

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**Rolle von KRAS und EGFR Expression bei Erlotinib behandelten  
Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom: Translationale  
Untersuchung einer randomisierten Phase- III- Studie der  
„Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie“ (AIO-PK 0104)**

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

vorgelegt von  
Rosalind Egg  
aus Mainz  
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. V. Heinemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Habs  
PD Dr. Robert Kammerer

Mitbetreuer: PD. Dr. med. S. Böck

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>IN DANKBARKEIT MEINEN ELTERN</b>	<b>6</b>
<b><u>1. EINLEITUNG</u></b>	<b>7</b>
<b>1.1. DAS PANKREASKARZINOM</b>	<b>7</b>
1.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE	7
1.1.2 ANATOMIE UND PATHOLOGIE	8
1.1.3 DIAGNOSTIK UND STAGING	10
1.1.4 THERAPIE	10
<b>1.2. KRAS MUTATION</b>	<b>13</b>
<b>1.3. EGFR REZEPTOR UND DER EGFR SIGNALTRANSDUKTIONSWEG</b>	<b>15</b>
<b>1.4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>17</b>
<b><u>2. METHODEN UND PATIENTEN</u></b>	<b>18</b>
<b>2.1. PATIENTEN</b>	<b>18</b>
<b>2.2. PROBENVERARBEITUNG</b>	<b>22</b>
<b>2.3. METHODEN</b>	<b>22</b>
2.3.1 KRAS	22
2.3.2. FISH	28
<b>2.4. DATENAUSWERTUNG</b>	<b>34</b>
<b><u>3. ERGEBNISSE</u></b>	<b>36</b>
<b>3.1. PATIENTEN</b>	<b>36</b>
<b>3.2. KRAS MUTATIONSSTATUS</b>	<b>39</b>
3.2.1 KORRELATION ZWISCHEN KRAS-MUTATIONSSTATUS UND AUSGEWÄHLTEN PATIENTENCHARAKTERISTIKA	40
3.2.2 KORRELATION ZWISCHEN DEM KRAS-MUTATIONSSTATUS UND DEN EFFEKTIVITÄTS- ENDPUNKTEN (ZEIT BIS ZUM VERSAGEN DER ERSTLINIENTHERAPIE (TTF1) UND ZEIT BIS ZUM VERSAGEN DER ZWEITLINIENTHERAPIE (TTF2))	42
3.2.3 EINFLUSS DES KRAS-STATUS AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN	42
<b>3.3. EGFR FISH</b>	<b>44</b>
3.3.1 EGFR FISH (POSITIV/NEGATIV) IN KORRELATION MIT AUSGEWÄHLTEN PATIENTENCHARAKTERISTIKA	45
3.3.2 EGFR FISH (POSITIV/NEGATIV) IN KORRELATION MIT DEN EFFEKTIVITÄTS-ENDPUNKTEN ZEIT BIS ZUM VERSAGEN DER ERSTLINIENTHERAPIE (TTF1), DER ZEIT ZUM VERSAGEN DER ZWEITLINIENTHERAPIE (TTF2) UND GESAMTÜBERLEBEN (OS))	47
3.3.3 KORRELATION ZWISCHEN DEM EGFR FISH-SCORE (1-6) MIT TTF1, TTF2 UND OS	48
<b>3.4. EGFR IHC</b>	<b>48</b>
3.4.1 EGFR IHC-POSITIV/ NEGATIV KORRELIERT MIT AUSGEWÄHLTE PATIENTENCHARAKTERISTIKA	49
3.4.2 EGFR IHC-POSITIV/NEGATIV KORRELIERT MIT DEN EFFEKTIVITÄTSENDPUNKTEN (ZEIT BIS ZUM VERSAGEN DER ERSTLINIENTHERAPIE (TTF1), DER ZEIT ZUM VERSAGEN DER ZWEITLINIENTHERAPIE (TTF2) UND DEM GESAMTÜBERLEBEN (OS))	51
3.4.3 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM EGFR IHC-SCORE MIT TTF1, TTF2 UND OS	52
<b>3.5. KORRELATION ZWISCHEN EGFR FISH UND EGFR IHC</b>	<b>53</b>
<b>3.6. KORRELATION ZWISCHEN DEN BIOMARKERN UND DEM AUFTRETEN VON HAUTAUSCHLAG ( GRAD I- IV) 53</b>	<b>53</b>
<b>3.7. MULTIVARIATE ANALYSEN ABGESCHLOSSENER FÄLLE</b>	<b>54</b>
<b><u>4. DISKUSSION</u></b>	<b>57</b>
<b>4.1. DISKUSSION DER METHODIK</b>	<b>57</b>

4.1.1 KRAS	57
4.1.2 EGFR FISH	58
4.1.3 EGFR IHC	59
<b>4.2. DISKUSSION DER VERSCHIEDENEN BIOMARKER</b>	<b>61</b>
4.2.1 KRAS-MUTATIONSSTATUS	61
4.2.2 EGFR FISH	63
4.2.3 EGFR IHC	64
4.2.4 SKIN RASH	65
<b>4.3. AUSBLICK</b>	<b>66</b>
<b><u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>68</b>
<b><u>6. LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>69</b>
<b><u>7. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN</u></b>	<b>76</b>
<b><u>8. DANKSAGUNG</u></b>	<b>78</b>

## Abkürzungsverzeichnis

CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPD	Desoxypyridinolin
EGFR	Epidermal-growth-factor-receptor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
IHC	Immunhistochemie
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MRT	Magnetresonanztomographie
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
OS	Overall survival
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
SSC	Saline Sodium Citrate
TTF1	Time-to-treatment failure 1 (Erstlinientherapie)
TTF2	Time-to-treatment failure 2 (Erst- und Zweitlinientherapie)
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
5-FU	5-Fluorouracil

**In Dankbarkeit meinen Eltern**

# 1. Einleitung

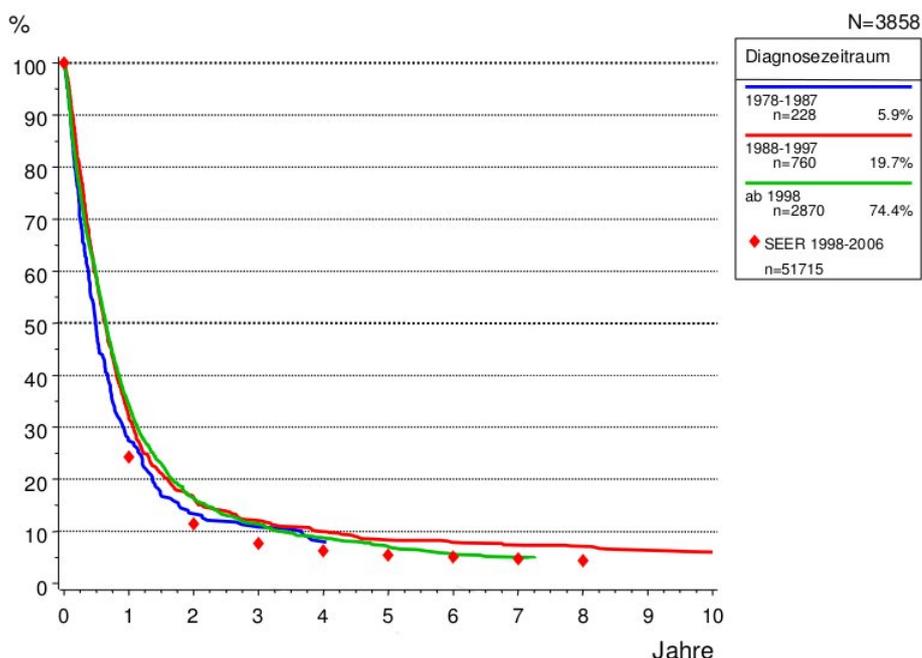
## 1.1. Das Pankreaskarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Pankreaskarzinom stellt eine der bösartigsten Tumorerkrankungen des Menschen dar. Es gehört zu den 10 häufigsten Krebserkrankungen und nimmt in der Statistik der Krebstodesfälle weltweit bei Männern den achten und bei Frauen den neunten Platz ein (*Kamangar et al., 2006*). Ohne weitere Therapien haben die Patienten eine mittlere Überlebenszeit von nur 3 Monaten. Die 5-Jahres-Überlebensraten sind ungünstig und liegen bei unter 5% (*Jemal et al., 2008*).

Die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr wird auf ca. 6380 für Männer und ca. 6980 für Frauen geschätzt (*RKI, Stand 2006*). In ca. 95% der Fälle handelt es sich um ein Adenokarzinom des exokrinen Pankreas. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 68 Jahren und für Frauen bei 75 Jahren (*Adler et al., 2007*). Das Erkrankungsrisiko liegt für beide Geschlechter bei etwa 1,4%. Gesammelte Daten des Tumorregisters München zeigen, dass im Zeitraum von 1978- 2006 beim Pankreaskarzinom keine Besserung des relativen Überlebens erreicht werden konnte (siehe Abbildung 1, Tumorregister München).

Abbildung 1: Relatives Überleben für Pankreaskarzinom nach Diagnose im Zeitraum von 1978 bis 2007.



Tabakkonsum gilt als gesicherter Risikofaktor. Der Tumor tritt bei diesen Patienten 2-2,5mal häufiger auf als bei Nichtrauchern (*Adler et al., 2007*). Adipositas, fett- und fleischreiche Ernährung, chronische Pankreatitis, eine Leberzirrhose, sowie eine vorangegangene Cholezystektomie scheinen ebenfalls das Risiko für ein Pankreaskarzinom zu steigern (*Batty et al., 2009; Lowenfels et al., 2006; Genkinger et al., 2009*). Des Weiteren wird ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Diabetes Typ 2 Patienten vermutet (*RKI, Stand 2006*). Ebenfalls als Risikofaktoren gelten Strahlenexposition, der Zustand nach Magenteilresektionen und die berufsbedingte Exposition mit Chemikalien, wie z.B. chlorhaltige Lösungsmittel (*Adler et al., 2007*). Andererseits sollen körperliche Aktivität, Obst und Gemüse protektiv wirken. Letztlich ist aber noch nicht abschließend geklärt, welche Rolle Umweltfaktoren spielen. Eine weitere wichtige Rolle in der Pathogenese des exokrinen Pankreaskarzinoms schreibt man der Mutation von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen zu. Mit einer Mutationshäufigkeit von bis zu 95% hat hier das KRAS-Onkogen eine der bedeutendsten Rollen.

Für das Vorliegen einer genetischen Komponente, sprechen zahlreiche Berichte über die familiäre Häufung und eine Fall-Kontroll-Studie, in der Verwandte von Patienten mit sporadischem Pankreaskarzinom ein höheres Erkrankungsrisiko haben (*Ghadirian et al., 2002*).

### **1.1.2 Anatomie und Pathologie**

Das Pankreas ist ein Organ des Oberbauchs. Hier steht es in enger Lagebeziehung zu Magen, Milz, Leber, Duodenum und den großen Bauchgefäßen (Vena cava inferior und Aorta). Anatomisch baut sich das Pankreas aus Caput (rechts der Wirbelsäule), Corpus und Cauda (grenzt an die Milz) auf. Es lässt sich grob in einen exokrinen und einen endokrinen Anteil aufteilen. Der endokrine Pankreasanteil befindet sich im ganzen Pankreas, hauptsächlich ist er jedoch im Pankreasschwanz und -körper zu finden. Die funktionelle Einheit bilden Inselzellen (endokrine Drüsen), welche die Produktion der Pankreashormone Insulin, Glukagon und Somatostatin übernehmen, die unter anderem den Blutzuckerspiegel kontrollieren. Das exokrine Pankreas ist eine rein seröse Drüse. Täglich werden hier zahlreiche Verdauungsenzyme produziert, bis zu 1,5 Liter/Tag. Aufgrund dieser Funktion ist das Pankreas mit einem Ausführungsgang (Ductus pancreaticus), welcher zusammen mit dem von Leber und Gallenblase kommenden Ductus choledochus, über die Papilla duodeni major in das Duodenum mündet (*Schünke et al., 2009*), ausgestattet.

Auch die Nomenklatur der Pankreastumoren richtet sich nach der Aufteilung in einen endokrinen und einen exokrinen Anteil. Letztere sind die weitaus häufigeren Pankreaskarzinome. Meistens handelt es sich hierbei histologisch um ein duktales Adenokarzinom, welches in etwa 70-80% im Pankreaskopf lokalisiert ist. Grundsätzlich kommen Pankreaskarzinome aber in jedem Teil des Organes vor. Typische endokrine Karziome sind das Insulinom, das Gastrinom, das Karzinoid und das VIPom; diese spielen jedoch mit 1-3% im klinischen Alltag nur eine untergeordnete Rolle.

Da die Karzinome des Pankreas meist frühzeitig die Organgrenzen überschreiten und infiltrieren, ist die Prognose äußerst schlecht. Besonders ungünstig ist der Lymphgefäß- oder Veneneinbruch des Karzinoms. Aufgrund seiner zentralen Lage im Oberbauch, metastasiert das Pankreaskarzinom je nach Lokalisation in den Magen, das Duodenum, die Gallenblase, die Leber, die Milz, die linke Nebenniere oder das Peritoneum (*Rosewicz et al., 1997*). In 75% aller Fälle befinden sich die Metastasen in der Leber, gefolgt von organfernen Lymphknotenmetastasen und Lungenmetastasen (*Yeo et al., 2002*). In Abbildung 2 ist die Einstufung des Pankreaskarzinoms nach dem TNM-Klassifikationssystem der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) aufgeführt (s. Tabelle 1).

Abbildung 2: Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms nach UICC

Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium II	T3	N0	M0
Stadium III	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IVA	T4	jedes N	M0
Stadium IVB	jedes T	jedes N	M1

T1:  $\leq 2$ cm, begrenzt auf Pankreas;

T2:  $> 2$ cm, begrenzt auf Pankreas;

T3: Ausbreitung in Duodenum, Ductus choledochus und peripankreatisches Fettgewebe;

T4: Ausbreitung in Magen, Milz, Kolon und große Gefäße;

N0: Kein Lymphknotenbefall; N1: Regionale Lymphknotenmetastasen;

M0: Keine Fernmetastasen; M1: Fernmetastasen

### 1.1.3 Diagnostik und Staging

Häufige unspezifische Symptome sind Rückenschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Gewichtsabnahme, Ikterus und Glucoseintoleranz. Meist sind diese jedoch Ausdruck eines bereits lokal fortgeschrittenen Befundes. Oftmals erfolgt die Diagnose erst durch das Auftreten eines schmerzlosen Ikterus, durch Obstruktion des Ductus choledochus, Aszites, Oberbauchtumor oder Lebervergrößerung. Gelegentlich äußert sich das Pankreaskarzinom des Pankreaskopfes auch durch das Auftreten des Courvoisier-Zeichens, eine tastbar vergrößerte Gallenblase. Im Verlauf der Erkrankung können auch Symptome wie rezidivierende Thrombosen, Malabsorption und Inappetenz auftreten. Die Progression des Pankreaskarzinoms zeigt sich bei 75% der Patienten mit teilweise starken Schmerzen.

Typisch veränderte Laborparameter beim Pankreaskopfkarzinom sind die Leberwerte (GPT) und die Cholestasewerte ( $\gamma$ -GT, AP). Den wichtigsten Parameter in der Verlaufskontrolle spielt heute jedoch der Tumormarker CA 19-9 (*Ritts et al., 1998*).

Die histologische Sicherung des Pankreaskarzinoms zählt zu den obligaten Diagnosemethoden. Zur Beurteilung der lokalen Tumorausdehnung gelten die Computertomographie (CT) und die Endosonographie als Standard (*Adler et al., 2007*). Bei der systemischen Tumorausbreitung sind die Abdomensonographie und das Thoraxröntgen obligat, zudem kann ggf. ein Abdomen-CT/MRT durchgeführt werden. Klinisch durchgesetzt hat sich die CT-Untersuchung, sowohl in der Diagnostik als auch im Staging (*Horton et al., 2002*). Ebenfalls angewendet wird die MRT, um kleine Tumorbereiche darstellen zu können. Im Bereich des Stagings ist der Stellenwert der PET-Untersuchung noch nicht klar definiert; möglicherweise liefert die PET zusätzliche Informationen bezüglich der Ausdehnung des Karzinoms und erlaubt zudem eine nicht-invasive Einordnung der Malignität des Tumors (*Saisho et al., 2004*).

### 1.1.4 Therapie

Prinzipiell unterscheidet man zwischen einem kurativen und einem palliativen Ansatz. Der einzig kurative Ansatz sieht eine komplette chirurgische Tumoresektion im Gesunden (R0) vor, dies ist aber nur in wenigen Fällen angezeigt. Der Stellenwert der Strahlentherapie mit oder ohne Chemotherapie präoperativ, intraoperativ und/oder adjuvant ist nicht gesichert und sollte nur im Rahmen von klinischen Studien erfolgen (*Adler et al., 2007*). Präoperativ lässt sich die Strahlentherapie jedoch zur Tumormassenverkleinerung einsetzen und ermöglicht es so, in manchen Fällen doch noch einen operativen Eingriff vorzunehmen und somit eventuell

das Überleben zu verlängern (*Rau et al., 2002*). An jede Operation schließt sich eine sechsmonatige adjuvante Gemcitabin-Chemotherapie an, eine adjuvante Therapie mit 5-FU/Folinsäure wird derzeit als äquieffektiv angesehen (*Adler et al., 2007*).

Einen wichtigen Stellenwert in der Chemotherapie des Pankreaskarzinoms hat mittlerweile Gemcitabin eingenommen. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium zeigte sich in mehreren Studien ein deutlicher Überlebensvorteil (*Hidalgo et al., 2010*). Vor Einführung von Gemcitabin war 5-Fluorouracil (5-FU) das am häufigsten eingesetzte Zytostatikum; die Überlebensrate wird mit 5-FU allerdings nur geringfügig verlängert (*Ahlgren et al., 1996*). Daneben gibt eine große adjuvante Studie (CONKO-001) Hinweise darauf, dass eine postoperative Chemotherapie mit Gemcitabin zu einer signifikanten Verlängerung der rezidivfreien Zeit und zu einem verbesserten Gesamtüberleben führen kann (*Neuhaus et al., 2008*). Ebenfalls zeigte sich durch die palliative Therapie mit Gemcitabin eine deutliche Verbesserung der Tumorsymptomatik (*Casper et al., 1994; Carmichael et al., 1996*).

Bestätigt wurde diese Aussage auch durch zwei weitere Studien (*Rothenberg et al., 1996; Burris et al., 1997*), wobei letztere die Überlegenheit von Gemcitabin gegenüber 5-FU nachwies. Zudem zeigte sich in kleinen Phase II Studien, dass Gemcitabin die Strahlensensibilität erhöhen kann und in Kombination mit Cisplatin und Bestrahlung zu synergistischen Therapieeffekten führen kann (*Wilkowski et al., 2004*). Beim lokal fortgeschrittenen inoperablen Pankreaskarzinom gilt die kombinierte Radiochemotherapie derzeit als wirksamste Maßnahme, aber nur für Patienten mit gutem Allgemeinzustand, auch hier wird eine sechsmonatige Gemcitabin Therapie empfohlen (*Adler et al., 2007*). Eine Heilung ist jedoch mittels Chemotherapie nicht möglich. Es lässt sich zwar bei wenigen Patienten eine Tumorremission erreichen, dies geht oftmals auch mit einer verbesserten Lebensqualität der Patienten einher.

Capecitabin ist ein orales Fluoropyrimidin und 5-FU Prodrug. Es gleicht in pharmakologischer Sicht einer kontinuierlichen 5-FU Dauerinfusion, wobei den Patienten die Belastung einer Dauerinfusion erspart bleibt. Die bisher gesammelten Erfahrungen mit Capecitabin belegen die gute Wirksamkeit und Verträglichkeit der Substanz u. a. beim Mamma- und beim Kolonkarzinom, so dass Capecitabin in Deutschland für beide Tumorentitäten bereits zugelassen ist. In einer ersten Phase II Studie zeigte sich bei einer Monotherapie mit Capecitabin an 38 auswertbaren Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Pankreaskarzinom, dass 3 eine partielle Remission und 11 eine Krankheitsstabilisation erreichten. 17 Patienten wiesen eine „clinical benefit response“ und 9 keine Verschlechterung

Ihres Zustandes auf. Die mediane Überlebenszeit betrug 7 Monate. In einer randomisierten Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die Hinzugabe von Capecitabin zum Gemcitabin-Regime das Überleben verbessern kann (*Cunningham et al., 2005*). Eine Fluoropyrimidin-basierte Therapie scheint zudem bei selektionierten Patienten auch eine Rolle in der Zweitlinienbehandlung nach Gemcitabin Versagen zu spielen (*Boeck et al., 2008*).

