venook AP, Bergsland EK, Kelley RK, Korn WM, Dito E, Schillinger B, Scott J, Hwang J, Tempero MA (2010): A phase II study of bevacizumab plus erlotinib for gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 66 (6), 1051-1057

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

Li Y, VandenBoom TG, 2nd, Kong D, Wang Z, Ali S, Philip PA, Sarkar FH (2009): Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 69 (16), 6704-6712

Louvet C, Labianca R, Hammel P, Lledo G, Zampino MG, Andre T, Zaniboni A, Ducreux M, Aitini E, Taieb J et al. (2005): Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J Clin Oncol* 23 (15), 3509-3516

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* 58 (19), 4349-4357

Mansilla MA, Cooper ME, Goldstein T, Castilla EE, Lopez Camelo JS, Marazita ML, Murray JC (2006): Contributions of PTCH gene variants to isolated cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J* 43 (1), 21-29

Marechal R, Mackey JR, Lai R, Demetter P, Peeters M, Polus M, Cass CE, Young J, Salmon I, Deviere J et al. (2009): Human equilibrative nucleoside transporter 1 and human concentrative nucleoside transporter 3 predict survival after adjuvant gemcitabine therapy in resected pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 15 (8), 2913-2919

Maring JG, Wachters FM, Slijfer M, Maurer JM, Boezen HM, Uges DR, de Vries EG, Groen HJ (2010): Pharmacokinetics of gemcitabine in non-small-cell lung cancer patients: impact of the 79A>C cytidine deaminase polymorphism. *Eur J Clin Pharmacol* 66 (6), 611-617

Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS (2001): Coffee and alcohol consumption and the risk of pancreatic cancer in two prospective United States cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (5), 429-437

Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T (2006): Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol* 17 Suppl 5 v7-12

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* 25 (15), 1960-1966

Morello J, Cuenca L, Soriano V, Medrano J, Madejon A, Vispo E, Barreiro P, Labarga P, Jimenez-Nacher I, Rodriguez-Novoa S (2010): Influence of a single nucleotide polymorphism at the main ribavirin transporter gene on the rapid virological response to pegylated interferon-ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 202 (8), 1185-1191

Morikawa T, Maeda D, Kume H, Homma Y, Fukayama M (2010): Ribonucleotide reductase M2 subunit is a novel diagnostic marker and a potential therapeutic target in bladder cancer. *Histopathology* 57 (6), 885-892

Morinaga S, Nakamura Y, Watanabe T, Mikayama H, Tamagawa H, Yamamoto N, Shiozawa M, Akaike M, Ohkawa S, Kameda Y et al. (2012): Immunohistochemical analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT1) predicts survival in resected pancreatic cancer patients treated with adjuvant gemcitabine monotherapy. *Ann Surg Oncol* 19 Suppl 3 S558-564

Murata Y, Hamada T, Kishiwada M, Ohsawa I, Mizuno S, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Ii N, Inoue H et al. (2012): Human equilibrative nucleoside transporter 1 expression is a strong independent prognostic factor in UICC T3-T4 pancreatic cancer patients treated with preoperative gemcitabine-based chemoradiotherapy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 19 (4), 413-425

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* 16 (5), 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. *JAMA* 304 (10), 1073-1081

Ni Y, Hall AW, Battenhouse A, Iyer VR (2012): Simultaneous SNP identification and assessment of allele-specific bias from ChIP-seq data. *BMC Genet* 13 46

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. *JAMA* 297 (3), 267-277

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* 324 (5933), 1457-1461

Perez-Torras S, Garcia-Manteiga J, Mercade E, Casado FJ, Carbo N, Pastor-Anglada M, Mazo A (2008): Adenoviral-mediated overexpression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) enhances gemcitabine response in human pancreatic cancer. *Biochem Pharmacol* 76 (3), 322-329

Preis M, Gardner TB, Gordon SR, Pipas JM, Mackenzie TA, Klein EE, Longnecker DS, Gutmann EJ, Sempere LF, Korc M (2011): MicroRNA-10b expression correlates with response to neoadjuvant therapy and survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 17 (17), 5812-5821

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. Naturwissenschaftliche Dissertation Georg-August-Universität Göttingen 2009

Ruiz van Haperen VW, Veerman G, Vermorken JB, Peters GJ (1993): 2',2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochem Pharmacol* 46 (4), 762-766

Scales SJ, de Sauvage FJ (2009): Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci* 30 (6), 303-312