Mit modernen molekularen Therapieansätzen wie der gezielten EGFR Rezeptorblockade durch den oralen Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib, ergeben sich auch beim Pankreaskarzinom neue Therapieoptionen. Beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom konnte durch die Kombination von Erlotinib mit Gemcitabin in einer randomisierten Phase III Studie eine statistisch signifikante - jedoch klinisch moderate - Überlebensverlängerung erreicht werden (*Moore et al., 2007*); dies führte 2007 auch in Deutschland zur Zulassung der Gemcitabin/Erlotinib Therapie beim metastasierten Pankreaskarzinom. Auch die Kombination von Erlotinib mit Capecitabin zeigte in einer Phase II second-line Studie einen klinischen Nutzen (*Kulke et al., 2007*). Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es jedoch noch keinen prädiktiven Marker für die Effektivität der Erlotinib Therapie beim Pankreaskarzinom.

Die am häufigsten beobachtete Nebenwirkung unter der anti-EGFR Therapie mit Erlotinib ist das Auftreten eines akneiformen Hautausschlages („Skin Rash“), welcher meist auf das Gesicht und den Oberkörper beschränkt ist. Dieser tritt meist in den ersten Wochen der Therapie auf. Das Auftreten dieses Hautausschlages korreliert mit einem längeren Überleben bei Pankreaskarzinompatienten (*Moore et al., 2007*). Moore und Kollegen zeigten in ihrer Phase III Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Grad des Hautausschlages und dem Überleben: das mediane Überleben war bei Grad 0 5,3 Monate, bei Grad 1 5,8 Monate und bei Grad  $\geq 2$  10,5 Monate. Auch die 1-Jahres-Überlebensrate war bei den Patienten mit Hautausschlag  $\geq$  Grad 2 deutlich höher (43% vs. 16%) (*Moore et al., 2007*). Auch in einer Folgestudie zeigte sich, dass Patienten mit einem Hautausschlag  $\geq$  Grad 2 ein längeres Überleben hatten als Patienten mit einem Hautausschlag  $<$  Grad 2 (10.2 Monate vs. 5 Monate) (*Aranda et al., 2010*). Dies spricht dafür, dass nicht nur der Hautausschlag, sondern auch die Ausprägung des Hautausschlages eine Rolle spielen. Jedoch lässt sich aktuell noch nicht unterscheiden, ob die Rolle des Hautausschlages als prognostischer oder prädiktiver Marker zu werten ist.

## 1.2. KRAS Mutation

KRAS gehört neben 2 anderen Genen, NRAS und HRAS, zur RAS Familie welche GTPasen darstellen. Es ist ein Proto-Onkogen und liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 12. Es spielt eine zentrale Rolle in einem Signaltransduktionsweg, der Zellwachstums- und Differenzierungsprozesse kontrolliert (*Wittinghofer et al., 1991*). Die Aktivierung von KRAS findet durch die Bindung von GTP statt. Diese aktive Form hat jedoch nur eine relativ kurze Aktivität, da GTP schnell wieder zu GDP hydrolysiert wird. Wenn KRAS durch die Bindung von GTP aktiviert wird, löst es im selben Schritt die Rekrutierung von mehreren Enzymen aus, welche letztendlich die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren nach sich ziehen. In Abbildung 3 sind die einzelnen Schritte des KRAS Signalweges dargestellt.

Bei einer Mutation kommt es zu einer Konfigurationsänderung im KRAS-Protein und somit wird die Fähigkeit als eigene GTPase und mit GTPase aktivierendem Protein (GAP) zu interagieren verringert (*Fearon et al., 1993*). Als Folge dieses Prozesses kommt es zu einer Aktivitätssteigerung des KRAS-Gens und somit zu einem permanenten wachstumssteigernden Signal (*Fukushima et al., 2001*). Mutationen im KRAS-Gen treten bei 70-90% der Pankreaskarzinome auf (*Maire et al., 2002; Immervoll et al., 2006*). Diese sehr häufige Mutation stellt wohl eines der frühen Ereignisse in der Tumorprogression dar, da es bereits in den Tumorstadien des Pankreaskarzinoms nachweisbar ist (*Lohr et al., 2005*). Die Aktivierung des KRAS-Onkogens erfolgt in der Regel durch Punktmutationen in Codon 12, 13 und 61 (*Daus et al., 1995*), wobei die meisten Mutationen auf Codon 12 und 13 auftreten und zum Austausch der Aminosäure Glycin gegen die Aminosäure Valin bzw. Aspartat führen (*Maire et al., 2002*).

Auch bei vielen anderen Adenokarzinomen spielt die Mutation im KRAS-Gen auf Codon 12 und 13 eine wichtige Rolle; beim Kolonkarzinom sind es z. B. über 40 % der Mutationen (*Lievre et al., 2006*). In einer aktuellen retrospektiven Studie zeigte sich, dass bei Cetuximab-behandelten Kolonkarzinom-Patienten, welche Chemotherapie resistent sind, eine Mutation auf Codon 13 ein längeres Überleben und progressionsfreies Intervall gegenüber anderen KRAS-Mutationen ergab (*De Roock et al., 2010*). Basierend auf dieser Beobachtung scheinen weitere Untersuchungen von Codon 12 und 13 des KRAS-Gens beim Pankreaskarzinom eine wichtige Rolle zu spielen.

Bei den neuen gezielten anti-EGFR Therapien stellt sich die Frage nach einem molekularen prädiktiven und/oder prognostischen Marker. Bereits in einigen Studien zum Kolonkarzinom zeigte sich, dass KRAS eine wichtige Rolle als prädiktiver Biomarker in der Therapie mit Cetuximab oder Panitumumab spielt (*De Roock et al., 2008; Di Fiore et al., 2007; Van Cutsem et al., 2009; Heinemann et al., 2009*). De Roock et al. berichteten, dass bei KRAS-Wildtyp ein signifikanter Überlebensvorteil bei Cetuximab-behandelten Kolonkarzinompatienten besteht (*De Roock et al., 2008*). Aufgrund dieser und anderer Ergebnisse gehört der KRAS-Status mittlerweile zur routinemäßigen molekularpathologischen Untersuchung vor dem Einsatz von anti-EGFR Antikörpern beim Kolonkarzinom. Ebenfalls beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom sprechen Erlotinib oder Gefitinib behandelte Patienten, deren Tumoren einen KRAS-Wildtyp aufweisen, auf die gezielte EGFR-Therapie möglicherweise besser an (*Pao et al., 2005; Han et al., 2005*).

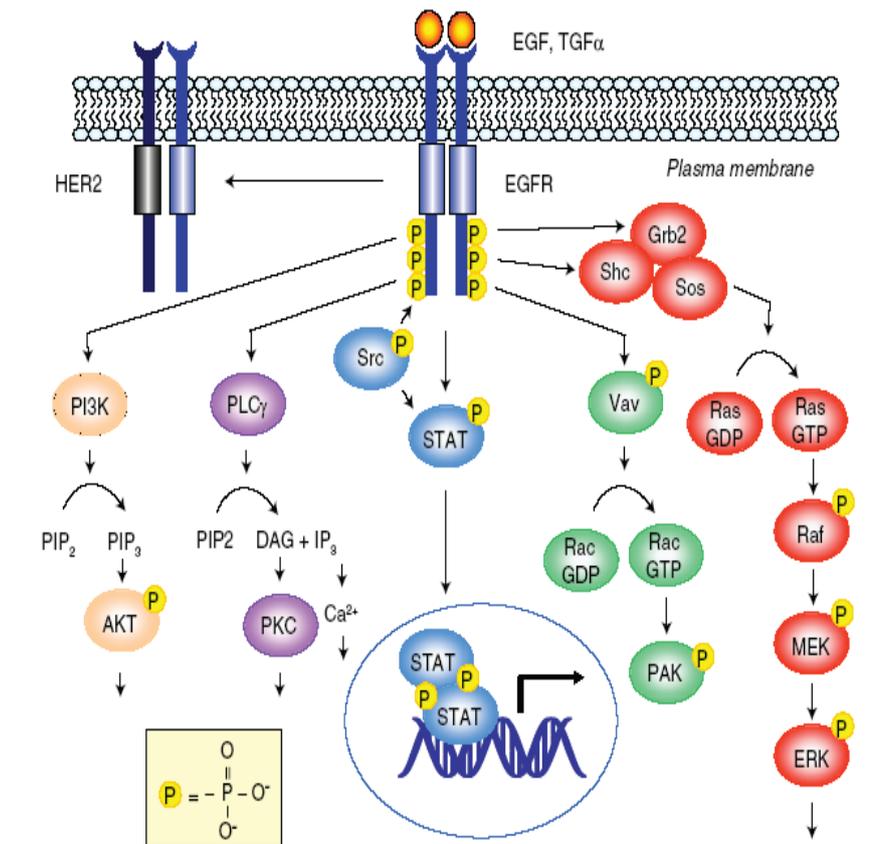
Beim Adenokarzinom des Pankreas ist die Datenlage zur Rolle von KRAS als Biomarker weitaus schlechter. Meist sind die Fallzahlen der untersuchten Kohorten sehr klein und das Studiendesign monozentrisch und retrospektiv. Der KRAS Mutationsstatus scheint jedoch möglicherweise ein prognostischer Marker beim Pankreaskarzinom zu sein: Chen et al. beobachteten in einer Studie mit 91 fortgeschrittenen Pankreaskarzinompatienten, dass Patienten mit einem KRAS Mutationsstatus eine schlechte Prognose und somit eine kürzere Überlebenszeit haben (*Chen et al., 2010*). Lee und Mitarbeiter berichteten ebenfalls, dass die KRAS Mutation einen negativen prognostischen Marker beim Pankreaskarzinom darstellen kann (*Lee et al., 2007*). In einer retrospektiven Subgruppenanalyse der PA.3 Erlotinib-Zulassungsstudie fand sich kein Hinweis auf eine prädiktive Aussagekraft des KRAS Mutationsstatus bezogen auf einen Überlebensvorteil bei einer Erlotinib Behandlung (*Da Cunha Santos et al., 2010*). Aus diesem Grund und der bisherigen guten Datenlage bei anderen Adenokarzinomen scheint die weitere Untersuchung der Rolle des KRAS Mutationsstatus als prognostischer und/oder prädiktiver Biomarker bei Pankreaskarzinompatienten, welche von einer Erlotinib Behandlung profitieren sollen, unbedingt erforderlich.

### 1.3. EGFR Rezeptor und der EGFR Signaltransduktionsweg

Der EGFR-Rezeptor gehört zur erB Familie. Hierbei unterscheidet man 4 verschiedene Tyrosinkinasen erB1, auch EGFR-Rezeptor genannt, erB2 (HER2/neu), erB3 (HER3) und erB4 (HER4) (Yarden et al., 2001). Es handelt sich um einen membranständigen Rezeptor. Durch die Bindung spezieller Liganden (z.B. epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF $\alpha$ ) oder heparin-binding EGF-like growth factor) kommt es entweder zu einer Homomerisierung (EGFR-EGFR) oder zu einer Heteromerisierung (EGFR-HER2) des Rezeptors. Dies führt zu einer größeren Stabilität des Rezeptor-Ligandenkomplexes (Rubin et al., 2001).

Dadurch kommt es zur Tyrosinkinaseaktivierung, welche in der Folge die Phosphorylierung von intrazellulären Effektormolekülen vornimmt. Dies führt zum Ablauf eines komplexen Signaltransduktionsprozesses, der schlussendlich die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren nach sich zieht. Dabei gibt es zwei entscheidende Signalwege, zum einen der RAS/RAF/MEK/ERK Weg und der PI3K/AKT Weg (Marmor et al., 2004). Die folgende Abbildung zeigt die verschiedenen Signalwege.

Abbildung 3: EGFR Signaltransduktionsweg (nach Yeh et al., 2007)



Abkürzungen: DAG: Diacylglycerol, EGFR: Epidermal growth factor, IP3: Inositol-1,4,5-triphosphat, PAK: p21-aktivierte Kinase, PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase, PIP2: Phosphatidylinositol Bisphosphat; PIP3: Phosphatidylinositol Triphosphat; PKC: Protein Kinase C; PLC: Phospholipase C; PTB: Phosphotyrosin Bindungsdomäne, STAT: Signaltransduktor und Aktivator der Transkription, TGF: Transforming growth factor

Betroffen davon sind vor allem die DNA-Transkription und die Proteinbiosynthese, was eine Steigerung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung zur Folge hat (*Rubin et al., 2001; L'Allemain et al., 2003*).

In den 1980er Jahren gab es eine Reihe von Studien, welche die Überexpression von EGFR in verschiedenen epithelialen Tumoren beschrieb und somit den Anstoß für die kritische Betrachtung dieses Rezeptors gaben (*Ullrich A. et al., 1984; Weichselbaum et al., 1987*). In bis zu 90% der Pankreaskarzinome konnte man eine Überexpression der EGFR-Familie feststellen (*Yamanaka et al., 1992; Friess et al., 1995*). Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass fälschlicherweise der Signaltransduktionsweg aktiviert wird. Auch in vielen anderen Tumoren konnte eine Überexpression des EGFR-Gens festgestellt werden. Hierzu zählen unter anderem das Mammakarzinom (*Brandt et al., 2000*), das Kolonkarzinom (*Herynk et al., 2000*) und das Bronchialkarzinom (*Ohsaki et al., 2000*). Dieses Wissen wurde vielfach genutzt um spezifische Medikamente wie Cetuximab (monoklonaler Antikörper) oder Erlotinib (Tyrosinkinaseinhibitor) gegen den EGFR-Rezeptor zu entwickeln.

In der Literatur wird die Rolle des EGFR Rezeptorstatus als prognostischer oder prädiktiver Faktor immer noch kontrovers diskutiert. Moroni et al. analysierten mittels Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) die EGFR Genexpression und fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen hoher EGFR Genkopiezahl und einem Therapieansprechen auf Cetuximab und Panitumumab (*Moroni et al., 2005*). Einige weitere Veröffentlichungen sprechen für den EGFR-Rezeptor als Prognosefaktor (*Zhu et al., 2008; Tzeng et al., 2007*).

Im Gegensatz dazu wird in einigen Studien die EGFR-Genexpression nicht als Biomarker gesehen (*Tzeng et al., 2007; Lee et al., 2007, Chung et al., 2005*). Der EGFR-Expressionslevel und dessen Rolle als prognostischer oder prädiktiver Faktor für die gezielte EGFR-Rezeptorblocker Therapie scheinen somit noch immer nicht abschließend geklärt zu sein. In

großen Studien zum Kolonkarzinom und nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom wurden bereits prädiktive Marker wie die KRAS-Mutation für den Einsatz von Cetuximab und aktivierende EGFR Mutationen für den Einsatz von Gefitinib beschrieben (*Sheperad et al., 2010; Heinemann et al., 2009*). Beim Pankreaskarzinom gibt es jedoch bis heute keinen gesicherten Biomarker für den Erfolg der Erlotinib-Therapie. Aus diesem Anlass und der unsicheren Datenlage scheinen eine erneute Untersuchung der EGFR-Genexpression und seiner Aussagefähigkeit als Biomarker an einer großen Studienpopulation äußerst wichtig.

#### **1.4. Zielsetzung der Arbeit**

Im Zuge der Hauptstudie AIO-PK0104 der deutschen Krebsgesellschaft, welche Gemcitabin/Erlotinib gefolgt von Capecitabin mit Capecitabin/Erlotinib gefolgt von Gemcitabin bei 281 Patienten verglich, wurden diese Ergebnisse mit den Studienendpunkten Zeit bis zum Therapieversagen der Erst- und Zweitlinientherapie und dem Gesamtüberleben korreliert. Die Gewebeprobe der innerhalb dieser multizentrischen, Phase-III Therapieoptimierungsstudie rekrutierten 281 Patienten, konnten im Zuge einer translationalen Begleitstudie, eine Analyse von KRAS und der EGFR-Genexpression beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom, angeschlossen werden. Im Fokus dieser Studie steht die Untersuchung des KRAS-Mutationsstatus, der EGFR-Genkopiezahl, welche durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung analysiert wurde und dem EGFR-Genexpressionslevel, dieses wurde mit Hilfe von Immunhistochemie untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, die im Zuge des translationalen Projektes erhobenen Biomarkerdaten (KRAS-Mutationsstatus/EGFR-Genexpression) auf ihr Auftreten innerhalb der Studienpopulation zu untersuchen, und diese mit den Effektivitätseindpunkten, Zeit bis zum Therapieversagen der Erst- und Zweitlinientherapie und dem Gesamtüberleben, der Hauptstudie zu korrelieren.

Neben der durchgeführten Biomarkeranalyse, sollte die Durchführbarkeit einer translationalen Begleitstudie im Rahmen einer multizentrischen Phase-III-Studie untersucht werden.

## 2. Methoden und Patienten

### 2.1. Patienten

Nach Beendigung der Rekrutierungsphase der Hauptstudie (AIO-PK 0104) konnten insgesamt 281 histologische Proben eines fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms gewonnen werden. Diese wurde aus 46 beteiligten Pathologischen Instituten aus ganz Deutschland rekrutiert. Die Hauptstudie wurde von der Firma ClinAsses als CRO monitoriert. Für das translationale Projekt konnte auf 208 formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Pankreastumorproben zurückgegriffen werden. Hierbei handelte es sich entweder um chirurgische Resektate/Biopsien des Primärtumors oder um metastasiertes Tumorgewebe aus anderen Organen (z.B. Leberstanze, LK-Biopsie). Für die Studie, die nach GCP/ICH durchgeführt wurde, lag zudem ein positives Votum der Ethikkommission der LMU München vor.

Das Studiendesign beinhaltete 2 Studienarme. In Abbildung 4 sind die einzelnen Schemata der Studientherapie übersichtlich zusammengefasst (siehe Abbildung 4). Abbildung 5 zeigt eine Übersicht über die Effektivitätseindpunkte Zeit bis zum Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie.

Die Teilnehmer der AIO-PK0104 Hauptstudie mussten folgende Einschlusskriterien erfüllen:

- Alter zwischen 18 und 75 Jahren
- Histologisch gesicherte Diagnose eines Pankreaskarzinoms im Stadium III oder IV (T 1-3, N1M0 oder T1-3, N0-1, M1)
- Fehlende Option für eine operative Behandlung oder Bestrahlung mit kurativer Absicht
- Mindestens eine messbare oder nicht messbare Läsion (gemäß RECIST)
- keine vorausgegangene Chemotherapie oder systemische Tumortherapie
- keine vorausgegangene Strahlentherapie
- Allgemeinzustand 0-2 nach WHO/ECOG oder >60 nach Karnofsky
- Lebenserwartung von mindestens 3 Monaten
- Möglichkeit der regelmäßigen und längerfristigen Nachsorge
- Negativer Schwangerschaftstest bei gebärfähigen Frauen
- Ausreichende Nieren-, Leber- und Knochenmarksfunktion, definiert als

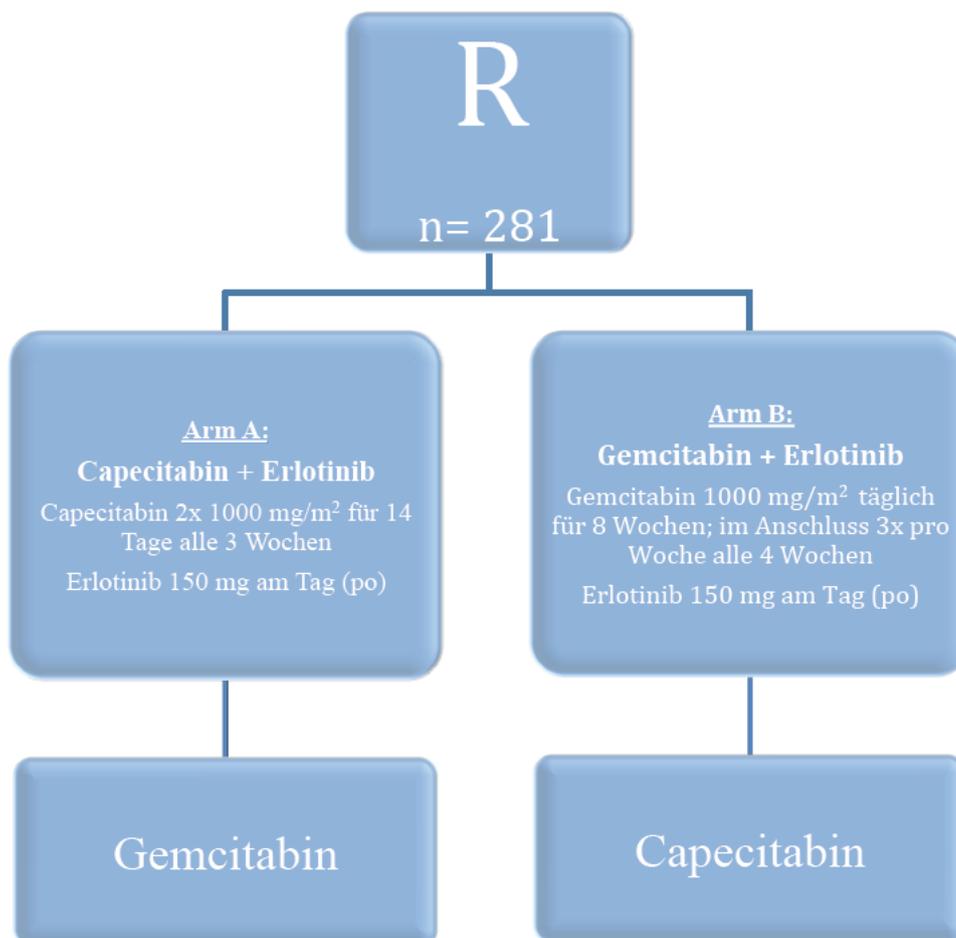
absolute Neutrophilenzahl  $\geq 1,5 \times 10^9/l$   
Hämoglobin  $\geq 8 \text{ g/dl}$   
Thrombozyten  $\geq 100 \times 10^9/l$   
Gesamtbilirubin  $\leq 2 \times$  oberer Normwert (bei Lebermetastasen  $< 5$ -fach)  
Serumkreatinin  $\leq 1,25 \times$  oberer Normwert  
Kreatininclearance  $> 30 \text{ ml/min}$  (nach Cockcroft/Gault)  
Transaminasen  $\leq 2,5 \times$  oberer Normwert (bei Lebermetastasen  $< 5$ -fach)

#### Offizielle Ausschlusskriterien:

- Anamnestisch bekanntes Zweitkarzinom mit Ausnahme eines kurativ behandelten Basalioms der Haut oder eine Carcinoma in situ Cervix uteri
- Klinisch instabile ZNS-Metastasen
- Anamnestisch bekannte Überempfindlichkeit gegenüber einem der eingesetzten Medikamente oder deren Inhaltsstoffe
- Schwere Nierenfunktionsstörung (Ausgangswert der Kreatininclearance  $< 30 \text{ ml/min}$ )
- Schwere Leberfunktionsstörung (Bilirubin  $> 2,0 \times$  über Normwert, Transaminasen  $> 2,5 \times$  über Normwert) oder bekannte Lebermetastasierung  $> 5 \times$  über Normwert
- Klinisch relevante Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems oder anderer lebenswichtiger Organe oder eine schwerwiegende Systemerkrankung, die die Umsetzung des Prüfplans oder die Interpretation der Prüfergebnisse erschwert
- Vorbestehende Polyneuropathie
- Bekannter DPD-Mangel (Screening nicht vorgeschrieben)
- Gleichzeitige Therapie mit dem Virustatikum Sorivudin oder dessen chemischen Verwandten
- Schwangerschaft, Stillzeit oder Fehlen einer zuverlässigen Kontrazeption bei gebärfähigen Frauen
- Psychische Erkrankung, Sucht- oder sonstige Erkrankung, die es dem Betreffenden nicht erlauben, Wesen und Tragweite sowie mögliche Folgen der klinischen Prüfung zu verstehen
- Gleichzeitig Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung oder Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung in den vorausgegangenen 4 Wochen

- Jede andere Erkrankung oder Therapie, die nach Ansicht des Prüfarztes ein Risiko für den Patienten darstellt oder sich nicht mit den Studienzielen vereinbaren lässt
- Hinweis darauf, dass der Betreffende den Prüfplan voraussichtlich nicht einhalten wird, z.B. mangelnde Kooperationsbereitschaft oder keine Möglichkeit zur Wahrnehmung der Kontrolltermine
- Bekannte allergische Reaktion gegen einen oder mehrere der einzusetzenden Tumorthapeutika

Abbildung 4: Übersicht über die Therapieschemata der Hauptstudie AIO-PK0104 (Boeck et al., 2010)



**Studienarm A:** **Capecitabin** 2x1000 mg/m<sup>2</sup>/ d oral, Tag 1 bis 14 gefolgt von 7 Tagen Pause ("Flat Dosing", d.h.Abrundung der Absolutdosis auf ein Vielfaches von 500 mg)

Zykluswiederholung alle 21 Tage

**Erlotinib** 150 mg/d oral, täglich ohne Unterbrechung

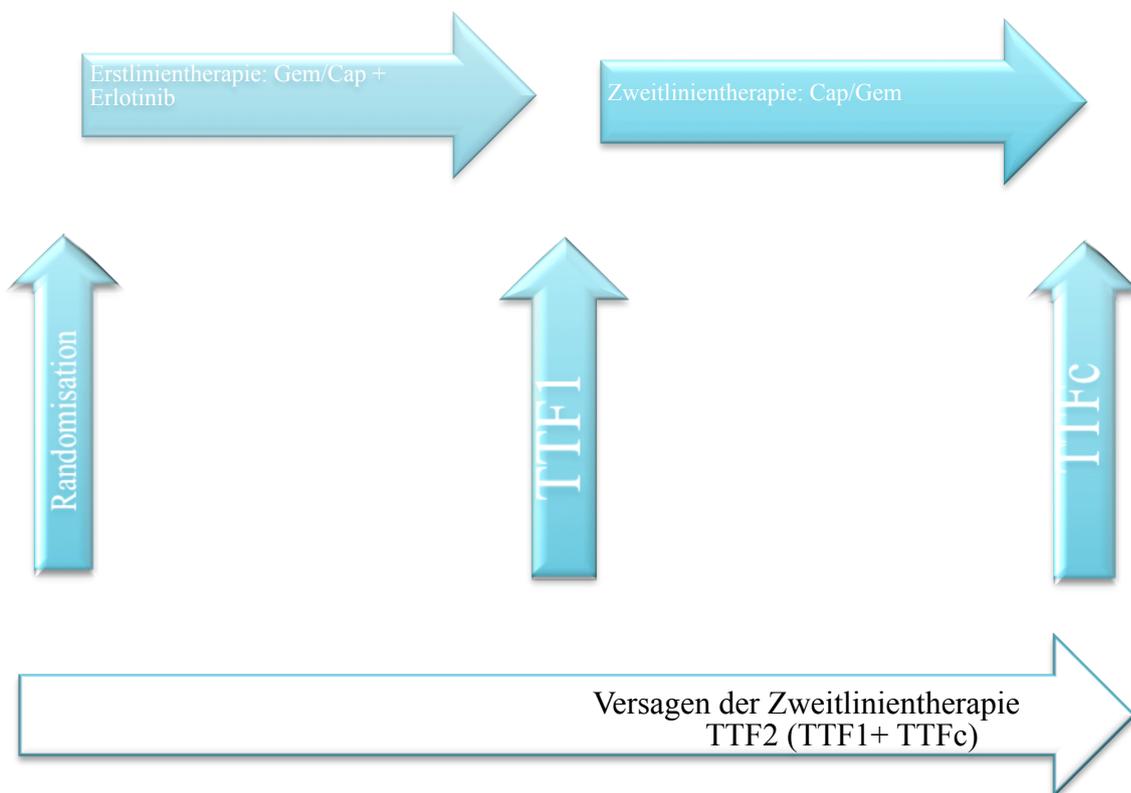
**Studienarm B:**

**Gemcitabin** 1000 mg/m<sup>2</sup>, wöchentlich X 7  
danach ab Woche 9: Gemcitabin 1000 mg/m<sup>2</sup>, Tag 1, 8, 15  
Zykluswiederholung alle 28 Tage

**Erlotinib** 150 mg/d oral, täglich ohne Unterbrechung

Abbildung 5:

Übersicht über die Effektivitätseindpunkte (TTF1/TTF2) der Hauptstudie  
(Boeck et al., 2010)



## **2.2. Probenverarbeitung**

Die erhaltenen Gewebeblöcke wurden mit Hilfe eines Mikrotoms in 4 µm dünne Paraffinschnitte geschnitten und auf einen Superfrost Objektträger aufgebracht. Insgesamt wurden jeweils 11 Schnitte pro Block angefertigt. Jeweils ein Schnitt wurde mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt; mit Hilfe eines Pathologen des Pathologischen Instituts der LMU München wurde der jeweilige Tumorbereich detektiert und markiert.

Nach diesem Schritt wurden die Schnitte in einer Abfolge von 2 x 15 min in reinem Xylol und 2 x 10 min in reinem Alkohol gebadet und damit entparaffiniert. Hierdurch lag das Gewebe frei und konnte der weiterführenden Diagnostik zugeführt werden.

## **2.3.Methoden**

### **2.3.1 KRAS**

#### **2.3.1.2 DNA Gewinnung/ Aufbereitung**

In diesem Arbeitsschritt wurde die benötigte DNA-Menge extrahiert und unter Zuhilfenahme eines Protokolls aufgereinigt.

Die bereits entparaffinierten Schnitte wurden nun mittels eines Mikroskops per Hand mikrodisseziert. Im Anschluss wurde die somit gewonnene DNA in eine gepufferte Proteinase-Lösung gegeben und mit Hilfe des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits (Qiagen, Hilden) lysiert und aufgereinigt. Die nun isolierte DNA wurde über Nacht in einem Thermomixer zunächst 5 Stunden bei 56 °C inkubiert und anschließend 23 Stunden bei Raumtemperatur gelagert.

Am nächsten Tag wurde die DNA mittels des DNAeasy Kits (Qiagen, Hilden) und dem dazugehörigen Qiacube (Qiagen, Hilden) vollständig aufgereinigt. Hierzu wurde die in Proteinase gelöste Probe mit ATE Puffer, AL Puffer, AW1 Puffer, AW2 Puffer und 100% Alkohol vermischt und im Qiacube, anhand eines Protokolls purifiziert.

Nach Ablauf des vorgesehenen Protokolls wurde die gereinigte DNA bei -20°C gelagert.

### **2.3.1.3 PCR**

Die PCR dient der exponentiellen Vervielfältigung bestimmter DNA Sequenzen. Der PCR Prozess besteht aus etwa 50 Zyklen. Die komplette PCR findet in einem Thermocycler statt, welcher die in ihm befindlichen Reaktionsgefäße präzise auf die gewünschten Temperaturen bringt. Im Thermocycler laufen folgende Schritte ab:

Zunächst wird der DNA-Doppelstrang, durch Erhitzen bei 95°C in 2 Einzelstränge zerlegt und somit denaturiert. Während der Hybridisierung lagern sich Oligonukleotide (Primer), welche komplementär zu der zu untersuchenden Nukleinsäuresequenz sind, bei 40°C und 70°C an die Einzelstränge an. Im letzten Schritt wird bei 72°C die thermostabile Taq-Polymerase zugegeben, welche die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auffüllt. Somit wird die gewünschte Menge DNA amplifiziert.

Im Anschluss kühlt der Thermocycler die Proben auf 4°C ab und die PCR-Produkte sind zur weiteren Verarbeitung einsetzbar.

### **2.3.1.4 PCR-Durchführung**

Für den Ansatz der PCR wurde ein Mastermix hergestellt, der im Anschluss auf die einzelnen Proben verteilt wurde. Der Mastermix bestand aus den in Abbildung 7 aufgeführten Substanzen und wurde nach einem bereits etablierten Protokoll der Pathologie der LMU München angesetzt. Als DNA-Polymerase wurde die Hot Star Taq DNA-Polymerase verwendet (Qiagen, Hilden). Die angeführten Primer sind in Abbildung 6 mit ihrer einzelnen Sequenz angegeben.

Es wurden je 2 µl DNA mit 38 µl aus dem Mastermix unter sterilen Arbeitsbedingungen versetzt und in extra dafür vorgesehene Tubes überführt. Diese wurden nach ausgiebigem Vortexen in den Thermocycler gegeben und unter bereits oben beschriebenen Protokoll amplifiziert. Zudem lief zu jedem PCR-Durchlauf stets eine Positiv- und Negativkontrolle mit. Die Positivkontrolle bestand aus 38 µl Mastermix und 2 µl Human Male-DNA (Promega, Mannheim) und die Negativkontrolle aus 38 µl Mastermix.

Abbildung 6: PCR-Primersequenzen

		Sequenz
<b>Primer</b>	<b>D364 KRAS-Pyro-F2-BIO</b>	<b>TGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTG</b>
<b>Primer</b>	<b>D365 KRAS-Pyro-R2</b>	<b>TCGTCCACAAAATGATTCTGA</b>

		Sequenz
<b>Primer</b>	<b>D361 KRAS-Pyro-F1</b>	<b>NNNGGCCTGCTGAAAATGACTGAA</b>
<b>Primer</b>	<b>D362 KRAS-Pyro-R1-BIO</b>	<b>TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT</b>

Abbildung 7: Mastermix PCR

KRAS Exon2	29		Ansätze		1x	MM
	stock		f.c.			
<b>H2O</b>					30,20	<b>1003,40</b>
<b>10xbuffer</b>	10	X	1,0	x	4,00	<b>116,00</b>
<b>MgCl2</b>	25	mM	1,5	mM	2,40	<b>69,60</b>
<b>dNTP</b>	20	mM	0,2	mM	0,40	<b>11,60</b>
<b>Primer-Mix</b>	20	µM	0,4	µM	0,80	<b>23,20</b>
<b>Taq-Pol</b>	5	U/µl	1,0	U	0,2	<b>5,80</b>
QIAGEN Taq					<b>40</b>	
DNA					2,0	

Nach abgelaufener PCR wurde von den jeweiligen Proben eine 2% Agarose-Gelelektrophorese mit Ethanolbromid erstellt (Invitrogen, Darmstadt). In Abbildung 8 ist ein Beispiel aufgeführt.

Abbildung 8:

Gelelektrophorese



In der Elektrophorese kann das PCR-Produkt anhand seiner Größe identifiziert werden. Hierzu werden die Proben in Agarosegel gegeben und unter Spannung gestellt; die kleineren DNA Stränge bewegen sich schneller zum Pluspol. Durch die parallel mitlaufende Leiter (50 bp Marker, Invitrogen, Darmstadt), welche eine bereits bekannte DNA-Länge besitzt, kann man Rückschlüsse auf die Größe des PCR-Produktes ziehen.

### **2.3.1.5 Sequenzierung**

Nach erfolgreicher Gelelektrophorese konnte die amplifizierte DNA dem Pyrosequenzer zugeführt werden. Die Pyrosequenzierung ist eine neue Methode, um schnell DNA zu vervielfältigen. Hierzu verlängert eine DNA-Polymerase, von einem Primer ausgehend, den komplementären DNA Strang.

Nun erfolgt ausgehend von einem Sequenzierungsprimer (Abbildung 9) durch die Zugabe von einem der 4 Nukleosidtriphosphatarten (Guanin, Adenin, Cytidin oder Thymin) die Strangverlängerung. Der Einbau eines Nukleotids wird durch die Luziferase in einen Lichtblitz

umgesetzt, dieser wird von einem Detektor erkannt. Erfolgte die korrekte Zugabe eines Nukleotids, kommt es zu einem Lichtblitz; bleibt dieser aus, wurde das falsche Nukleotid hinzugegeben.

Anhand eines etablierten Protokolls des Pathologischen Institutes der LMU München wurde ein Mastermix aus Wasser, Bindungspuffer (Qiagen, Hilden) und Beads (Streptavidin Sepharose High Performance; GE Healthcare, München) hergestellt. Durch die Zugabe der Beads wurde die DNA immobilisiert und gebunden. Nun wurden jeweils 65 µl des Mixes mit 15 µl des PCR-Produkts vermengt. Gleichzeitig wurden die Sequenzierungsprimer angesetzt (Abbildung 9). Nun wurde unter Zuhilfenahme des PyroMark Q24 Plate (Biotage, Uppsala, Schweden) der jeweilige Sequenzierungsprimer mit dem PCR-Mix versehen. Dies geschah mittels eines Protokolls der Firma Biotage.

Im Anschluss daran wurde der Primer-, PCR-Mix für 2 min auf einer 80°C heißen Heizplatte erhitzt und die DNA somit in 2 Einzelstränge zerlegt.

Abbildung 9: Sequenzierungsprimer

		Sequenz
<b>Primer</b>	<b>D363 KRAS-Pyro-S1</b>	<b>TGTGGTAGTTGGAGCT</b>
<b>Primer</b>	<b>D366 KRAS-Pyro-S2</b>	<b>GCACTCTTGCCTACG</b>

Abbildung 10: Beispiel für Mastermix Pyrosequenzierung

### PCR-Produkte - Beads

26 Ansätze		
	1x	
<b>Beads</b>	<b>2</b>	<b>52</b>
<b>Bindungspuffer</b>	<b>40</b>	<b>1040</b>
<b>PCR</b>	<b>15</b>	
<b>Wasser</b>	<b>23</b>	<b>598</b>
<b>Summe</b>	<b>80</b>	<b>2080</b>

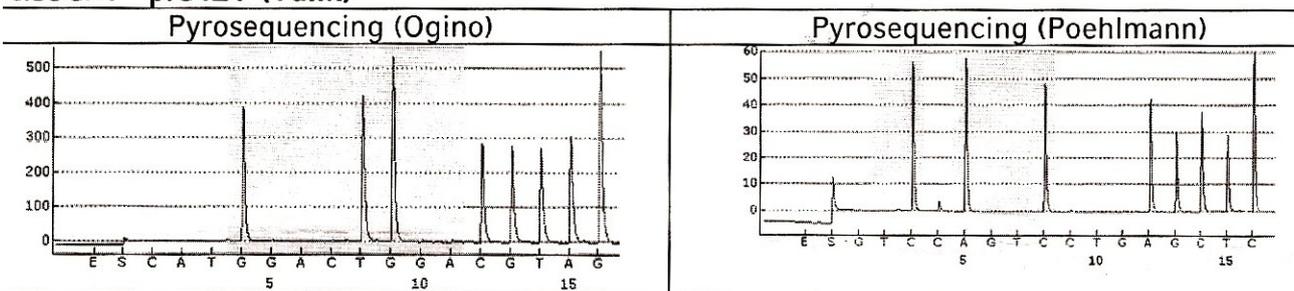
Nun konnte mit Hilfe des Pyrosequenzers (Pyromark Q24 Instrument, Biotage, Uppsala, Schweden) und eines Softwareprogrammes der Firma die Sequenz bestimmt werden. Hierzu wurde ein eigens hierfür vorgesehenes Gefäß (Cartridge) anhand eines Protokolls mit den verschiedenen dNTPS, einem Enzym und Substrat (Pyro Gold Reagents Pyro Mark 24, Qiagen, Hilden) befüllt (Abbildung 10). Diese wurden mitsamt des PCR/Primer-Mixes in den Pyrosequenzer gegeben.

Mit Hilfe des vorher programmierten Softwareprogrammes konnte nun das Pyrosequenzing ablaufen. Die nachfolgende Abbildung 11 zeigt ein ausgewähltes Beispiel einer Mutationsanalyse.

**Abbildung 11:** Pyrosequenzierungsergebnisse (Ogino/Poehlmann) für KRAS-Wildtyp (WT) und die häufigsten KRAS-Mutationen (Aspartat und Valin)

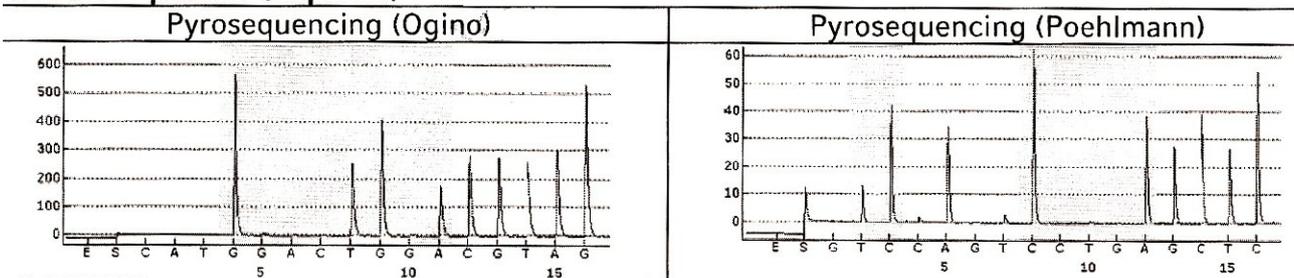
Mutation:

**c.35G>T - p.G12V (Valin)**

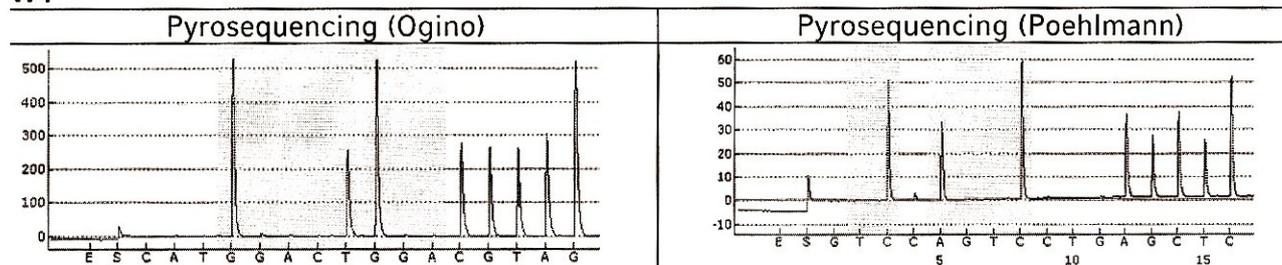


Mutation:

**c.38G>A - p.G13D (Aspartat)**



**WT**



## **2.3.2. FISH**

Für die EGFR FISH-Analyse wurde die SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe (Zytovision, Bremerhaven) Sonde verwendet.