Schaudinn A: Variabilität des Therapieansprechens von Gemcitabin bei Pankreaskarzinom: Identifizierung relevanter Genpolymorphismen. Medizinische Dissertation Georg-August-Universität Göttingen 2013

Senderowicz AM, Johnson JR, Sridhara R, Zimmerman P, Justice R, Pazdur R (2007): Erlotinib/gemcitabine for first-line treatment of locally advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Oncology (Williston Park)* 21 (14), 1696-1706; discussion 1706-1699, 1712, 1715

Smid K, Van Moorsel CJ, Noordhuis P, Voorn DA, Peters GJ (2001): Interference of gemcitabine triphosphate with the measurements of deoxynucleotides using an optimized DNA polymerase elongation assay. *Int J Oncol* 19 (1), 157-162

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* 10 (20), 6956-6961

Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H et al. (1996): The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384 (6605), 129-134

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* 25 (1), 32-42

Sugiyama E, Lee SJ, Lee SS, Kim WY, Kim SR, Tohkin M, Hasegawa R, Okuda H, Kawamoto M, Kamatani N et al. (2009): Ethnic differences of two non-synonymous single nucleotide polymorphisms in CDA gene. *Drug Metab Pharmacokinet* 24 (6), 553-556

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* 425 (6960), 851-856

Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, Mey V, Laan AC, Nannizzi S, Di Marsico R, Antonuzzo A, Orlandini C, Ricciardi S et al. (2008): Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 14 (6), 1797-1803

Tibaldi C, Giovannetti E, Tiseo M, Leon LG, D'Incecco A, Loosekoot N, Bartolotti M, Honeywell R, Cappuzzo F, Ardizzoni A et al. (2012): Correlation of cytidine deaminase polymorphisms and activity with clinical outcome in gemcitabine-/platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 23 (3), 670-677

Ucisik-Akkaya E, Davis CF, Do TN, Morrison BA, Stemmer SM, Amadio WJ, Dorak MT (2010): Examination of genetic polymorphisms in newborns for signatures of sex-specific prenatal selection. *Mol Hum Reprod* 16 (10), 770-777

Ueno H, Kaniwa N, Okusaka T, Ikeda M, Morizane C, Kondo S, Sugiyama E, Kim SR, Hasegawa R, Saito Y et al. (2009): Homozygous CDA*3 is a major cause of life-threatening toxicities in gemcitabine-treated Japanese cancer patients. *Br J Cancer* 100 (6), 870-873

Ueno H, Kaniwa N, Sugiyama E, et al. (2011): Effect of cytidine deaminase (CDA)-related biomarkers on overall survival in patients with advanced pancreatic cancer receiving gemcitabine (GEM) monotherapy. *J Clin Oncol* 29(Suppl.):e14645

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M et al. (2002): Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20 (3), 719-726

Wacker B, Nagrani T, Weinberg J, Witt K, Clark G, Cagnoni PJ (2007): Correlation between development of rash and efficacy in patients treated with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib in two large phase III studies. *Clin Cancer Res* 13 (13), 3913-3921

Wang LM, Lu FF, Zhang SY, Yao RY, Xing XM, Wei ZM (2012): Overexpression of catalytic subunit M2 in patients with ovarian cancer. *Chin Med J (Engl)* 125 (12), 2151-2156

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* 70 (3), 1015-1023

Woo HI, Kim KK, Choi H, Kim S, Jang KT, Yi JH, Park YS, Park JO, Lee SY (2012): Effect of genetic polymorphisms on therapeutic response and clinical outcomes in pancreatic cancer patients treated with gemcitabine. *Pharmacogenomics* 13 (9), 1023-1035

Xie H, Lin J, Thomas DG, Jiang W, Liu X (2012): Ribonucleotide reductase M2 does not predict survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 5 (4), 347-355

Yonemori K, Ueno H, Okusaka T, Yamamoto N, Ikeda M, Saijo N, Yoshida T, Ishii H, Furuse J, Sugiyama E et al. (2005): Severe drug toxicity associated with a single-nucleotide polymorphism of the cytidine deaminase gene in a Japanese cancer patient treated with gemcitabine plus cisplatin. *Clin Cancer Res* 11 (7), 2620-2624

Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Sato N, Kayashima T, Fujita H, Nakata K, Tanaka M (2010): MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation. *Mol Cancer* 9 169