### **2.3.2.1 Probenvorbereitung**

In diesem Schritt wurden die Entfernung des Paraffins und die teilweise Entfernung von Proteinen vorgenommen. Hierzu wurde Folgendes durchgeführt:

- 2 x 15 min in reinem Xylol inkubieren
- 2 x 10 min in reinem Ethanol waschen
- Präparate lufttrocknen lassen

Nun lagen die Gewebeproben frei und es konnte mit der weiteren Probenaufbereitung begonnen werden. Hierzu wurden 200 – 300 µl 1M warme Natriumisothiocyanat-Lösung auf das Präparat aufgebracht und mit einem Deckglas für 30 min in einem 80°C heißen Hybridisierungsofen inkubiert. Im Anschluss wurden die vorher aufgebrachten Deckgläser vorsichtig gelöst und die Probe mit Aqua bidest ab gespült.

### **2.3.2.2 Proteasen Behandlung**

Die Proteasenbehandlung diente dazu, die DNA-Zugänglichkeit zu verbessern und die Eigenfluoreszenz des Gewebes zu verringern. Hierzu wurde in folgenden Schritten die Protease aufgebracht. Zunächst wurden 200 µl Pepsin-Lösung (bestehend aus: 80 µl Pepsin Stock (100 mg/ml aliquotieren und bei -20°C wegfrieren) und 920 µl Aqua bidest (pH 2,0) auf die Probe aufgetragen und mit Hilfe eines Deckglases luftdicht abgeschlossen. Anschließend wurde die Probe für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Die überschüssige Pepsinlösung wurde anschließend mit Aqua bidest von den Proben ab gespült.

### 2.3.2.3 Denaturierung und Hybridisierung

In diesem Arbeitsschritt wurde zunächst die doppelsträngige DNA in 2 Einzelstränge denaturiert um diese anschließend mit der Sonde hybridisieren zu können. Dazu wurde in 2 Arbeitstagen nach einem Protokoll des Pathologischen Instituts der LMU München wie folgt vorgegangen:

#### Tag 1:

- Präparate auf der Heizplatte 20 min denaturieren
- Sonde luftblasenfrei auf den Schnitt aufbringen und mit einem Deckglas abdecken
- 10 min auf die 80°C heiße Heizplatte geben
- Deckglas mit Fixogum abdichten
- Objektträger über Nacht in die feuchte Kammer geben und bei 37°C inkubieren

#### Tag 2:

- Fixogum mit Deckglas von dem Präparat ablösen
- Objektträger 3 x 10 min in 42°C warmem 0,1 x SSC (1ml 20 x SSC (pH 5,3) auf 200 ml Aqua bidest) waschen
- Inkubation der Objektträger in 42°C warmem BT-Puffer für 5 min
- Objektträger kurz auf Zellstoff abtropfen lassen und mit 25 µl DAPI-Gegenfärbemittel eindecken

Die Präparate wurden bis zur Auszählung im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop, welches mit einem Rot-Grün-Filter ausgestattet war. Es wurden jeweils 100 Tumorzellen jeder Probe bei 100-facher Vergrößerung und im Anschluss in 630-facher Vergrößerung evaluiert. Hierbei entsprachen grüne Signale einem EGFR-Amplifikat und rote Signale der zugehörigen Zentromerregion des Chromosoms 7. Die EGFR-FISH Auswertung erfolgte nach Cappuzzo et al. (Cappuzzo et al., 2005). Wenn  $\geq 15$  Kopien in  $\geq 10\%$  der Tumorzellen, ein Gencluster vorlag oder die Ratio von Gen (grüne Signale) zu Zentromer (rote Signale) über 2 lag, konnte eine Amplifikation angenommen werden. Als EGFR FISH positiv galten eine Polysomie high ( $\geq 4$  Gensignale in über  $\geq 40\%$  der Zellkerne)

oder eine Amplifikation. EGFR FISH negativ hingegen sind eine normales EGFR/Zentromer Verhältnis, Trisomie low/high oder eine Polysomie low. Folgende Beispiele zeigen eine Polysomie high und eine Amplifikation (siehe Abbildung 12, 13).

Abbildung 12: EGFR FISH Polysomie low: ( $\geq 4$  Gensignale in über  $\geq 10\%$  der Zellkerne)

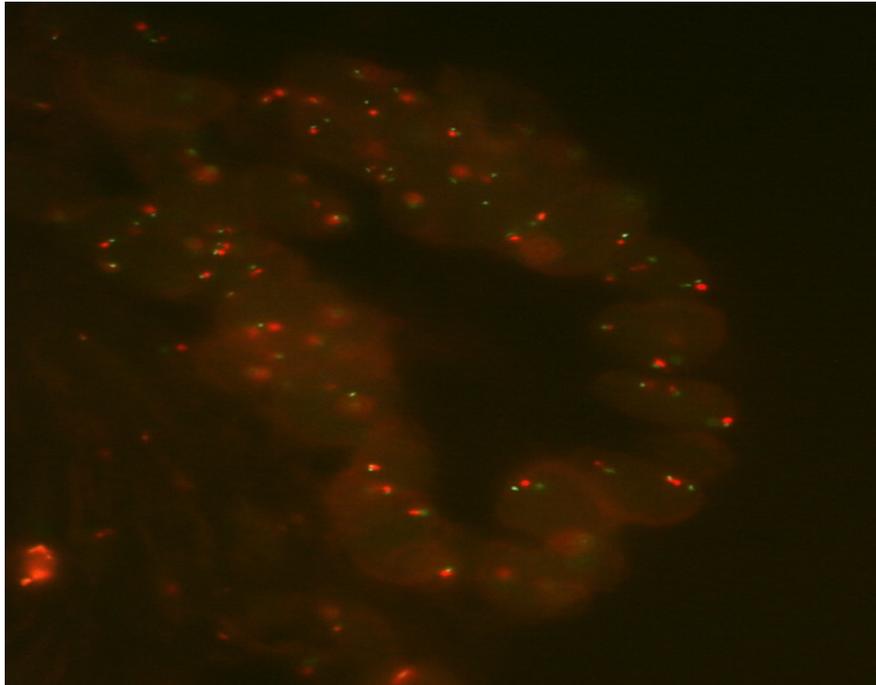


Abbildung 13: EGFR FISH Polysomie high: ( $\geq 4$  Gensignale in über  $\geq 40\%$  der Zellkerne)

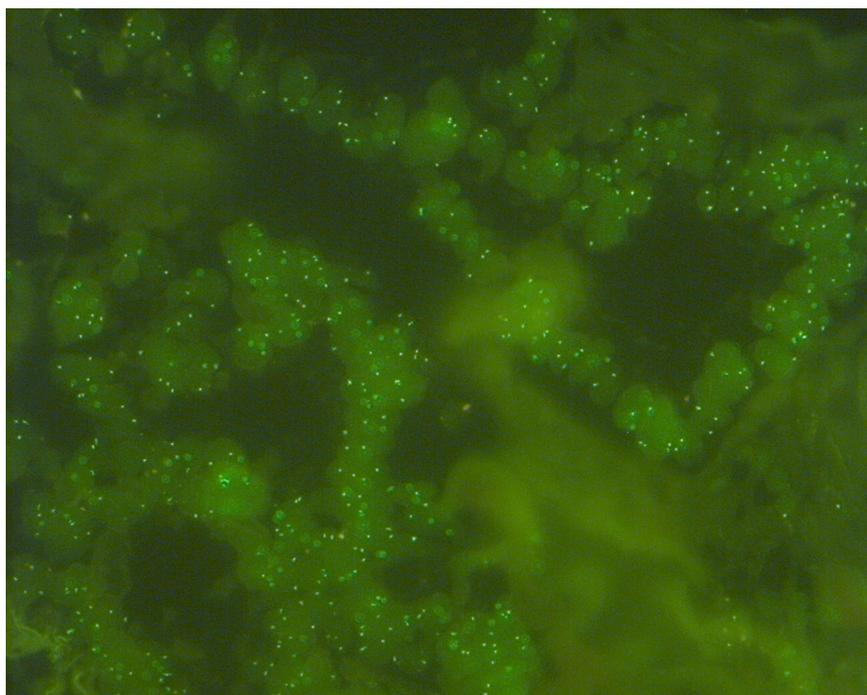
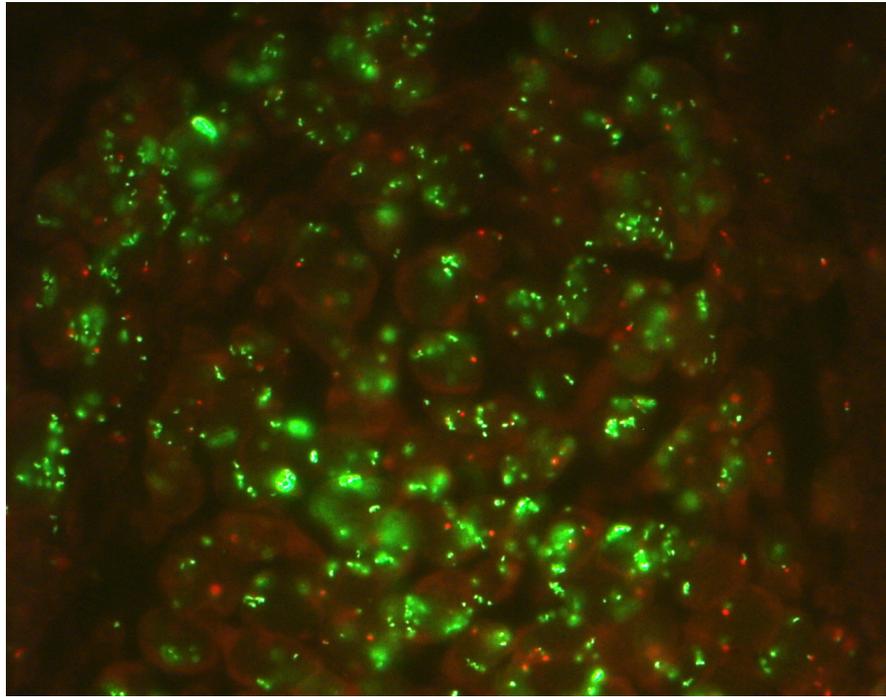


Abbildung 14: EGFR FISH Amplifikation ( $\geq 15$  Kopien in  $\geq 10\%$  der Zellkerne, Gencluster oder Ratio Gen/Zentromer  $\geq 2$ )



## 2.2.3 Immunhistochemie

### 2.2.3.1 Durchführung

Die Analyse der Immunhistochemie erfolgte nach einer Standardmethode im Labor des Pathologischen Instituts der LMU München. Hierzu wurde Mit Hilfe des Färbekits (UltraView Universal DAB Detection Kit/Ventana, Arizona), einer Protease (Nexes Protease I), Hämatoxylin (Nexes Hämatoxylin), einer Bluing Reagent (Nexes Bluing Reagent) und dem Antikörper (EGFR, Confirm/Ventana) formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeproben anhand eines empfohlenen Färbeprotokolls mit dem Bench Mark XT Series gefärbt.

Das Protokoll sah folgenden zeitlichen Ablauf vor: Protease (20 min), Antikörper (32 min), Hämatoxylin (4 min) und die Bluing Reagent (4 min) einwirken. Dieses Protokoll wurde anhand eines Barcodes gespeichert und auf den jeweiligen Objektträger aufgeklebt. Daraufhin wurde der Bench Mark XT Series (Ventana, Arizona) mit den Reagenzien bestückt und konnte anhand des Barcodes vollautomatisch das Protokoll bearbeiten. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe eines definierten Scores untersucht und eingestuft. Dabei wurde das Präparat anhand von unterschiedlichen Braunfärbungen in eine Score von 0-3 eingestuft. Dabei galten 0-1 als negativ bzw. low grade Expression und 2-3 als positiv bzw. high grade Expression (nach Uedo et al., 2004). Folgende Abbildungen geben jeweils ein Beispiel für die unterschiedlichen Expressions-Level des verwendeten Scores.

Abbildung 15: EGFR IHC Score 0 (keine Braunfärbung -> keine Expression)

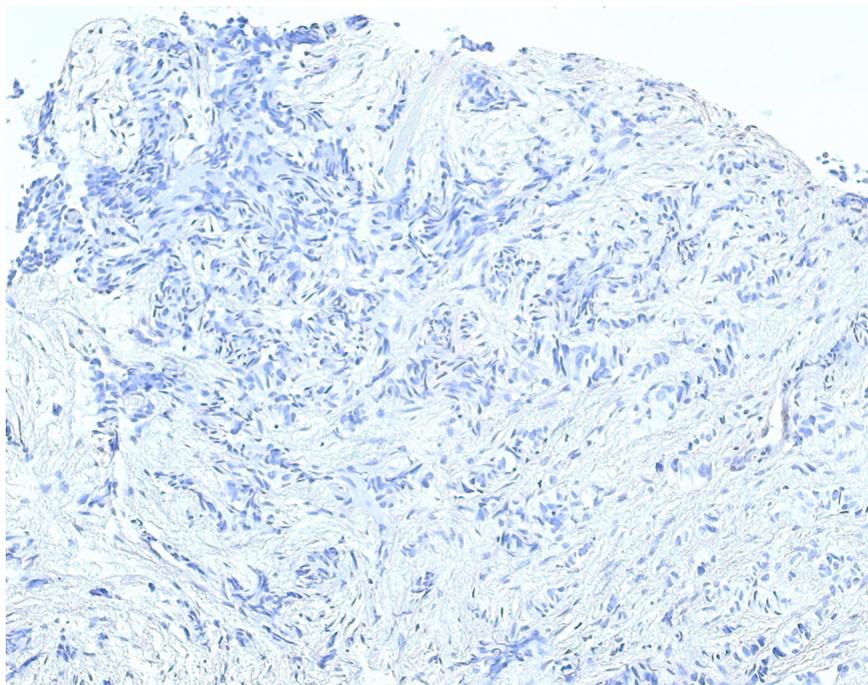


Abbildung 16: EGFR IHC Score 1 (schwache Braunfärbung -> schwache Expression)

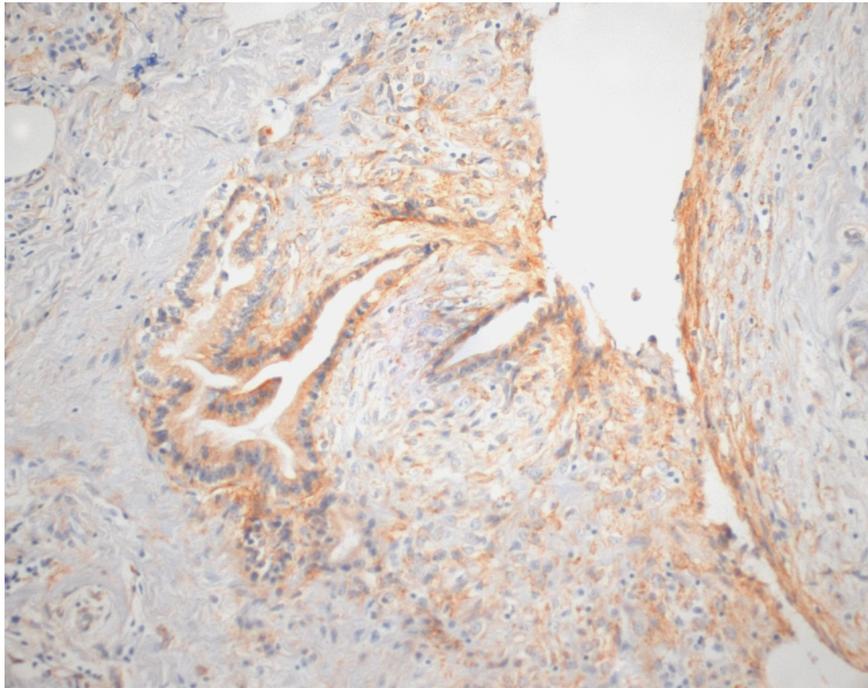


Abbildung 17: EGFR IHC Score 2 (mittlere Braunfärbung -> mittlere Expression)

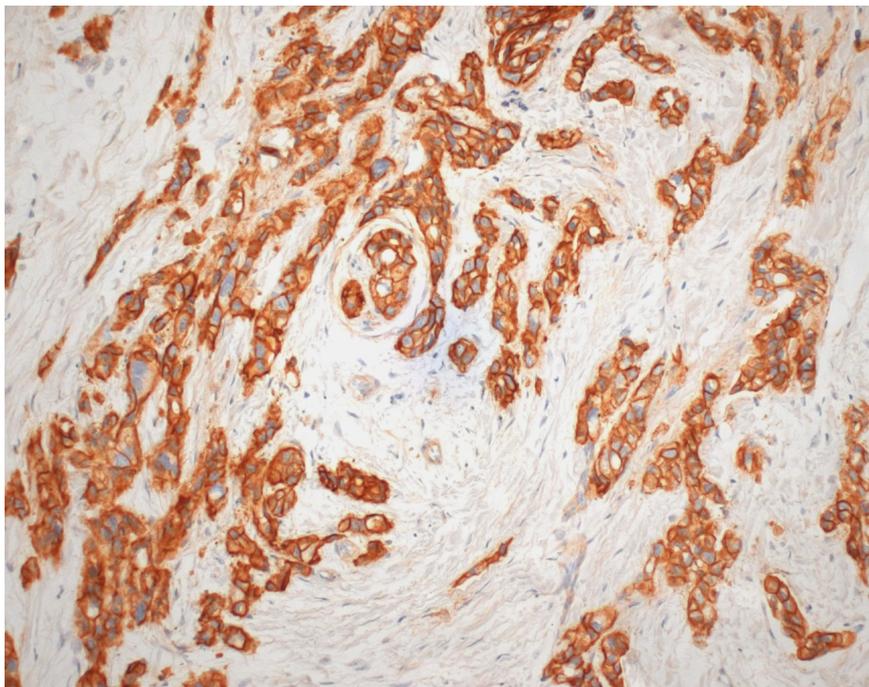
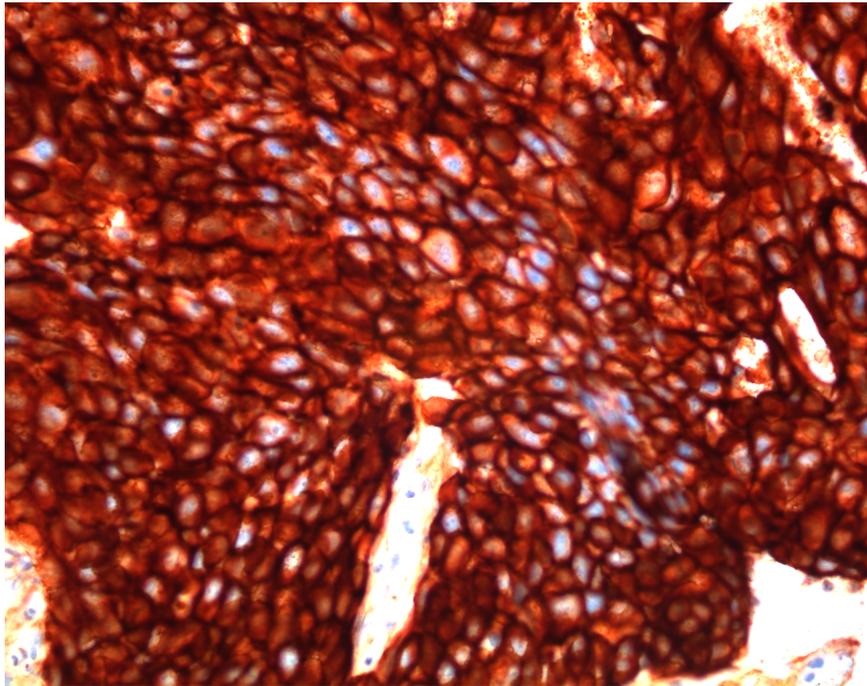


Abbildung 18: EGFR IHC Score 3 (starke Braunfärbung -> hohe Expression)



## 2.4. Datenauswertung

Die statistische Auswertung wurde vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig Maximilian Universität München übernommen. Hierbei wurden die translationalen Biomarker-Ergebnisse mit Effektivitätspunkten (Zeitpunkt des Therapieversagens und dem Gesamtüberleben) sowie Toxizitätspunkten (Hautausschlag) der Hauptstudie unter zur Hilfenahme von uni- und multivariaten Analysen korreliert. Die Biomarker-Daten wurden zum einen als dichotome (KRAS mutiert/nicht mutiert, EGFR FISH positiv/negativ und EGFR IHC positiv/negativ) und - wo möglich - auch als stetige Variablen (EGFR FISH Score 1-5 und EGFR IHC Score 0-3) analysiert. Mittels der Kaplan-Meier-Methode wurde die Zeit bis zum Therapieversagen (TTF) und das Gesamtüberleben dargestellt, Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden hierbei mit Hilfe des Log-rank Tests untersucht (wobei ein p-Wert von  $<0,05$  als statistisch signifikant angesehen wurde).

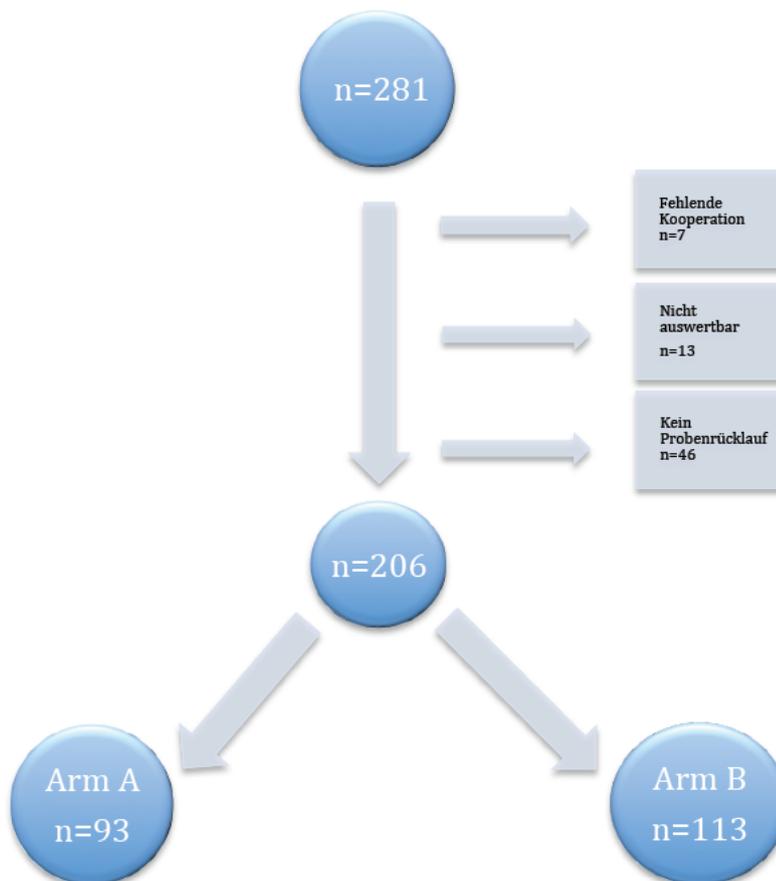
Ein multivariates Cox-Regressionsmodell wurde für eine Subgruppe der Patienten (n=121) entwickelt: in dieses Modell wurden nur Patienten mit einem vollständig Datensatz zum Behandlungsarm, Geschlecht, Alter, Tumorstadium, CA 19-9 Status, dem Karnofsky Performance Status, dem Zeitpunkt des Therapieversagens, dem Gesamtüberleben und allen untersuchten Biomarkern aufgenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Patienten

Im Zeitraum zwischen Mai 2006 und Dezember 2008 wurden insgesamt 281 Patienten mit einem fortgeschrittenen histologisch gesicherten Adenokarzinom des Pankreas aus insgesamt 46 Studienzentren in Deutschland in die AIO-PK0104 Studie rekrutiert. Letztendlich konnte an histologischem Probenmaterial von 206 Patienten eine Analyse der verschiedenen Biomarkern durchgeführt werden. Die niedrigere Fallzahl, bezogen auf die ursprünglich 281 Patienten, lässt sich durch gänzlich fehlende Proben, Diagnosesicherung durch alleinige Zytologie und fehlende Mitarbeit der Pathologischen Institute erklären (siehe Abbildung 18). Die verschiedenen Behandlungsarme (Studienarm A und B) und einzelnen Biomarker-Ergebnisse wurden mit unterschiedlichen klinischen Variablen korreliert.

Abbildung 19: Tumorprobenrekrutierung



In Studienarm B erhielten 113 Patienten Gemcitabin und Erlotinib gefolgt von Capecitabin und in Studienarm A 93 Patienten Capecitabin und Erlotinib gefolgt von Gemcitabin. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, waren mehr Männer in beiden Studienarmen (Studienarm B: n=64, 57%; Studienarm A: n=58, 62%) als Frauen (Studienarm B: Median 49, 43%; Studienarm A: Median 35, 38%). Das mediane Alter für beide Geschlechter bei Studieneinschluss betrug in Studienarm B 65 Jahre und in Studienarm A 64 Jahre (siehe Tabelle 1).

Desweiteren fällt auf, dass in beiden Studienarmen (Studienarm B: 85%; Studienarm A: 83%) mehr Patienten mit metastasiertem Stadium und deutlich weniger Patienten mit lokal fortgeschrittenen Karzinomen (Studienarm B: 15%; Studienarm A: 16%) eingeschlossen wurden. Der mediane prätherapeutische CA 19-9 Wert betrug im Studienarm B 1999 U/ml (Range 0.6–700000) und in Studienarm A 1565 U/ml (Range von 1–1000000). Der mediane Gewichtsverlust während der 3 Monate vor Randomisierung lag im Studienarm B bei 5 kg und in Studienarm A bei 7 kg (Vergleiche Tabelle 1).

Tabelle 1: Patientencharakteristika der translationalen Studienpopulation (n=206)

<u>Parameter</u>	<b>Studienarm B</b>		<b>Studienarm A</b>	
	<b><i>Gem + E =&gt; Cap</i></b>		<b><i>Cap + E =&gt; Gem</i></b>	
	No.	%	No.	%
<b>Alter (Jahre)</b>	n= 113		n= 93	
Median	65		64	
Range	32-75		42-75	
<b>Geschlecht</b>				
Männlich	64	57	58	62
Weiblich	49	43	35	38
<b>Krankheitsstadium</b>				
Lokal fortgeschritten	17	15	16	17
Metastasiert	96	85	77	83
<b>Karnofsky Performance Status</b>				
KPS 60-80%	37	33	38	41
KPS 90-100%	70	62	55	59
Nicht vorhanden	6	5	0	0
<b>Vorangegangene Operation</b>	7	6	13	14
<b>Gewichtsverlust während der 3 Monate vor Randomisierung (kg)</b>				
Median	5		7	
Range	0-47		0-45	
<b>CA 19-9 [U/ml]</b>				
Median	1999		1565	
Range	0.6-700000		1.0-1000000	

Abkürzungen: Gem= Gemcitabin; Cap=Capecitabin; E=Erlotinib

### 3.2. KRAS Mutationsstatus

Von den 206 Patienten, welche die „Intention-to-treat“ (ITT) Gruppe der translationalen Population bildeten, konnte bei 173 Patienten eine aussagefähige KRAS-Mutationsanalyse durchgeführt werden. Die restlichen Proben konnten aufgrund zu geringer DNA-Menge, nicht aussagefähiger Sequenzierungsergebnisse oder nicht vorhandenem Tumorgewebe keine Ergebnisse liefern. Beim Auswerten der Mutationsanalyse ergab sich bei 52 (30%) Patienten keine Mutation entsprechend einem KRAS Wildtyp (WT). Bei der Mehrheit der Patienten (n= 121) fand sich eine Mutation (M) im KRAS-Gen. Untersucht wurden hierbei die Codons 12 und 13; interessanterweise wurde jedoch keine Mutation auf Codon 13 detektiert. Die häufigste Mutation auf Codon 12 war, mit einer Anzahl von 81 (68%) Patienten von insgesamt 121 mutierten Patienten, die Mutation zu Aspartat (c.35G>A.p.G12D). Die zweithäufigste Mutation (n=26/121; 22%) war die Mutation zu Valin (c.35G>T.p.G12V). Tabelle 2 zeigt die verschiedenen Mutationen auf Codon 12 und deren Häufigkeit in den untersuchten Proben. Die beiden KRAS-Subgruppen (WT und M) wurden auf statistisch signifikante Unterschiede, bezogen auf ausgesuchte klinische Parameter, untersucht.

Tabelle 2: Häufigste Mutationen des Codons 12 auf dem KRAS-Gen

<b>Mutation</b>	<b><i>n</i></b>
<b>GAT</b> ; Aspartat (c.35G>A.p.G12D)	81
<b>GTT</b> ; Valin (c.35G>T.p.G12V)	26
<b>GCT</b> ; Alanin (c.35G>C.p.G12A)	1
<b>TGT</b> ; Cystein (c.34G>T.p.G12C)	1
<b>CGT</b> ; Arginin (c.34G>C.p.G12R)	12
<b>nicht auswertbar</b>	14

Abkürzungen: c.=cDNA; p.=Protein: Zahl hinter c.=Basenwechsel; Zahl hinter p.=Aminosäurewechsel

### **3.2.1 Korrelation zwischen KRAS-Mutationsstatus und ausgewählten Patientencharakteristika**

KRAS wurde in Korrelation mit ausgewählten klinischen Patientencharakteristika gesetzt. Bezüglich der untersuchten Parameter ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch waren einige Tendenzen zu erkennen: in der WT-Gruppe waren im Vergleich zur M-Gruppe weniger Patienten bereits im metastasierten Krankheitsstadium (WT-Gruppe: 79 %; M-Gruppe: 86 %) und mehr Patienten in einem lokal fortgeschrittenen Krankheitsstadium (WT-Gruppe: 21 %; M-Gruppe: 14 %). Außerdem fiel auf, dass sich mehr Patienten der WT-Gruppe einer vorangehenden Operation in kurativer Intention unterzogen hatten als Patienten der M-Gruppe (WT-Gruppe: 15 %; M-Gruppe: 8 %). Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Ausgewählte Patientencharakteristika und KRAS-Ergebnisse (dichotome Variablen) in der translationalen Studiengruppe (n=206)

<u>Parameter</u>	<b>KRAS</b> n=173		
	<u>Wildtyp</u> % (n=52)	<u>Mutation</u> % (n=121)	
<b>Alter (Jahre)</b>			
Median	65	64	p=0.96
<b>Geschlecht</b>			
Männlich	60	61	p=0.87
Weiblich	40	39	
<b>Krankheitsstadium</b>			
Lokal fortgeschritten	21	14	p=0.27
Metastasiert	79	86	
<b>Karnofsky Performance Status</b>			
KPS 60-80%	31	39	p=0.39
KPS 90-100%	69	61	
<b>Vorangegangene Operation</b>			
keine OP	85	93	p=0.16
OP	15	8	
<b>CA 19-9 [U/ml]</b>			
Median	1206	2000	p=0.03
Range	0.60-63130.00	1-1000000	
<b>Behandlungsarm</b>			
Gem + E => Cap	58	52	p=0.51
Cap + E => Gem	42	48	
<b>Raucherstatus</b>			
Nichtraucher; Exraucher	57	43	p=0.12
Raucher	43	57	

Abkürzungen: Gem= Gemcitabin; E= Erlotinib; Cap= Capecitabin

### 3.2.2 Korrelation zwischen dem KRAS-Mutationsstatus und den Effektivitäts-Endpunkten (Zeit bis zum Versagen der Erstlinientherapie (TTF1) und Zeit bis zum Versagen der Zweitlinientherapie (TTF2))

Bei den 173 bezüglich KRAS auswertbaren Patienten wurde die Zeit bis zum Versagen der Erst- (TTF1) sowie der Erst- und Zweitlinientherapie (TTF2) beobachtet und in Zusammenhang mit dem KRAS-Mutationsstatus gebracht. Sowohl für TTF1 als auch für TTF2 waren die Zeiten in der KRAS-WT Subgruppe gering verlängert, jedoch ohne statistisch signifikante Unterschiede (TTF1: WT=2.9 Monate, M=2.2 Monate; TTF2: WT=4.2 Monate, M=4 Monate) (siehe hierzu auch Tabelle 4).

Tabelle 4: Korrelation von KRAS mit TTF1 und TTF2

<b>KRAS (n=173)</b>		
	<b>Wildtyp</b>	<b>Mutiert</b>
<b>Median TTF1</b>	n=52	n=121
Monate	2.9	2.2
HR (95% CI)	1.23 (0.88-1.71)	
p	0.22	
<b>Median TTF2</b>		
Monate	4.2	4
HR (95% CI)	1.34 (0.96-1.87)	
p	0.09	

Abkürzungen: HR=Hazard ratio

### 3.2.3 Einfluss des KRAS-Status auf das Gesamtüberleben

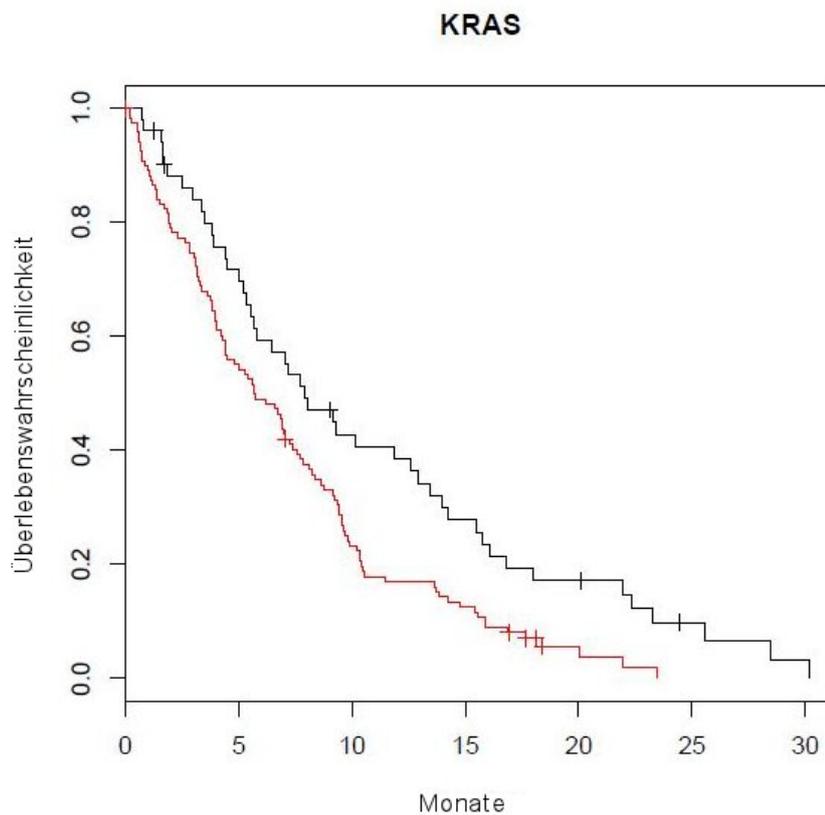
Die 173 untersuchten Patienten der beiden Gruppen Wildtyp (WT) und Mutiert (M) wurden hierbei auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben korreliert. Im Hinblick auf das Gesamtüberleben ergab sich ein signifikanter Vorteil der WT-Gruppe gegenüber der M-Gruppe (p=0.005). Die Probanden der WT-Gruppe lebten im Schnitt 7.9 Monate - also 2.2 Monate länger - als die Probanden der M-Gruppe (5.7 Monate) (vergleiche Tabelle 5). Dies zeigt den Überlebensvorteil der WT-Gruppe. Dieser Überlebensvorteil ist ebenfalls in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (siehe Abbildung 20).

Tabelle 5: Korrelation von KRAS (dichotome Variablen) mit dem Effektivitätsparameter OS

<u>Parameter</u>	<b>KRAS</b> (n=173)	
	<b>Wildtyp</b> n=52	<b>Mutation</b> n=121
<b>Gesamtüberleben</b> Monate	7.9	5.7
HR (95% CI)	1.68 (1.17-2.41)	
p	0.005	

Abkürzungen: HR=Hazard ratio

Abbildung 20: Korrelation zwischen KRAS-Mutationsstatus und Gesamtüberleben (n=173, 157 Ereignisse)



Legende: Rote Linie: KRAS Mutiert; Schwarze Linie: KRAS Wildtyp

### 3.3. EGFR FISH

Von den insgesamt 206 ITT-Patienten der translationalen Patientenpopulation konnte bei 166 eine auswertbare Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) des EGFR-Gens durchgeführt werden um eine mögliche Überexpression festzustellen. Bei den übrigen 40 Patienten konnten aufgrund von zu geringer Sondaufnahme, zu schlechter Auswertbarkeit unter dem Fluoreszenzmikroskop oder dem Vorliegen von nicht genügend Tumorgewebe keine Ergebnisse erzielt werden. Die Ergebnisse wurden in FISH-positiv und FISH-negativ eingeteilt. Hierbei waren FISH-positiv die Patienten, die in der Auswertung eine Polysomie high ( $\geq 40\%$  der Zellkerne haben  $\geq 4$  Gensignale) oder eine Amplifikation ( $\geq 15$  Kopien in  $\geq 10\%$  der Zellkerne, Gencluster oder Ratio Gen/Zentromer  $\geq 2$ ) aufwiesen. Unter FISH-negativ wurden die Patienten zusammengefasst, die eine Trisomie low/high oder eine Polysomie low ( $<10\%$  der Zellkerne haben  $\geq 4$  Gensignale) aufwiesen. Von den 166 Patienten konnten 89 zur FISH-negativen Gruppe und 77 zur FISH-positiven Gruppe gerechnet werden.

Die positiven und negativen Ergebnisse wurden des weiteren in verschiedene Untergruppen (Score 1-6) unterteilt. Bei der Großzahl der Patienten lag eine Polysomie high vor (n=74). Tabelle 6 zeigt die verschiedenen Scores der EGFR FISH-Ergebnisse und ihre Häufigkeit. Die beiden Gruppen, EGFR FISH-positiv- und negativ, wurden mit ausgewählten klinischen Parametern korreliert und auf statistisch signifikante Zusammenhänge hin untersucht.

Tabelle 6: Häufigkeit der verschiedenen EGFR FISH Scores

<b><u>EGFR-FISH</u></b>	
<b><u>Score</u></b>	<b>n</b>
insgesamt	166
Amplifikation	3
Polysomie high	74
Polysomie low	62
Trisomie high	23
Trisomie low	4

Abkürzungen: FISH= Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung

### **3.3.1 EGFR FISH (positiv/negativ) in Korrelation mit ausgewählten Patientencharakteristika**

Sowohl in der FISH-negativ Gruppe als auch in der FISH-positiv Gruppe ergaben sich keine statistisch signifikanten Korrelationen. In der FISH-negativ Gruppe waren mehr Patienten in einem metastasiertem Krankheitsstadium (85%). Außerdem fiel auf, dass es mehr Raucher als Nichtraucher gibt (FISH-negativ Gruppe: 55%; FISH-positiv Gruppe: 53%). Auch lag das mediane prätherapeutische CA 19-9 Level in der FISH-positiv Gruppe mit 1878 U/ml etwas höher als in der FISH-negativ Gruppe (1257 U/ml). Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Ausgewählte Patientencharakteristika und EGFR FISH-Ergebnisse (dichotome Variablen) in der translationalen Studiengruppe (n=206)

<u>Parameter</u>	<u>EGFR-FISH</u> n=166		
	<u>Negativ</u> % (n=89)	<u>Positiv</u> % (n=77)	
<b>Alter (Jahre)</b>			
Median	65	63	p=0.34
<b>Geschlecht</b>			
Männlich	61	60	p=1.00
Weiblich	39	40	
<b>Krankheitsstadium</b>			
Lokal fortgeschritten	15	19	p=0.42
Metastasiert	85	81	
<b>Karnofsky Performance Status</b>			
KPS 60-80%	42	31	p=0.19
KPS 90-100%	58	69	
<b>Vorangegangene Operation</b>			
keine OP	91	89	p=0.80
OP	9	11	
<b>CA 19-9 [U/ml]</b>			
Median	1257	1878	p=0.73
Range	0.6-700000	2.0-1000000	
<b>Behandlungsarm</b>			
Gem + E => Cap	53	56	p=0.76
Cap + E => Gem	47	44	
<b>Raucherstatus</b>			
Nichtraucher; Exraucher	45	47	p=0.87
Raucher	55	53	

Abkürzungen: IHC=Immunhistochemie; FISH=Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung;  
KPS=Karnofsky Performance Status; Gem=Gemcitabin; E=Erlotinib;  
Cap=Capecitabin

### 3.3.2 EGFR FISH (positiv/negativ) in Korrelation mit den Effektivitäts-Endpunkten Zeit bis zum Versagen der Erstlinientherapie (TTF1), der Zeit zum Versagen der Zweitlinientherapie (TTF2) und Gesamtüberleben (OS))

Bei den insgesamt 166 Patienten, bei denen eine FISH-Untersuchung durchgeführt werden konnte, wurde die Zeit zum Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie (TTF1/TTF2) mit dem jeweiligen FISH-Status korreliert. Es ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede erheben: die TTF2 war in beiden molekularen Subgruppen sogar identisch (FISH-positiv Gruppe: 4.1 Monate; FISH- negativ Gruppe: 4.1 Monate).

Beim Gesamtüberleben zeigte sich in der FISH-negativen Gruppe nur ein geringer Überlebensvorteil gegenüber der FISH-positiven Gruppe (OS: FISH-positiv Gruppe: 6.7 Monate; FISH-negativ Gruppe: 6.9 Monate) (siehe Tabelle 8)

Tabelle 8: Korrelation von EGFR FISH (dichotome Variablen) mit den Effektivitätsparametern TTF1, TTF2 und OS

	<b><u>EGFR FISH</u></b> (n=166)	
	<b><u>Negativ</u></b>	<b><u>Positiv</u></b>
<b>Median TTF1</b> Monate	n=89 2.5	n=77 2.8
HR (95% CI)	0.90 (0.66-1.23)	
P	0.50	
<b>Median TTF2</b> Monate	4.1	4.1
HR (95% CI)	1.03 (0.75-1.42)	
P	0.84	
<b>Gesamtüberleben</b> Monate	6.9	6.7
HR (95% CI)	1.22 (0.87-1.70)	
P	0.25	

Abkürzungen: HR=Hazard ratio

### 3.3.3 Korrelation zwischen dem EGFR FISH-Score (1-6) mit TTF1, TTF2 und OS

Die einzelnen EGFR FISH-Score Ergebnisse wurden auch als kontinuierliche Variable mit den Effektivitätsparametern Zeit bis zum Versagen der Erstlinientherapie (TTF1), Zeit bis zum Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie (TTF2) und dem Gesamtüberleben (OS) korreliert und auf statistische Unterschiede hin untersucht. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den einzelnen Scores und den Effektivitätsparametern. In Tabelle 9 sind die einzelnen Daten übersichtlich zusammengefasst.