8 Anhang

Tab. 20 Charakteristika der untersuchten Genpolymorphismen in der HD-Kohorte. ¹Name des Gens. ²Bezeichnung des entsprechenden Genpolymorphismus mit rs-Nummer. ³Für Polymorphismen außerhalb des eigentlichen Genbereichs (d.h. Promotorregion und jenseits des 3'-Endes) sind die Abstände (in Basenpaaren) in Relation zum Transkriptionsstart- bzw. -endpunkt angegeben. ⁴Chromosomale Lokalisation gemäß Datenbank dbSNP (Version GRCh37.p2) des NCBI (*National Center of Biotechnology Information*, Webseite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). ⁵Basenaustausch der jeweiligen Genvariante. ⁶MAF = *minor allele frequency*, Frequenz des selteneren Allels, d.h. desjenigen, welches in Spalte 5 rechts des „>“-Symbols steht. ⁷Genvarianten und Gesamtüberleben. Für jeden Genpolymorphismus ist der Bezug zum Gesamtüberleben als unabhängige Einzelvariable unter Angabe des p-Wertes dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde im Log-rank-Test überprüft. Statistisch signifikant war ein p-Wert $\leq 0,05$ (fett hervorgehoben).

Gen ¹	SNP ²	Genetisches Element	Chromosomale Lokalisation ⁴	Basen-Austausch ⁵	MAF ⁶ (%)	p ^{Survival} (HD) ⁷
CDA	rs540282	Promotor -3572 (-3751)	1:20911872	A>G	7,7	0,3
	rs532545	Promotor -272 (-451)	1:20915172	C>T	36,6	0,2
	rs603412	Promotor -26 (-205)	1:20915418	G>C	44,3	0,4
	rs602950	5'UTR	1:20915531	A>G	37,1	0,3
	rs2072671	Exon 1	1:20915701	T>G	36,6	0,9
	rs818202	Intron 1	1:20916791	C>T	40,7	0,9
	rs10916824	Intron 1	1:20918912	A>G	5,7	0,8
	rs577042	Intron 1	1:20928154	T>C	14,9	0,6
	rs818194	Intron 2	1:20931828	T>A	24,2	0,3
	rs10916827	Intron 2	1:20933341	G>A	37,6	0,4
	rs580032	Intron 2	1:20933893	A>C	6,2	1,0
	rs11579252	Intron 2	1:20934213	T>C	11,3	0,7
	rs527912	Intron 2	1:20934283	G>A	35,6	0,4
	rs1689924	Intron 2	1:20934796	T>C	56,2	0,2
	rs12404655	Intron 3	1:20943195	T>C	25,3	0,7
	rs12072405	Intron 3	1:20943281	A>G	14,9	0,9
	rs1048977	Exon 4	1:20945055	G>A	31,4	0,2
	rs1614627	<i>upstream</i> +1355	1:20946756	C>A	7,2	0,6
CMPK1	rs11211517	Promotor -1338 (-1487)	1: 47798131	C>T	53,1	0,3
	rs7543016	Exon 1	1: 47799639	C>G	46,4	0,1
	rs12132521	Intron 1	1: 47818324	G>A	34,5	0,1
	rs35687416	Exon 2	1: 47834209	G>T	4,6	0,4
	rs6660321	Intron 4	1: 47841627	T>G	13,5	0,4
	rs7534571	<i>upstream</i> +2768	1: 47847279	A>G	8,2	0,4
	rs12039726	<i>upstream</i> +5168	1: 47849679	G>A	11,9	0,4
DCK	rs6446982	Promotor -4122 (-4410)	4: 71855143	G>A	3,1	0,9
	rs2306744	5'UTR	4: 71859352	C>T	2,1	0,1
	rs12648166	Intron 2	4: 71873745	C>T	41,2	0,3
	rs10805074	Intron 2	4: 71874331	C>T	4,1	0,9

Gen ¹	SNP ²	Genetisches Element	Chromosomale Lokalisation ⁴	Basen-Austausch ⁵	MAF ⁶ (%)	p ^{Survival} (HD) ⁷
DCTD	rs11544786	Exon 3	4: 71888176	C>T	6,2	0,5
	rs5016499	Promotor -2268 (-2432)	4: 183840898	C>A	28,9	0,2
	rs13111117	Intron 3	4: 183825476	G>A	11,3	0,2
	rs10016530	Intron 3	4: 183824984	T>G	6,7	0,7
	rs10520543	Intron 3	4: 183822229	G>A	29,9	0,6
	rs13148414	Intron 3	4: 183817674	C>G	22,2	0,2
	rs6834019	Intron 3	4: 183817659	C>A	8,2	0,8
	rs4742	Exon 4	4: 183815688	T>C	30,4	0,02
	rs1960207	Intron 5	4: 183813366	G>A	7,2	0,6
	rs2515683	Intron 5	4: 183813147	G>A	36,1	0,2
	rs10017797	Intron 5	4: 183812883	C>A	10,3	0,2
	rs7278	3'UTR	4: 183811487	C>T	19,6	0,4
	rs3924787	<i>upstream</i> +4340	4: 183806904	A>G	41,7	1,0
	rs4073676	<i>upstream</i> +4679	4:183806565	A>T	5,7	0,6
	rs4073675	<i>upstream</i> +4832	4:183806412	C>T	9,8	0,5
NT5C3	rs6946062	Intron 1	7: 33083107	T>C	47,9	0,4
	rs7795860	Intron 1	7: 33082489	A>G	23,7	0,3
	rs7792135	Intron 1	7: 33082375	A>G	83,0	0,6
	rs12668520	Intron 1	7: 33075248	T>C	25,8	0,3
	rs17170218	Intron 1	7: 33074785	A>T	33,5	0,3
	rs3750117	Exon 5	7: 33060946	G>A	24,2	0,2
	rs17170153	Intron 5	7: 33060755	A>C	4,1	0,7
	rs4394301	<i>upstream</i> +4158	7: 33049584	A>G	51,0	0,8
	RRM1	rs1561876	Promotor -2529 (-2848)	11: 4113395	A>G	12,9
rs1465952		Promotor -1385 (-1704)	11: 4114539	A>G	10,3	0,1
rs11030918		Promotor -437 (-756)	11: 4115487	T>C	32,3	0,4
rs12806698		5'UTR	11: 4115974	C>A	26,3	0,3
rs10835613		Intron 2	11: 4124276	C>G	59,3	0,02
rs7932702		Intron 2	11: 4124372	C>T	69,6	0,04
rs10498198		Intron 2	11: 4124731	C>G	5,2	0,0001
rs183484		Exon 9	11: 4141132	T>G	44,8	0,01
rs9937		Exon 19	11: 4159457	C>T	55,2	0,04
rs1042858		Exon 19	11: 4159466	T>C	7,2	0,8
RRM2	rs1042919	3'UTR	11: 4159764	T>A	7,7	0,8
	rs7574663	Promotor -3368 (-3419)	2: 10259327	G>C	19,1	0,6
	rs1130609	Exon 1	2: 10262920	G>T	22,2	0,008
	rs6741290	Intron 4	2: 10264709	C>T	40,2	0,03
	rs4668664	Intron 7	2: 10268798	G>A	25,3	0,1
rs1138729	3'UTR	2:10271196	A>G	12,9	0,3	