Tabelle 9: Korrelation von EGFR FISH (stetige Variable) mit den Effektivitätsparametern TTF1, TTF2 und OS

Biomarker	TTF1		TTF2		OS	
	HR	(95% CI) p	HR	(95% CI) p	HR	(95% CI) p
<b>EGFR-FISH Score</b> (n=166)						
Trisomie low (n=4)	1		1		1	
Trisomie high (n=23)	0.77	(0.27-2.25)	1.07	(0.37-3.16)	2.36	(0.66-8.36)
Polysomie low (n=62)	0.81	(0.29-2.24)	1.59	(0.57-4.42)	3.01	(0.89-10.14)
Polysomie high (n=74)	0.72	(0.26-1.98)	1.43	(0.52-3.97)	3.28	(0.96-11.19)
Amplifikation (n=3)	0.92	(0.17-5.07) 0.94	1.43	(0.26-7.87) 0.59	2.72	(0.27-27.26) 0.28

Abkürzungen: HR=Hazard ratio

### 3.4. EGFR IHC

Von 181 der 206 untersuchten Patienten konnte eine immunhistochemische Untersuchung der EGFR Rezeptor-Proteinexpression durchgeführt werden (EGFR-IHC). Bei den fehlenden 25 Patienten konnte aufgrund von nicht ausreichendem Tumorgewebe oder nicht auswertbarer Färbung keine EGFR-IHC-Untersuchung vorgenommen werden. Anhand des entwickelten Scores wurden die Patienten in 2 Gruppen eingeteilt: in die IHC-negative Gruppe wurden die Patienten mit dem Score von 0-1 zusammengefasst. Diese Gruppe bestand aus 92 Patienten. Als IHC positiv galten alle Patienten mit einem Score von 2-3. Diese Gruppe setzte sich aus 89 Patienten zusammen.

Wie auch bei den EGFR FISH-Ergebnissen wurde hier eine Auswertung der einzelnen Score-Stufen vorgenommen. Die Großteil der Patienten wies einen Score von 1 auf (n=85/181). In

Tabelle 10 sind die einzelnen Ergebnisse der unterschiedlichen Score-Stufen zusammengefasst. Diese Daten wurden wie bei den anderen Biomarkern mit ausgewählten klinischen Faktoren auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang untersucht.

Tabelle 10: Häufigkeit der verschiedenen EGFR IHC-Scores

<u>Score</u>	n
<b><u>EGFR-IHC</u></b> <b><u>Score</u></b>	
0	7
1	85
2	48
3	41

Abkürzungen: IHC=Immunhistochemie

### 3.4.1 EGFR IHC-positiv/ negativ korreliert mit ausgewählte Patientencharakteristika

Die insgesamt 181 EGFR-IHC auswertbaren Patienten wurden mit ausgewählten klinischen Parametern korreliert und auf statistisch signifikante Zusammenhänge untersucht. Hierbei ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied bei den unterschiedlichen Behandlungsarmen.

Bei den übrigen Daten konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang beobachtet werden. Es ließ sich erkennen, dass in der IHC-negativen Gruppe mehr Patienten Nichtraucher oder Ex-Raucher waren (56%), wohingegen in der IHC-positiven Gruppe mehr Patienten einen Raucherstatus aufwiesen (59%). Des weiteren wies die IHC-positive Gruppe einen gering höheren medianen CA 19-9 Wert auf (1878 U/ml). Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Ausgewählte Patientencharakteristika und EGFR IHC-Ergebnisse (dichotome Variablen) in der translationalen Studiengruppe (n=206)

<b>Parameter</b>	<b>EGFR-IHC</b> (n=181)		
	<b>Negativ</b> % (n= 92)	<b>Positiv</b> % (n= 89)	
<b>Alter (Jahre)</b>			n= 89
Median	65	63	p=0.97
<b>Geschlecht</b>			
Männlich	62	56	p=0.45
Weiblich	38	44	
<b>Krankheitsstadium</b>			
Lokal fortgeschritten	21	79	p=0.24
Metastasiert	13	87	
<b>Karnofsky Performance Status</b>			
KPS 60-80%	40	60	p=0.54
KPS 90-100%	35	65	
<b>Vorangegangene Operation</b>			
keine OP	86	14	p=0.04
OP	95	5	
<b>CA 19-9 [U/ml]</b>			
Median	1475	1878	p=0.97
Range	1-240000	0.6-1000000	
<b>Behandlungsarm</b>			
Gem + E => Cap	43	64	<u>p=0.007</u>
Cap + E => Gem	57	36	
<b>Raucherstatus</b>			
Nichtraucher; Exraucher	56	44	p=0.05
Raucher	41	59	

Abkürzungen: IHC=Immunhistochemie; KPS=Karnofsky Performance Status;  
Gem=Gemcitabin; E=Erlotinib; Cap=Capecitabin

### 3.4.2 EGFR IHC-positiv/negativ korreliert mit den Effektivitätspunkten (Zeit bis zum Versagen der Erstlinientherapie (TTF1), der Zeit zum Versagen der Zweitlinientherapie (TTF2) und dem Gesamtüberleben (OS))

Das 181 große Patientenkollektiv wurde mit den Effektivitätsparametern Zeit bis zum Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie und dem Gesamtüberleben korreliert. Hierbei ließ sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang feststellen. Tendenziell jedoch war die TTF1 bei Patienten der IHC-positiven Gruppe länger als bei den IHC-negativen Patienten (3.06 Monate vs. 2.2 Monate); beim Gesamtüberleben zeigte sich kein Unterschied. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Korrelation von EGFR IHC (dichotome Variablen) mit den Effektivitätsparametern TTF1, TTF2 und OS

	<b>EGFR IHC (n=181)</b>	
	<b><u>Negativ</u></b>	<b><u>Positiv</u></b>
<b>Median TTF1</b>	n=92	n=89
Monate	2.2	3.06
HR (95% CI)	0.76 (0.66-1.02)	
p	0.07	
<b>Median TTF2</b>		
Monate	3.91	4.11
HR (95% CI)	0.81 (0.60-1.10)	
p	0.2	
<b>Gesamtüberleben</b>		
Monate	6.7	6.9
HR (95% CI)	0.96 (0.70-1.31)	
p	0,8	

Abkürzungen: HR=Hazard ratio

### 3.4.3 Zusammenhang zwischen dem EGFR IHC-Score mit TTF1, TTF2 und OS

Die einzelnen Score-Stufen der EGFR IHC wurden (als kontinuierliche Variable) mit den Effektivitätspunkten der Hauptstudie Zeit bis zum Versagen der Erstlinientherapie (TTF1), Zeit bis zum Versagen der Zweitlinientherapie (TTF2) und Gesamtüberleben (OS) korreliert. Dabei konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Eine Übersicht über die Daten zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13: Korrelation von EGFR IHC (stetige Variable) mit den Effektivitätsparametern TTF1, TTF2 und OS

<b>Biomarker</b>	<b>TTF1</b>		<b>TTF2</b>		<b>OS</b>	
	HR	(95% CI)	p	HR	(95% CI)	p
<b>EGFR-IHC Score</b>						
0 (n=7)	1			1		
1 (n=85)	0.91	(0.42-1.97)		0.92	(0.43-2.00)	
2 (n=48)	0.63	(0.28-1.40)		0.70	(0.31-1.55)	
3 (n=41)	0.79	(0.35-1.78)	0.22	0.85	(0.38-1.92)	0.48
						0.46

Abkürzungen: HR=Hazard ratio

### 3.5. Korrelation zwischen EGFR FISH und EGFR IHC

Bei der Korrelation der EGFR FISH-Ergebnisse mit denen aus der IHC-Untersuchung ergaben sich keine signifikanten Korrelationen. Die häufigsten Ereignisse gab es bei EGFR FISH Polysomie low und EGFR IHC Score 1 (n=31), gefolgt von EGFR Polysomie high und EGFR IHC Score 1 (n=27). Die restlichen Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Korrelation zwischen EGFR FISH und IHC

<b>EGFR IHC Score</b>	0	1	2	3
<b><u>EGFR-FISH Score</u></b>				
Trisomie low	0	3	1	0
Trisomie high	0	12	7	4
Polysomie low	1	31	20	9
Polysomie high	4	27	18	23
Amplifikation	0	1	0	2
p-Wert: 0.97				

### 3.6. Korrelation zwischen den Biomarkern und dem Auftreten von Hautausschlag ( Grad I-IV)

Bei der Korrelation der einzelnen Biomarker mit dem Auftreten eines Hautausschlages (Grad I-IV) als wichtiger Toxizitätsendpunkt aus der Hauptstudie, ergab sich für keinen der Biomarker ein statistisch signifikanter Zusammenhang. Die einzelnen Odds Ratios sind in Tabelle 15 abgebildet.

Tabelle 15: Korrelation zwischen den einzelnen Biomarkern mit dem Auftreten von Hautausschlag (Grad I-IV)

<u>Biomarker</u>	<u>Dichotome Variable</u>		<u>Stetige Variable</u>	
	OR	p	OR	p
<b><u>KRAS</u></b> (n=163)	0.96	0.59		
<b><u>EGFR-IHC</u></b> (n=170)	1.09	0.22		
0			1	
1			0.96	0.81
2			1.10	0.63
3			0.98	0.89
<b><u>EGFR-FISH</u></b> (n=155)	1.03	0.73		
Trisomie low			1	
Trisomie high			1.42	0.24
Polysomie low			1.40	0.24
Polysomie high			1.43	0.21
Amplifikation			1.19	0.70

Abkürzungen: IHC=Immunhistochemie; FISH=Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung;  
OR=Odds Ratio

### 3.7. Multivariate Analysen abgeschlossener Fälle

Für Patienten, bei denen ein vollständiger Datensatz sowohl zu den klinischen Variablen als auch zu den translationalen Biomarker-Variablen vorlag, konnten uni- und multivariate Analysen mit Hilfe eines Cox-Regressions-Modells erstellt werden. Hierbei konnten insgesamt jedoch nur 121 Fälle untersucht werden. Es fanden sich statistisch hochsignifikante Ergebnisse in den multivariaten Analysen beim Gesamtüberleben (OS) und bei der Zeit bis zum Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie (TTF2): dabei handelte es sich um die Variablen EGFR-FISH-Status ( $p=0.00005$ ), das prätherapeutische CA 19-9 Level ( $p=0.00005$ ) und den Karnofsky Performance Status ( $p=0.00002$ ). Die detaillierten Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen 16-18 veranschaulicht.

Tabelle 16: Uni- und Multivariate Cox-Regressionsmodelle für das Gesamtüberleben (OS):  
n=121, 110 Ereignisse

<u>Parameter</u>	<u>Univariat</u>		<u>Multivariat</u>	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
<b><u>KRAS</u></b>	1.82 (1.17-2.84)	<u>0.007</u>		
<b><u>EGFR IHC</u></b>	0.99 (0.68-1.45)	0.97		
<b><u>EGFR-FISH</u></b>	1.80 (1.21-2.69)	<u>0.004</u>	2.39 (1.57-3.65)	<u>0.00005</u>
<b><u>Geschlecht</u></b>	1.01 (0.69-1.49)	0.96		
<b><u>Log [CA 19-9]</u></b>	1.18 (1.10-1.26)	<u>0.000004</u>	1.17 (1.08-1.26)	<u>0.00005</u>
<b><u>Alter</u></b>	0.99 (0.97-1.01)	0.52		
<b><u>KPS</u></b>	0.39 (0.26-0.59)	<u>0.000003</u>	0.39 (0.26-0.60)	<u>0.00002</u>
<b><u>Krankheitsstadium</u></b>	1.71 (1.04-2.82)	0.03	1.47 (0.88-2.43)	0.14
<b><u>Behandlungsarm</u></b>	1.16 (0.79-1.70)	0.45	1.23 (0.84-1.80)	0.30

Abkürzungen: HR=Hazard ratio; KPS=Karnofsky Performance Status

Tabelle 17: Uni- und Multivariate Cox-Regressionsmodelle für die Zeit bis zum Versagen der  
Erstlinientherapie (TTF1): n=121, 110 Ereignisse

<u>Parameter</u>	<u>Univariat</u>		<u>Multivariat</u>	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
<b><u>Log [CA 19-9]</u></b>	1.16 (1.08-1.25)	<u>0.00006</u>	1.08 (1.01-1.15)	0.03
<b><u>KPS</u></b>	0.45 (0.29-0.68)	<u>0.0002</u>	0.62 (0.41-0.93)	0.02
<b><u>Krankheitsstadium</u></b>			1.62 (0.98-2.68)	0.06
<b><u>Behandlungsarm</u></b>			0.73 (0.50-1.05)	0.09

Abkürzungen: HR=Hazard ratio; KPS=Karnofsky Performance Status

Tabelle 18: Uni- und Multivariate Cox-Regressionsmodelle für die Zeit bis zum Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie (TTF2): n=121, 110 Ereignisse

<u>Parameter</u>	<u>Univariat</u>		<u>Multivariat</u>	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
<b><u>KRAS</u></b>	1.53 (1.02-2.28)	0.04		
<b><u>EGFR IHC</u></b>	0.82 (0.57-1.19)	0.31		
<b><u>EGFR-FISH</u></b>	1.54 (1.06-2.24)	0.02	1.95 (1.30-2.91)	<u>0.001</u>
<b><u>Geschlecht</u></b>	1.13 (0.78-1.63)	0.53		
<b><u>Log [CA 19-9]</u></b>	1.18 (1.10-1.26)	<u>0.000003</u>	1.16 (1.08-1.25)	<u>0.00006</u>
<b><u>Alter</u></b>	0.99 (0.97-1.01)	0.35		
<b><u>KPS</u></b>	0.45 (0.30-0.66)	<u>0.00005</u>	0.45 (0.29-0.68)	<u>0.0002</u>
<b><u>Krankheitsstadium</u></b>	1.67 (1.03-2.69)	0.03	1.61 (0.99-2.63)	0.06
<b><u>Behandlungsarm</u></b>	1.16 (0.81-1.68)	0.42	1.19 (0.82-1.72)	0.37

Abkürzungen: HR=Hazard ratio; KPS=Karnofsky Performance Status

## **4. Diskussion**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mutationshäufigkeit von KRAS und die Expression von EGFR zu analysieren und ihre Rolle als potentielle Biomarker bei Erlotinib-behandelten Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom zu untersuchen. Grundlage für diese translationale Untersuchung bildeten die Patientendaten einer großen randomisierten, multizentrischen Therapieoptimierungsstudie der „Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie“ (AIO) der Deutschen Krebsgesellschaft. Insgesamt konnten für die vorliegenden Analysen Gewebeproben von 206 der 281 Studienpatienten, die entweder mit Gemcitabin/Erlotinib gefolgt von Capecitabin oder mit Capecitabin/Erlotinib gefolgt von Gemcitabin behandelt wurden, gewonnen werden. Es wurden Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder bereits metastasiertem Pankreaskarzinom eingeschlossen. Die erhobenen Biomarker Daten wurden mit verschiedenen, ausgewählten, klinischen Parametern korreliert. Die vorliegende Arbeit entstand dabei in enger Kooperation mit dem Pathologischen Institut der Universität München. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem KRAS-Wildtyp-Status einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit einer KRAS-Mutation haben (Tabelle 5). In den multivariaten Analysen für das Gesamtüberleben fanden sich jedoch nur die beiden klinischen Parameter CA 19-9 und Karnofsky Performance Status als unabhängige prognostische Variablen (siehe Tabelle 17).

### **4.1. Diskussion der Methodik**

#### **4.1.1 KRAS**

Die von uns gewählten Methoden wurden vor ihrem Einsatz in der Studie umfangreich auf ihre Verwendbarkeit getestet. Es wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Methoden sich am aktuellen Stand der Forschung orientieren um die Vergleichbarkeit der einzelnen Methoden zu ermöglichen. Gleichzeitig musste hierzu eine Auswahl zwischen der Fülle an verschiedenen Rezeptoren im Signaltransduktionsweg vorgenommen werden. Verschiedene Studien haben in den letzten Jahren zu einem besseren Verständnis der Rolle des KRAS-Gens in der spezifischen Therapie mit EGFR-Inhibitoren geführt. In anderen Tumorentitäten, wie z.B. dem Kolonkarzinom, hat sich die Untersuchung des KRAS-Mutationsstatus mittlerweile zu einer klinischen Routineuntersuchung in der Onkologie etabliert (*Allegra et al., 2009*). Durch den

neuen Einsatz von EGFR-Inhibitoren beim Pankreaskarzinom spricht vieles für eine Untersuchung des KRAS-Mutationsstatus als prognostischen und prädiktiven Biomarker.

Unter Zuhilfenahme der PCR-Technik und der Pyrosequenzierung konnte von insgesamt 173 Patienten eine Mutationsanalyse des KRAS-Gens angefertigt werden. Die PCR-Methode dient der DNA-Vervielfältigung. In der anschließenden Pyrosequenzierung kann das interessierende Gen auf mögliche Mutationen hin analysiert werden. Um Mutationen im KRAS-Gen ausfindig zu machen, gibt es eine Reihe von verschiedenen Techniken. Es stehen die Didesoxymethode nach Sanger, das Pyrosequenzing (*Poehlmann et al., 2007*) und Allel-spezifische PCRs (z.B. ARMS-PCR) zur Verfügung.

Die Pyrosequenzierung stellt eine einfache, gut reproduzierbare, schnelle und sensitive Methode der Mutationsanalyse des KRAS-Gens dar (*Ogino et al., 2005*). Aufgrund dieser positiven Eigenschaften hat sich die Methode der Pyrosequenzierung in den letzten Jahren in der Mutationsanalyse des KRAS-Gens stark verbreitet. Sundstorm et al. untersuchte in einer Studie Kolonkarzinom-Proben und konnten sogar bei nur sehr gering vorhandenem Tumormaterial eine Mutationsanalyse durchführen (*Sundstorm et al., 2010*). Ebenfalls in den Allel-spezifischen PCRs kann aus nur weniger als 2% Tumormaterials eine Mutationsanalyse erstellt werden. Im Vergleich dazu wird bei der Sanger-Methode deutlich mehr Tumormaterial benötigt um einen Analyse durchzuführen. Desweiteren ist die Methode der Pyrosequenzierung im Vergleich zur Sanger-Methode eine viel sensitivere Analysetechnik und es gelingt ebenfalls kleine Mutationen zu detektieren (*Ibrahim et al., 2010*).

#### **4.1.2 EGFR FISH**

Mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) können durch das Aufbringen einer speziellen Sonde mögliche Amplifikationen des interessierenden Gens ausfindig gemacht werden und die Anzahl der Genkopien bestimmt werden. Die FISH-Methode zählt ebenfalls zu den etablierten Methoden in der Analyse des EGFR-Gens. In einer großen Studie wurde der EGFR FISH-Status als möglicher prognostischer und prädiktiver Marker in der Therapie mit Erlotinib beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) beschrieben (*Zhu et al., 2008*). Aus diesem Anlass und weiteren Hinweisen auf die Aussagefähigkeit des EGFR FISH-Status als prognostischen und prädiktiven Marker beim NSCLC wird die FISH-Analyse dort bereits häufiger in wissenschaftlichen Untersuchungen verwendet (*Cappuzzo et al., 2005*).

Beim Kolonkarzinom haben sich ebenfalls Hinweise ergeben, welche für den Einsatz der EGFR FISH-Analyse als prädiktiven oder prognostischen Faktor in der EGFR-Inhibitor-Therapie sprechen (*Moroni et al., 2005; Cappuzzo et al., 2008*). Moroni et al. analysierten die

EGFR-Genkopiezahl und konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen hoher Genkopiezahl und dem Ansprechen auf Cetuximab finden (*Moroni et al., 2005*).

Beim Pankreaskarzinom wurde die Rolle der EGFR-Genkopiezahl bisher an kleineren Fallserien untersucht. Santos et al. untersuchten bei 107 Patienten den EGFR-FISH Status und konnten bei 50 Patienten (46.7%) einen FISH-positiven Befund erheben, jedoch fanden sie keinen statistisch signifikanten Ansatzpunkt, um den EGFR FISH-Status als prädiktiven Marker in der Therapie des Pankreaskarzinoms zu nutzen (*Da Cunha Santos et al., 2010*). Die gute Datenlage beim NSCLC und beim Kolonkarzinom zur Aussagekraft der FISH-Untersuchung des EGFR-Rezeptors sprechen für eine Untersuchung beim Pankreaskarzinom.

#### **4.1.3 EGFR IHC**

Der EGFR-Rezeptor (erbB1) ist der Hauptangriffspunkt der spezifischen EGFR-Rezeptorblocker Therapie. Dies legt die Vermutung nahe, dass das EGFR-Expressionslevel eine wichtige Rolle im Therapieansprechen spielen könnte.

In unserer Studie wurde das Proteinexpressionslevel von EGFR mittels einer standardisierten IHC-Analyse untersucht. Aufgrund der bisher unzureichenden Datenlage zu immunhistochemischen Untersuchungen der EGFR-Expression beim Pankreaskarzinom lehnt sich der verwendete Score zur Auswertung der Ergebnisse an die Vorarbeiten von Ueda et al. an (*Ueda et al., 2004*).

Beim Kolonkarzinom wurde der EGFR-Rezeptor ebenfalls immunhistochemisch untersucht; es konnten jedoch keine signifikanten Daten erhoben werden. Chung et al. untersuchten bei Kolonkarzinom-Patienten mittels IHC-Untersuchung des EGFR-Rezeptors den Zusammenhang zwischen dem EGFR-Expressionslevel und dem Therapieansprechen auf die EGFR-Rezeptorblockertherapie mit Cetuximab. Hierbei ließ sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang erkennen (*Chung et al., 2005*). Beim Pankreaskarzinom gibt es jedoch einige Hinweise auf den Nutzen der Immunhistochemie als Biomarker für den klinischen Verlauf der Patienten (*Garcea et al., 2005; Ghaneha et al., 2002; Tobita et al., 2003*). Es zeigte sich, dass eine Überexpression des EGFR Gens häufig in Pankreaskarzinomen zu finden ist und mit einer schlechten Prognose einhergeht (*Ueda et al., 2004*). Dies macht die weitere Untersuchung des EGFR-Expressionslevels beim Pankreaskarzinom weiterhin interessant im möglichen Einsatz als prädiktiven und prognostischen Biomarker in der anti-EGFR Therapie.

Nachteile der Immunhistochemie sind die unterschiedliche Interpretation von Ergebnissen und die fehlenden technischen Standards in der Methodik (*Koutras et al., 2008; O'Leary et al., 2001*). Auch die unterschiedliche Heterogenität der Überexpression in Tumoren scheint eine Rolle zu spielen. Es scheint vor allem wichtig zu sein, eine standardisierte Methode zu finden und somit ein einheitliches Auswertungssystem zu etablieren.

Insgesamt ist es schwer, eine spezifische Tumor-Biomarkeranalyse beim Pankreaskarzinom durchzuführen, da meist das Vorhandensein von ausreichendem Tumormaterial der limitierende Faktor ist. Besonders beim Pankreaskarzinom ist es oft schwierig, ausreichend verwertbares Tumormaterial für eine detaillierte Biomarkeranalyse zu gewinnen, da bei vielen Patienten bereits bei Diagnosestellung keine chirurgische Therapie mehr möglich ist und somit auch teilweise kein histologisches Tumormaterial, zum Beispiel durch Operationen, gewonnen wird, sondern oft nur eine zytologische Untersuchung oder Stanzbiopsie der Metastasen vorgenommen werden. Dies schränkt die Fallzahl der translationalen Studien stark ein. Zudem kommen innerhalb einer Studie meist verschiedene Methoden zur Anwendung, welche jeweils genügend Tumormaterial benötigen. Da häufig nicht ausreichend Material vorhanden ist, kommt es zur Unvollständigkeit in den Fallzahlen der einzelnen Marker. Dies zeigte sich auch in der vorliegenden translationalen Studie: Von insgesamt 281 randomisierten Patientin in der Hauptstudie wurde bei 206 Patientin eine Paraffin-fixierte Probe gewonnen, jedoch konnte letztendlich nur bei 121 Patientin ein kompletter Biomarkerstatus erhoben werden.

Die unterschiedlichen Vorgehensweisen in der Fixierung des Tumormaterials führen ebenfalls zu Unterschieden in der Struktur des Probenmaterials und somit auch zu Unterschieden in der weiteren Verarbeitung der Probe. Zukünftig scheint eine Vereinheitlichung der Probenfixierung und -gewinnung wichtig zu sein. Es sollte auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, eine Alternative zu Paraffin-fixiertem Gewebe heranzuziehen. Blut stellt zum Beispiel eine gut reproduzierbare, technisch einfach durchführbare und in großen Mengen zu gewinnende Methode dar. Hiermit könnten deutlich höhere Studienfallzahlen generiert und sollte somit in zukünftige Evaluation mit einbezogen werden.

## 4.2. Diskussion der verschiedenen Biomarker

Beim Pankreaskarzinom ergibt sich mit einer 5-Jahresüberlebensrate unter 5% meist für den Patienten nur selten eine Chance auf einen kurativen Therapieansatz (*Jemal et al., 2008*). Viele Betroffene können nicht mehr von einer kompletten oder partiellen Tumorresektion profitieren. Diese Tatsache stellt den Einsatz der Chemotherapie in den Vordergrund der Therapie. Auch die relativ neuen Ansätze, gezielt Rezeptoren der Signaltransduktion (EGFR) zu inhibieren, spielen eine große Rolle in der derzeitigen Therapie. Wie schon in anderen Tumorentitäten hat sich der Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren als Fortschritt in der Tumorthherapie bewährt. Auch beim Pankreaskarzinom gibt es viele Hinweise auf den Nutzen des Einsatzes von Erlotinib und Gemcitabin. Moore et al., fanden in einer großen Phase III Studie mit 569 randomisierten Patienten, welche Gemcitabin mit Gemcitabin und Erlotinib verglich, einen statistisch signifikanten Vorteil im medianen Überleben in der Gemcitabin- Erlotinib-Gruppe im Vergleich zur Gemcitabin-Gruppe (6.42 Monate gegen 5.91 Monate;  $p=0.038$ ) (*Moore et al., 2007*). Da es bis zum heutigen Zeitpunkt keinen geeigneten Biomarker für die anti-EGFR Therapie gibt, der prognostisch oder prädiktiv eingesetzt werden könnte, ist dies Ziel vieler Forschungsgruppen. Prognostische Faktoren sind hierbei als patienten- und tumorbezogene Faktoren zu verstehen, welche unabhängig von der Behandlung eine Vorhersage über den Erkrankungsverlauf treffen. Prädiktive Faktoren hingegen sollen eine Aussage über das Ansprechen des Tumors auf die Therapie vorhersagen können (*Shepherd et al., 2006*).

### 4.2.1 KRAS-Mutationsstatus

In der vorliegenden Studie fand sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit und dem KRAS-Mutationsstatus. Wir konnten zeigen, dass Patienten mit einem KRAS-Wildtyp-Status im Durchschnitt länger leben als KRAS-mutierte Patienten (7.9 Monate gegen 5.7 Monate).

Eine aktuelle retrospektive Studie, in welcher Paraffin-fixiertes Tumorgewebe herangezogen wurde, konnte ebenfalls einen Überlebensvorteil von KRAS-Wildtyp-Patienten gegenüber KRAS-mutierten Patienten beschreiben (9.7 Monate vs. 5.2 Monate) (*Kim et al., 2011*). Zudem konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem KRAS-Mutationsstatus und einer Therapie mit Gemcitabin und Erlotinib ein schlechteres Gesamtüberleben aufwiesen (Gemcitabin/Erlotinib 5.2 Monate gegen Gemcitabin/Capecitabin 7.0 Monate) (*Kim et al., 2011*). Die hierbei erhobenen Daten sprechen dafür, dass der KRAS-Mutationsstatus

möglicherweise das Ansprechen der EGFR-Therapie bei Erlotinib-behandelten Patienten vorhersagen könnte. Diese Ergebnisse decken sich mit den von Boeck et al. publizierten Daten (Boeck et al., 2010). Auch Chen et al. berichteten, dass Patienten mit einer Mutation im KRAS-Gen ein verkürztes Überleben zu erwarten hätten als KRAS-Wildtyp Patienten (3.9 Monate vs. 10.2 Monate;  $p=0.001$ ). Des Weiteren wurde bei 33% der untersuchten Patienten eine KRAS-Mutation festgestellt, welche mit einer schlechteren Prognose korrelierte (Chen et al., 2010). In dieser Studie wurde jedoch kein histologisches Material zur Analyse verwendet, sondern auf Blutproben der Patienten zurückgegriffen. Zukünftig müsste jedoch versucht werden, diese These in weiteren prospektiven Studien zu untermauern.

Im Gegensatz dazu gibt es Studien, die keinen Zusammenhang zwischen dem KRAS-Status und dem Nutzen als prädiktive Marker auf das Therapieansprechen indizieren. Da Cunha Santos et al. zeigten in einer großen Phase III Studie mit 569 randomisierten Patienten, dass der KRAS-Wildtyp-Status keinen Überlebensvorteil hat (Da Cunha Santos et al., 2010). Allerdings konnte in dieser Studie nur bei  $n=25$  von insgesamt  $n=117$  Patienten ein KRAS-Wildtyp-Status erhoben werden. In zwei weiteren großen Studien zeigte sich ebenfalls, dass der KRAS-Mutationsstatus beim Pankreaskarzinom keinen Zusammenhang mit dem Überleben bei einer gezielten anti-EGFR-Therapie hat (Uemura et al., 2004; Salek et al., 2009). Nach unseren Ergebnissen gibt es jedoch einen Überlebensvorteil bei einem KRAS-Wildtyp-Status (siehe Tabelle 6; Heinemann et al., 2012)

Bei unseren Untersuchungen zeigte sich, dass alle gefunden Mutationen des KRAS-Gens auf Codon 12 lokalisiert sind. Als die häufigste Mutation des KRAS-Gens hat sich der Austausch von G zu A (c.35G>A(p.G12D)),  $n=81$ , gefolgt von G zu T (c.35G>T(p.G12V)),  $n=26$ , herausgestellt. Diese Erkenntnisse decken sich mit denen von Cheng et al. hier zählte ebenfalls der Austausch von G zu A und G zu T zu den häufigsten KRAS-Mutationen (Chen et al., 2010).

Die teils unterschiedlichen Ergebnisse in den verschiedenen bisher durchgeführten translationalen Studien sind vermutlich auf eine Reihe von Ursachen zurückzuführen. Die unterschiedlichen Patientengruppen (lokal fortgeschritten/metastasiert) in den einzelnen Studien, die verschiedenen Fallzahlen, die unterschiedlichen Patientenproben (Blutproben/histologisches Material) und die unterschiedlichen Studiendesigns (retrospektiv vs. prospektiv) und die verschiedenen molekularen Methoden der Biomarkeranalyse spielen möglicherweise eine bedeutende Rolle bei der Interpretation der Ergebnisse.

In beiden Studienarmen wurde Erlotinib eingesetzt. Aufgrund des Designs der Hauptstudie ist die Beurteilung des KRAS-Status als prädiktiver Marker für die Wirksamkeit von Erlotinib nicht möglich. Es bedarf weiterer Studien, welche eine ohne Erlotinib behandelte Kontrollgruppe einschließen um eindeutig den KRAS-Status als prädiktiven Biomarker zu detektieren. Diese Frage muss daher in weiteren prospektiven Studien geklärt werden.

#### 4.2.2 EGFR FISH

In der gezielten EGFR-Inhibitor-Therapie scheint die EGFR-Genkopiezahl ebenfalls eine Rolle als prädiktiver oder prognostischer Marker zu haben. Bei unseren Untersuchungen des EGFR-Rezeptors mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ergab sich jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit Effektivitätseindpunkten wie TTF2 oder dem Gesamtüberleben. In den multivariaten Analysen zeigte sich im Gegensatz zu den univariaten Analysen ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem EGFR-FISH-Status und dem Gesamtüberleben (Multivariat:  $p=0.00005$ ; Univariat= $0.25$ ) (siehe Tabelle 17 und 9). Hierbei scheint es sich um eine statistische Bias zu handeln.

In der Literatur hingegen gibt es Hinweise auf den prognostischen und prädiktiven Einsatz des EGFR-FISH-Status in der gezielten anti-EGFR-Therapie bei anderen Tumorentitäten. Beim Kolonkarzinom zeigte sich, dass die EGFR-Genkopiezahl ein prädiktiver Marker für das klinische Ansprechen auf die anti-EGFR-Therapie sein könnte (*Cappuzzo et al, 2008*). Moroni et al. untersuchten in ihrer Studie die EGFR-Genkopiezahl mittels FISH und fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen hoher Genkopiezahl und dem Ansprechen auf die Therapie mit anti-EGFR-Medikamenten (Cetuximab und Panitumumab) ( $p=0.01$ ) (*Moroni et al., 2005*).

Auch beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) ergaben sich Hinweise auf die prognostische und prädiktive Aussagekraft des EGFR-Status. Zhu et al. zeigten in den multivariaten Analysen ihrer Studie, dass bei unbehandelten Patienten mit NSCLC, bei denen ein EGFR-positiver Befund vorliegt ein schlechteres Überleben besteht als bei EGFR-FISH-negativen Patienten ( $p=0.025$ ); zudem fanden die Autoren, dass EGFR FISH-positive Patienten einen größeren Überlebensvorteil unter einer Erlotinib Therapie haben ( $p=0.005$ ) (*Zhu et al., 2008*). Somit zeigten sie, dass der EGFR-FISH Status sowohl einen prädiktiven als auch einen prognostischen Wert als Biomarker beim NSCLC haben kann. Hirsch et al. beschrieben ebenfalls bei NSCLC Patienten (welche Chemotherapie plus Cetuximab erhielten), dass FISH-positive Patienten ein besseres progressionsfreies Überleben gegenüber FISH-negativen

Patienten aufweisen (6 Monate vs. 3 Monate;  $p=0.0008$ ). Sie konnte zudem zeigen, dass bei FISH-positiven Patienten ein besseres Gesamtüberleben besteht (15 Monate vs. 7 Monate) (*Hirsch et al., 2006*). Somit scheint der EGFR FISH Status sowohl als prädiktiver als auch als prognostischer Marker in der anti-EGFR Therapie beim NSCLC eine Rolle zu spielen.

Beim Pankreaskarzinom gibt es derzeit nur sehr wenige Daten zum Stellenwert der EGFR-Genkopiezahl als potentiellen Biomarker. Da Cunha Santos et al. zeigten bei 107 Patienten mittels FISH-Analyse, dass die EGFR-Genkopiezahl, beim Pankreaskarzinom keinen Überlebensvorteil zeigt und somit nicht als prädiktiver Biomarker gewertet werden kann (5.29 Monate gegen 8.41 Monate) (*Da Cunha Santos et al., 2010*). Zwei weitere Studien untersuchten den Nutzen des EGFR FISH-Status als Biomarker in der gezielten anti-EGFR Therapie, doch auch sie konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der EGFR-Genkopiezahl und der prognostischen Relevanz als Biomarker feststellen (*Tzeng et al., 2007*; *Lee et al., 2007*).

In Rahmen dieser Studie zeigte sich keine statistisch signifikanten Korrelationen mit den Effektivitätspunkten (TTF1, TTF2 und OS) und somit wurde deutlich, dass der prädiktive oder prognostische Wert des EGFR FISH-Status als Biomarker in der anti-EGFR-Therapie scheinbar nicht gegeben ist. Gründe für diese Beobachtungen beim Pankreaskarzinom könnten sein, dass es sich hierbei um einen genetisch sehr komplexen Tumor handelt, in dessen Pathobiologie viele verschiedene Signaltransduktionswege eine Rolle spielen. Es scheint nicht möglich zu sein, molekularbiologische Ergebnisse, die man z. B. bei anderen Tumorentitäten wie dem NSCLC gewonnen hat, direkt auf das Pankreaskarzinom zu übertragen, da es sich um unterschiedliche EGFR-Signalwege für die Karzinogenese und Tumorprogression zu handeln scheint. Aufgrund unserer Ergebnisse und der aktuellen Studienlage ist die weitere Untersuchung des EGFR FISH-Status beim Pankreaskarzinom nicht empfehlenswert. Zukünftig sollten weitere Projekte ihren Fokus auf vielversprechende andere Biomarker, wie z. B. MEK, legen.

#### **4.2.3 EGFR IHC**

Die Überexpression des EGFR auf Proteinebene könnte ebenfalls als prädiktiver oder prognostischer Marker in der gezielten anti-EGFR-Therapie eingesetzt werden. Die Überexpression des EGFR-Rezeptors tritt beim Pankreaskarzinom häufig auf und scheint eine wichtige Rolle im Krankheitsverlauf zu spielen (*Korc et al., 1992*). Unter Zuhilfenahme der

Immunhistochemie ist es möglich, das Protein-Expressionslevel des EGFR zu bestimmen. Bei anderen Tumorentitäten gibt es bereits Hinweise für den prädiktiven Nutzen des Expressionslevels von Rezeptoren der erbB-Rezeptorfamilie; das erbB2 (HER2/neu) wird in der Brustkrebstherapie bereits als negativer prognostischer Parameter, jedoch prädiktiver Biomarker für die Effektivität von Trastuzumab eingesetzt. Beim Kolonkarzinom hingegen scheint das EGFR-Expressionslevel kein robuster und aussagefähiger prädiktiver Biomarker zu sein (*Chung et al., 2005*).

Die aktuelle Datenlage beim Pankreaskarzinom gibt Hinweise auf den prognostischen Wert des EGFR-Expressionslevels als Biomarker. Ueda et al. untersuchten in einer Studie 76 Proben von Pankreaskarzinompatienten und konnten eine signifikante Korrelation zwischen einem hohen Expressionslevel (Grad 2-3) und einer schlechten Prognose und damit verbundenen schnelleren Tumorprogression feststellen (*Ueda et al., 2004*). In einer aktuellen Studie konnten Fujita et al. zeigen, dass ein erhöhtes EGFR-Expressionslevel ein unabhängiger prognostischer Faktor in der Gemcitabin-basierten Chemotherapie bei Pankreaskarzinompatienten ist (95%CI=1.154-8.194) (*Fujita et al., 2011*).

Im Zuge unserer Untersuchungen konnte keine Korrelation zwischen der EGFR-Expression und den Effektivitäts- oder Überlebensparametern festgestellt werden. Die Daten der vorliegenden Studie sprechen gegen einen prognostischen oder prädiktiven Einsatz des EGFR-Expressionslevels in der anti-EGFR-Therapie. Ähnliche Beobachtungen machten auch Moore et al. in ihrer retrospektiven Studie, in der der EGFR-Expressionsstatus mittels IHC-Untersuchung keinen Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten zeigte (*Moore et al., 2007*). Ein möglicher Grund für die fehlende Signifikanz kann die schlechte Vergleichbarkeit der einzelnen Studien bei meist nicht einheitlicher Methodik sein.

#### **4.2.4 Skin Rash**

Es ist schon lange bekannt, dass das Auftreten eines Hautausschlages ein verlängertes Überleben für Erlotinib behandelte Patienten bedeutet. Jedoch konnte auch hier noch nicht genau festgestellt werden, ob es sich um einen prädiktiven oder prognostischen Biomarker handelt.

Häufig kommt es bei der Therapie mit EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren zum Auftreten eines charakteristischen Hautausschlages im Bereich des Gesichtes und des Oberkörpers innerhalb der ersten Wochen der Therapie (*Hidalgo et al., 2010*). Die Ursachen für das Auftreten sind bis

heute noch nicht abschließend geklärt, aber man geht davon aus, dass es durch die Therapie zu einer Störung im EGFR-Signalweg kommt, welcher auch in den Keratinozyten der Dermis eine wichtige Rolle spielt. Die EGFR-Inhibition könnte aber auch eine lokale oder systemische entzündliche Hautreaktion hervorrufen und somit zu dem typischen Hautausschlag führen (*Perez-Soler et al., 2005*). Unsere Ergebnisse zeigten keine Korrelation zwischen den Biomarkern EGFR und KRAS in Bezug auf Hautausschlag (siehe Tabelle 16).

In einer großen Phase III Studie über das fortgeschrittene Pankreaskarzinom konnte von 282 Erlotinib-behandelten Patienten bei 102 ein Hautausschlag festgestellt werden. Im Cox-Regressionsmodell zeigte sich, dass die Patienten mit einem Hautausschlag länger leben als Patienten ohne Hautausschlag ( $p=0.037$ ) (*Moore et al., 2007*). Die mittleren Überlebenszeiten lagen für Patienten mit einem Hautausschlag Grad 0 bei 5.3 Monaten, für Patienten mit einem Grad 1 bei 5.8 Monaten und für Patienten mit einem Grad 2 bei 10.5 Monaten (*Moore et al., 2007*). In der AIO-PK0104 Hauptstudie zeigte sich ebenfalls, dass Patienten mit einem Hautausschlag ein besseres Überleben haben als Patienten ohne (8.7 Monate vs. 3.7 Monate;  $p<0.001$ ) (*Boeck et al., 2010*).

Abschließend scheint bei Patienten ohne Hautausschlag eine frühzeitige Therapieregime Festsetzung und/oder der Einsatz von alternativen Therapieregimen wichtig zu sein.