Gen ¹	SNP ²	Genetisches Element	Chromosomale Lokalisation ⁴	Basen-Austausch ⁵	MAF ⁶ (%)	p ^{Survival} (HD) ⁷	
ENT1	rs9357436	Promotor -4522 (-12331)	6: 44182720	C>T	19,1	0,2	
	rs2297393	Promotor -2523 (-10332)	6: 44184719	A>G	51,0	1,0	
	rs3734701	Promotor -1988 (-9797)	6: 44185254	C>T	21,6	0,5	
	rs1057985	Promotor -1341 (-9150)	6: 44185901	C>T	41,2	0,05	
	rs6914414	Intron 1	6: 44188277	G>A	6,7	0,9	
	rs9462977	Intron 1	6: 44188701	A>G	50,5	0,6	
	rs11274220	Intron 1	6: 44191783	Del>Ins20bp	17,5	0,6	
	rs693955	Intron 1	6: 44191920	G>T	21,6	0,2	
	rs1886884	Intron 1	6: 44192158	T>C	44,3	1,0	
	rs747199	Intron 1	6: 44194345	G>C	20,6	0,07	
	rs9394992	Intron 2	6: 44195992	C>T	30,2	1,0	
	rs324148	Intron 2	6: 44196578	G>A	33,0	0,2	
	rs324149	Intron 2	6: 44196995	C>T	29,9	0,8	
	rs45573936 =Ile216Thr	Exon 7	6: 44198362	T>C	0,5	0,04	
	rs1128930	Intron 11	6: 44200325	T>G	33,0	0,1	
	rs760370	Intron 12	6: 44200953	A>G	35,6	0,2	
	SLC28A1	rs7173860	Intron 1	15: 85429541	C>A	42,2	0,5
		rs3743162	Intron 2	15: 85430969	G>A	19,9	0,08
		rs7182385	Intron 5	15: 85435076	C>T	36,6	0,3
		rs1545471	Intron 5	15: 85437979	G>T	37,3	0,2
rs17215836		Exon 6	15: 85438312	C>T	30,3	0,6	
rs12914194		Intron 6	15: 85447079	C>T	11,0	0,5	
rs1545470		Intron 6	15: 85447220	C>T	22,3	0,8	
rs2290272		Exon 7	15: 85447431	C>T	33,9	0,7	
rs8187758		Exon 8	15: 85448875	G>T	22,5	0,5	
rs4247408		Intron 8	15: 85449072	G>A	43,6	1,0	
rs16974612		Intron 9	15: 85455272	A>C	23,8	0,8	
rs11853372		Intron 9	15: 85456346	G>T	33,2	0,05	
rs4980347		Intron 9	15: 85457841	G>A	38,0	0,3	
rs4980346		Intron 9	15: 85457975	C>T	41,4	0,04	
rs12910476		Intron 11	15: 85466703	C>T	23,9	0,6	
rs12910991		Intron 11	15: 85467070	T>C	32,2	0,6	
rs3803390		Exon 12	15: 85467275	C>T	5,3	0,3	
rs4248928		Intron 12	15: 85470777	C>G	56,8	0,9	
rs12915914		Intron 12	15: 85472317	G>A	43,5	0,4	
rs2242048		Exon 14	15: 85478410	G>A	11,1	0,1	
rs2242046	Exon 15	15: 85478729	T>C	47,3	0,8		
SLC28A3	rs10868154	Promotor -1577 (-29442)	9: 86984990	A>T	18,2	1,0	
	rs10868152	Intron 2	9:86970543	C>T	27,0	0,1	
	rs11140542	Intron 2	9:86966088	A>T	20,3	0,5	

Gen ¹	SNP ²	Genetisches Element	Chromosomale Lokalisation ⁴	Basen-Austausch ⁵	MAF ⁶ (%)	p ^{Survival} (HD) ⁷	
SLC28A3	rs4266723	Intron 2	9:86948616	A>G	23,6	0,4	
	rs17087144	Intron 2	9:86964718	A>T	31,7	0,9	
	rs17343066	Intron 2	9: 86946073	A>G	48,5	0,3	
	rs12004882	Intron 2	9:86938059	G>C	18,3	0,2	
	rs11140525	Intron 2	9:86937315	G>A	25,8	0,5	
	rs10735568	Intron 2	9:86934730	G>A	20,8	0,3	
	rs10122651	Intron 2	9: 86933884	C>A	16,8	0,3	
	rs10780660	Intron 3	9: 86925846	T>A	18,3	0,1	
	rs7867504	Exon 5	986.920.236	T>C	26,5	0,4	
	rs4585823	Intron 12	9:86904185	G>A	13,5	0,6	
	rs7853758	Exon 14	9:86900926	G>A	11,3	0,8	
	rs56350726	Exon 15	9:86900369	A>T	6,1	0,5	
	PTCH1	rs71366293	5'UTR	9: 98270669	Del>InsCGG	26,3	0,1
		rs10512249	Intron 2	9: 98256309	C>T	11,9	0,4
rs473902		Intron 2	9: 98256235	A>C	6,2	0,8	
rs574688		Intron 10	9: 98239190	G>C	21,9	0,7	
rs2066836		Exon 12	9: 98238358	C>T	26,8	0,2	
rs2236407		Intron 12	9: 98237796	A>G	45,4	0,05	
rs357564		Exon 23	9: 98209594	G>A	31,4	0,04	
rs357565		3'UTR	9: 98205443	G>T	25,8	0,7	
rs16909856		<i>upstream</i> +771	9:98204493	C>T	9,8	0,6	
rs357563		<i>upstream</i> +1065	9:98204199	C>T	35,1	0,9	
SHH		rs288746	Promotor -1705 (-1856)	7: 155606672	T>C	16,0	0,4
	rs872723	Promotor -777 (-928)	7: 155605744	C>T	17,5	0,3	
	rs756884	Intron 1	7: 155604099	G>A	9,8	0,9	
	rs9333596	Intron 1	7: 155603978	T>C	16,7	0,4	
	rs1233556	Intron 1	7: 155600417	G>A	19,1	0,7	
	rs1233571	<i>upstream</i> +1264	7: 155594294	G>A	16,0	0,4	
	rs1233560	<i>upstream</i> +2120	7: 155593438	G>A	52,1	0,7	
	SMO	rs6962740	Promotor -1902 (-2182)	7: 128826811	C>G	22,2	0,8
rs11762252		Intron 1	7: 128834345	C>G	7,7	0,5	
rs2718107		Intron 1	7: 128838659	T>G	44,8	0,9	
rs4731562		Intron 1	7: 128842573	C>T	32,8	0,7	
rs2566871		Intron 1	7: 128843169	C>T	50,5	0,3	
rs2228617		Exon 6	7: 128846328	G>C	15,5	0,8	

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Brockmöller, Leiter des Instituts für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen, für die Überlassung des interessanten Themas, für seine fachlichen Anregungen und die Gewährung des Stipendiums im Graduiertenkolleg 1034.

Besonderer Dank gebührt Dr. med. Markus Schirmer für seine vorbildliche Betreuung, stete Hilfsbereitschaft, prompte Problemlösung und die am Rande geführten interessanten politischen Diskussionen. Durch sein unermüdliches Engagement hat er maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Doktorarbeit. Zudem möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinischen Pharmakologie danken, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Dankend erwähnt werden sollen ebenfalls meine Mitdotorandinnen und Mitdotoranden, insbesondere Dr. med. Alexander Schaudinn und Dr. Sebastian Roppel.

Ich danke Prof. Dr. med. Michael Ghadimi und Dr. med. Jochen Gaedcke für die konstruktiven Anregungen bei der Realisierung des Projektes und die Bereitstellung der Nachsorgedaten der Göttinger Patientenkohorte.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. med. Heinz-Joachim Radzun, Leiter der Abteilung für Pathologie, für die freundliche Überlassung der Pankreaskarzinom-Präparate danken. Besonderen Anteil an dem Gelingen der immunhistochemischen Färbungen und der Auswertung der Immunhistochemie trägt Dr. med. Julia Kitz. Herzlichen Dank für die vielen, neben den sonstigen Verpflichtungen, investierten Stunden. Bei Mercedes Martin-Ortega, Judita Wolf-Slago und Sisko Baberske möchte ich mich für die Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen und ihre Unterstützung bei allen praktischen Arbeiten bedanken.

Einen bedeutenden Betrag zu dieser Arbeit haben Prof. Dr. Jens Werner (Universitätsklinikum Heidelberg) und Dr. Cenap Güngör (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durch die freundliche Bereitstellung der DNA-Proben und Nachsorgedaten geleistet, dafür an dieser Stelle vielen Dank.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Mutter für die fortwährende Unterstützung auf dem Weg zu meiner beruflichen Verwirklichung danken.

Curriculum Vitae

Am 01.08.1980 wurde ich in Erfurt als einziges Kind meiner Eltern Angela Zimmer und Volker Henkel geboren.

Von 1987 bis 1991 besuchte ich die Grundschule der POS 7 „Johann Gutenberg“ und im Anschluss daran das Johann-Gutenberg-Gymnasium in Erfurt. 1991 wechselte ich dann auf das Heinrich-Mann-Gymnasium in Erfurt und erlangte dort im Juni 2001 die Allgemeine Hochschulreife.

Meinen Wehrersatzdienst leistete ich von 2001 bis 2002 in der psychiatrischen Abteilung des katholischen Krankenhauses „St. Johann Nepomuk“ in Erfurt.

Im September 2002 begann ich ein Studium im Fachbereich Pflege und Gesundheit an der Fachhochschule Fulda, welches ich nach bestandenem Vordiplom wegen der Zulassung zum Studium der Humanmedizin in Göttingen im März 2004 abbrach. Ab April 2004 widmete ich mich dem Medizinstudium und erhielt im November 2010 nach erfolgreich abgelegtem Staatsexamen meine Approbation als Arzt.

Im Februar 2011 ermöglichte mir ein Doktorandenstipendium des Graduiertenkollegs 1034 (Thema: „Die Bedeutung genetischer Polymorphismen in der Onkologie: Von den Grundlagen zur individualisierten Medizin“) die Aufnahme einer Dissertationsarbeit im Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen. Die Betreuung wurde von Prof. Dr. med. Jürgen Brockmöller übernommen.

Seit März 2013 arbeite ich als Assistenzarzt der Abteilung für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde im Ilm-Kreis-Klinikum Arnstadt.