### **4.3. Ausblick**

Verschiedene Studien haben in den letzten Jahren für das Verständnis des EGFR-Signalweges und dem Nutzen als prädiktiven Biomarker gesorgt und somit zur Entwicklung der Wirksamkeit spezifischer anti-EGFR-Medikamente geführt. Diese Erkenntnisse wurden vor allem beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom und dem kolorektalen Karzinom gewonnen. Beim Pankreaskarzinom handelt es sich wahrscheinlich um einen genetisch viel komplexeren Tumor, weshalb ein Vergleich der Daten der verschiedenen Karzinome nicht möglich ist. Zukünftig wird es nötig sein, die Forschung im Bereich des Pankreaskarzinoms zu intensivieren um individuelle Therapiestrategien mit dem Einsatz von spezifischen Biomarkern zu etablieren.

In kommenden Studien sollte der Einsatz von gut reproduzierbaren, prospektiven, translationalen und standardisierten Studiendesigns herangezogen werden, da nur somit auch in zukünftigen Studien ein weiterer Ausbau des Biomarkerstatus beim Pankreaskarzinom gegeben werden kann.

Jones et al. zeigten in ihrer Studie, dass es eine Reihe von Mutationen und Amplifikationen beim Pankreaskarzinom gibt, welche noch nicht abschließend untersucht sind, aber vermutlich eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese spielen (*Jones et al., 2008*). Gerade aus dieser Komplexität der verschiedenen Genmutationen und Amplifikationen beim Pankreaskarzinom und vor dem Hintergrund der negativen Daten zu EGFR könnte die Untersuchung, z.B. die „EGFR-downstream“-Signalkaskade (wie z.B. MEK, ERK), eine Aufgabe zukünftiger Forschungen sein.

In unserer Studie zeigte sich, dass der EGFR-Status weder als prädiktiver noch als prognostischer Biomarker dient. In zukünftigen prospektiven translationalen Studien beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom sollten daher die EGFR-Biomaker unseres Erachtens nicht weiter untersucht werden; dringend nötig hingegen scheint eine weitere Definition der Rolle von KRAS, auch vor dem Hintergrund der klinisch hoch relevanten Frage, ob KRAS als prädiktiver Marker für die Effektivität von Erlotinib dienen könnte.

## 5. Zusammenfassung

Aufgrund der schlechten Prognose und Therapiemöglichkeiten besteht dringender Handlungsbedarf im Bereich der Etablierung neuer Therapieansätze beim Pankreaskarzinom. Mit der Einführung von EGFR-Inhibitoren konnte ein neuer Therapieansatz evaluiert werden. Ziel der hier durchgeführten Untersuchung war es, prognostische oder prädiktive Biomarker für die neue anti-EGFR-Therapie zu etablieren.

Hierfür wurde in histologischem Tumormaterial von 208 Patienten, die im Rahmen einer großen klinischen Studie (AIO-PK 0104) entweder mit Gemcitabin/Erlotinib gefolgt von Capecitabin oder Capecitabin/Erlotinib gefolgt von Gemcitabin behandelt wurden, die Rolle der Biomarker KRAS und EGFR näher untersucht. Der Schwerpunkt lag auf der Analyse dreier unterschiedlicher Biomarker, welche mittels drei verschiedener Methoden eingehend untersucht wurden. Die PCR-basierte Pyrosequenzierung diente dazu, den KRAS-Mutationsstatus zu bestimmen; die Proben wurden hierbei in eine Wildtyp- und eine Mutiertengruppe eingeteilt. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) konnte die EGFR-Genkopiezahl ermittelt werden und nach einem bestimmten Score die Ergebnisse in eine FISH-positiv und -negativ Gruppe zugeordnet werden. Im Rahmen der immunhistochemischen (IHC) Analyse des EGFR Expressionslevels, wurde anhand eines Scores in IHC-positiv und -negativ unterteilt.

Bei  $n=121/173$  (70%) Patienten konnte eine Mutation im KRAS-Gen festgestellt werden. EGFR-Genamplifikationen konnten bei  $n=77/166$  (46%) der Patienten und eine EGFR-Expression konnte bei  $n=89/166$  (49%) Patienten gezeigt werden. In den univariaten Analysen ergab sich lediglich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem KRAS-Mutationsstatus und dem Gesamtüberleben (HR=1.68;  $p=0.005$ ). In Bezug auf die EGFR IHC-Untersuchung (HR=0.96,  $p=0.80$ ) und die EGFR FISH-Analyse (HR=1.22,  $p=0.25$ ) konnte keine Korrelation mit Effektivitätseindpunkten gezeigt werden. Zwischen den drei untersuchten Biomarkern und dem Hautexanthem unter Erlotinib-Therapie fand sich ebenfalls keine Korrelation.

In zukünftigen prospektiven translationalen Studien beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom sollten daher die EGFR-Biomarker unseres Erachtens nicht weiter untersucht werden; dringend nötig erscheint hingegen eine weitere Definition der Rolle von KRAS, auch vor dem Hintergrund der klinisch hoch relevanten Frage, ob KRAS als prädiktiver Marker für die Effektivität von Erlotinib dienen könnte.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1) **Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC, Brambs HJ, Feuerbach S, Grabenbauer G, et al.** Carcinoma of the pancreas: summary of guidelines 2007, issued jointly by 15 German specialist medical societies. *Dtsch Med Wochenschr* 2007; 132: 1696-1700.
- 2) **Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC, Brambs HJ, Feuerbach S, Grabenbauer G, et al.** S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007. *Z Gastroenterol* 2007; 45: 487-523.
- 3) **Ahlgren JD.** Chemotherapy for pancreatic carcinoma. *Cancer* 1996; 78: 654-663.
- 4) **Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al.** American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2091-2096.
- 5) **Aranda E, Manzano JL, Rivera F, Galán M, Valladares-Ayerbes M, and Pericay CA.** Phase II, open label study to evaluate the relationship between skin rash and survival in patients with unresectable and /or metastatic pancreatic cancer treated with erlotinib combined with gemcitabine. *J Clin Oncol* 2010; 28:15s (suppl; abstr 4094).
- 6) **Batty GD, Kivimaki M, Morrison D, Huxley R, Smith GD, Clarke R, et al.** Risk factors for pancreatic cancer mortality: extended follow-up of the original Whitehall Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 673-675.
- 7) **Boeck S, Heinemann V.** The role of second-line chemotherapy after gemcitabine failure in patients with advanced pancreatic cancer. *Future Oncology* 2008; 4:41-50.
- 8) **Boeck S, Vehling-Kaiser U, Waldschmidt D, Kettner E, Märten A, Winkelmann C, et al.** Gemcitabine plus erlotinib (GE) followed by capecitabine (C) versus capecitabine plus erlotinib (CE) followed by gemcitabine (G) in advanced pancreatic cancer (APC): A randomized, cross-over phase III trial of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *J Clin Oncol* 2010; 28:18s (suppl;abstr LBA4011).
- 9) **Brandt R, Eisenbrandt R, Leenders F, Zschiesche W, Binas B, Juergensen C et al.** Mammary gland specific hEGF receptor transgene expression induces neoplasia and inhibits differentiation. *Oncogene* 2000; 19: 2129-2137.
- 10) **Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al.** Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2403-2413.
- 11) **Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, et al.** Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 643-655.
- 12) **Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Finocchiaro G, Skokan M, Gajapathy S, Carnaghi C, et al.** Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2008; 99: 83-89.

- 13) **Carmichael J, Fink U, Russell RC, Spittle MF, Harris AL, Spiessi G, et al.** Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1996; 73: 101-105.
- 14) **Casper ES, Green MR, Kelsen DP, Heelan RT, Brown TD, Flombaum CD, et al.** Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Invest New Drugs* 1994; 12: 29-34.
- 15) **Chen H, Tu H, Meng ZQ, Chen Z, Wang P, and Liu LM.** K-ras mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36: 657-662.
- 16) **Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al.** Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1803-1810.
- 17) **Cunningham D, Chau I, Stocken DD, Valle JW, Smith D, Steward W et al.** Phase III randomized comparison of gemcitabine with gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2005; 27(35): 5513-5518.
- 18) **Da Cunha Santos G, Dhani N, Tu D, Chin K, Ludkovski O, Kamel-Reid S, et al.** Molecular predictors of outcome in a phase 3 study of gemcitabine and erlotinib therapy in patients with advanced pancreatic cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study PA.3. *Cancer* 2010; 116: 5599-5607.
- 19) **Daus H, L. Trümper, B. Bürger, G. Jacobs, S. Kriener, G. v. Blohn, et al.** Ki-ras-Mutationen als molekularer Tumormarker für Pankreaskarzinome. *Dtsch med Wochenschr* 1995; 120: 821-825.
- 20) **De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, et al.** Wild-type KRAS state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2008; 19: 508-515.
- 21) **De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, et al.** Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Jama* 2010; 304: 1812-1820.
- 22) **Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP et al.** Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007; 96: 1166-1169.
- 23) **Fearon ER.** K-ras gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(24): 1978-1980.
- 24) **Friess H, Yamanaka Y, Kobrin MS, Do DA, Buchler MW, and Korc M.** Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumor progression. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1413-1420.
- 25) **Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Itaba S, Ito T, Nakata K, et al.** High EGFR mRNA expression is a prognostic factor for reduced survival in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. *Int J Oncol* 2011; 38(3): 629-641.

- 26) **Fukushima T, Takenoshita S.** Colorectal carcinogenesis. *Fukushima J Med Sci* 2001; 47(1): 1-11.
- 27) **Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, and Berry DP.** Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2213-2236.
- 28) **Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, Bergkvist L, Bernstein L, van den Brandt PA, et al.** Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 765-776.
- 29) **Ghadirian P, Liu G, Gallinger S, Schmocker B, Paradis AJ, Lal G, et al.** Risk of pancreatic cancer among individuals with a family history of cancer of the pancreas. *Int J Cancer* 2002; 97: 807-810.
- 30) **Ghaneh P, Kawesha A, Evans JD, and Neoptolemos JP.** Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 1-11.
- 31) **Han SW, Kim TY, Hwang PG, Jeong S, Kim J, Choi IS, et al.** Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2493-2501.
- 32) **Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, and Jung A.** Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev* 2009; 35: 262-271.
- 33) **Heinemann V, Vehling-Kaiser U, Waldschmidt D, Kettner, Boeck S.** Gemcitabine plus erlotinib followed by capecitabine versus capecitabine plus erlotinib followed by gemcitabine in advanced pancreatic cancer: final results of a randomised phase 3 trial of the 'Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie' (AIO-PK0104). *Gut* 2013; 62:751-759.
- 34) **Herynk MH, Radinsky R.** The coordinated functional expression of epidermal growth factor receptor and c-Met in colorectal carcinoma metastasis. *In Vivo* 2000; 14: 587-596.
- 35) **Hidalgo M, Siu LL, Nemunaitis J, Rizzo J, Hammond LA, Takimoto C, et al.** Phase I and pharmacologic study of OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3267-3279.
- 36) **Hidalgo M.** Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 2010; 362: 1605-1617.
- 37) **Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Franklin WA, Dziadziuszko R, Thatcher N, et al.** Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5034-5042.
- 38) **Horton KM.** Multidetector CT and three-dimensional imaging of the pancreas state of art. *J Gastrointest Surg* 2002; 6(2): 126-128.
- 39) **Ibrahim S, Seth R, O'Sullivan B, Fadhil W, Taniere P, and Ilyas M.** Comparative analysis of pyrosequencing and QMC-PCR in conjunction with high resolution melting for KRAS/BRAF mutation detection. *Int J Exp Pathol* 2010; 91: 500-505.

- 40) **Immervoll H, Hoem D, Kugarajh K, Steine SJ, and Molven A.** Molecular analysis of the EGFR-RAS-RAF pathway in pancreatic ductal adenocarcinomas: lack of mutations in the BRAF and EGFR genes. *Virchows Arch* 2006; 448: 788-796.
- 41) **Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al.** Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008; 321: 1801-1806.
- 42) **Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, et al.** Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1672-1694.
- 43) **Kamangar F, Dores GM, and Anderson WF.** Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2137-2150.
- 44) **Kim ST, Lim do H, Jang KT, Lim T, Lee J, Choi YL, et al.** Impact of KRAS mutations on clinical outcomes in pancreatic cancer patients treated with first-line gemcitabine-based chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 1993-1999.
- 45) **Korc M, Chandrasekar B, Yamanaka Y, Friess H, Buchier M, and Beger HG.** Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Clin Invest* 1992; 90: 1352-1360.
- 46) **Koutras AK, Kalogeras KT, Dimopoulos MA, Wirtz RM, Dafni U, Briasoulis E, et al.** Evaluation of the prognostic and predictive value of HER family mRNA expression in high-risk early breast cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study. *Br J Cancer* 2008; 99: 1775-1785.
- 47) **Kulke MH, Blaszewski LS, Ryan DP, Clark JW, Meyerhardt JA, Zhu AX, et al.** Capecitabine plus Erlotinib in gemcitabine-refractory advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4787-4792.
- 48) **L'Allemain G.** HER-ErbB family of receptors and their ligands: mechanisms of activation, signals and deregulation in cancer. *Bull Cancer* 2003; 90: 179-185.
- 49) **Lee J, Jang KT, Ki CS, Lim T, Park YS, Lim HY, et al.** Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2007; 109: 1561-1569.
- 50) **Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al.** KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3992-3995.
- 51) **Lohr M, Kloppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, and Luttges J.** Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* 2005; 7: 17-23.
- 52) **Lowenfels AB, and Maisonneuve P.** Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20(2): 197-209.

- 53) **Maire F, Micard S, Hammel P, Voitot H, Levy P, Cugnenc PH, et al.** Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: value of the detection of KRAS2 mutations in circulating DNA. *Br J Cancer* 2002; 87: 551-554.
- 54) **Marmor MD, Skaria KB, and Yarden Y.** Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 903-913.
- 55) **Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al.** Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1960-1966.
- 56) **Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al.** Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 2005; 6: 279-286.
- 57) **Neuhaus P, H. Riess, S. Post, K. Gellert, K. Ridwelski, H. Schramm, et al.** A roandomised, prospective, multicenter, phase III trial of adjuvant chemotherapie with gemcitabin vs. observation in patients with resected pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: (May 20 suppl; abstr LBA4504).
- 58) **Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, et al.** Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005; 7: 413-421.
- 59) **Ohsaki Y, Tanno S, Fujita Y, Toyoshima E, Fujiuchi S, Nishigaki Y, et al.** Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncology Report* 2000; 7: 603-607.
- 60) **O'Leary TJ.** Standardization in immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001; 9: 3-8.
- 61) **Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, et al.** KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2005; 2: e17.
- 62) **Perez-Soler R, Delord JP, Halpern A, Kelly K, Krueger J, Sureda BM, et al.** HER1/EGFR inhibitor-associated rash: future directions for management and investigation outcomes from the HER1/EGFR inhibitor rash management forum. *Oncologist* 2005; 10: 345-356.
- 63) **Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, Roessner A, and Schneider-Stock R.** K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathol Res Pract* 2007; 203: 489-497.
- 64) **Rau HG, Wichmann MW, Wilkowski R, Heinemann V, Sackmann M, Helmberger T, et al.** Surgical therapy of locally advanced and primary inoperable pancreatic carcinoma after neoadjuvant preoperative radiochemotherapy. *Chirurg* 2002; 73: 132-137.

- 65) **Ritts RE, and Pitt HA.** CA 19-9 in pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 1998; 7: 93-101.
- 66) **RKI.** Krebs in Deutschland. *Saarbrücken 2006, Robert Koch Institut.*
- 67) **Rosewicz S, and Wiedenmann B.** Pancreatic carcinoma. *Lancet* 1997; 349: 485-489.
- 68) **Rothenberg ML, Moore MJ, Cripps MC, Andersen JS, Portenoy RK, Burris HA, 3rd, et al.** A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer. *Ann Oncol* 1996; 7: 347-353.
- 69) **Rubin I, and Yarden Y.** The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 12 Suppl 2001; 1: S3-8.
- 70) **Saisho H, and Yamaguchi T.** Diagnostic imaging for pancreatic cancer: computed tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography. *Pancreas* 2004; 28: 273-278.
- 71) **Salek C, Minarikova P, Benesova L, Nosek V, Strnad R, Zavoral M, and Minarik M.** Mutation status of K-ras, p53 and allelic losses at 9p and 18q are not prognostic markers in patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 1803-1810.
- 72) **Schünke M,** Prometheus Innere Organe; Lernatlas der Anatomie. *Vol. 2. 2009: Thieme Verlag.*
- 73) **Shepherd FA, and Tsao MS.** Epidermal growth factor receptor biomarkers in non-small-cell lung cancer: a riddle, wrapped in a mystery, inside an enigma. *J Clin Oncol* 2010; 28: 903-905.
- 74) **Shepherd FA, and Tsao MS.** Unraveling the mystery of prognostic and predictive factors in epidermal growth factor receptor therapy. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1219-1220.
- 75) **Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al.** Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 123-132.
- 76) **Sundstrom M, Edlund K, Lindell M, Glimelius B, Birgisson H, Micke P, and Botling J.** KRAS analysis in colorectal carcinoma: analytical aspects of Pyrosequencing and allele-specific PCR in clinical practice. *BMC Cancer* 2010; 10: 660.
- 77) **Tobita K, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Ohtani Y, Oida Y, et al.** Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis. *Int J Mol Med* 2003; 11: 305-309.
- 78) **Tumorregister München (2010) Basis-Statistiken C25: Pankreaskarzinom.** Abrufbar von: [http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/base\\_C25\\_G.pdf](http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/base_C25_G.pdf)
- 79) **Tzeng CW, Frolov A, Frolova N, Jhala NC, Howard JH, Vickers SM, et al.** EGFR genomic gain and aberrant pathway signaling in pancreatic cancer patients. *J Surg Res* 2007; 143: 20-26.

- 80) **Tzeng CW, Frolov A, Frolova N, Jhala NC, Howard JH, Buchsbaum DJ, et al.** Epidermal growth factor receptor (EGFR) is highly conserved in pancreatic cancer. *Surgery* 2007; 141: 464-469.
- 81) **Ueda S, Ogata S, Tsuda H, Kawarabayashi N, Kimura M, Sugiura Y, et al.** The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2004; 29: e1-8.
- 82) **Uemura T, Hibi K, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, Okochi O, et al.** Detection of K-ras mutations in the plasma DNA of pancreatic cancer patients. *J Gastroenterol* 2004; 39: 56-60.
- 83) **Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, et al.** Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984; 309: 418-425.
- 84) **Van Custem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al.** Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 1408-1417.
- 85) **Weichselbaum RR, Dunphy EJ, Beckett MA, Tybor AG, Moran WJ, Goldman ME, et al.** Epidermal growth factor receptor gene amplification and expression in head and neck cancer cell lines. *Head Neck* 1989; 11: 437-442.
- 86) **Wilkowski R, Thoma M, Schauer R, Wagner A, and Heinemann V.** Effect of chemoradiotherapy with gemcitabine and cisplatin on locoregional control in patients with primary inoperable pancreatic cancer. *World J Surg* 2004; 28: 1011-1018.
- 87) **Wittinghofer A, and Pai EF.** The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem Sci* 1991; 16: 382-387.
- 88) **Yamanaka Y.** The immunohistochemical expressions of epidermal growth factors, epidermal growth factor receptors and c-erbB-2 oncoprotein in human pancreatic cancer. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1992; 59(1): 51-61.
- 89) **Yarden Y, and Sliwkowski MX.** Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 127-137.
- 90) **Yeh JJ, and Der CJ.** Targeting signal transduction in pancreatic cancer treatment. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 673-694.
- 91) **Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, Wilentz RE, Sohn TA, Kern SE et al.** Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer* 2002; 26(4): 176-275.
- 92) **Zhu CQ, da Cunha Santos G, Ding K, Sakurada A, Cutz JC, Liu N, et al.** Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4268-427.

## 7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1:	Relatives Überleben für das Pankreaskarzinom
Abbildung 2:	Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms nach UICC
Abbildung 3:	EGFR Signaltransduktionsweg
Abbildung 4:	Übersicht über die Therapieschemata der Hauptstudie AIO-PK0104
Abbildung 5:	Übersicht über die Effektivitätseindpunkte (TTF1/TTF2) der Hauptstudie
Abbildung 6:	PCR-Primersequenzen
Abbildung 7:	Mastermix PCR
Abbildung 8:	Gelelektrophorese
Abbildung 9:	Sequenzierungsprimer
Abbildung 10:	Mastermix Pyrosequenzierung
Abbildung 11:	Pyrosequenzierungsergebnisse EGFR-FISH
Abbildung 12:	EGFR FISH Polysomie low: ( $\geq 4$ Gensignale in über $\geq 10\%$ der Zellkerne)
Abbildung 13:	EGFR FISH Polysomie high: ( $\geq 4$ Gensignale in über $\geq 40\%$ der Zellkerne)
Abbildung 14:	EGFR FISH Amplifikation ( $\geq 15$ Kopien in $\geq 10\%$ der Zellkerne, Gencluster oder Ratio Gen/Zentromer $\geq 2$ )
Abbildung 15:	EGFR IHC Score 0 (keine Braunfärbung -> keine Expression)
Abbildung 16:	EGFR IHC Score 1 (schwache Braunfärbung -> schwache Expression)
Abbildung 17:	EGFR IHC Score 2 (mittlere Braunfärbung -> mittlere Expression)
Abbildung 18:	EGFR IHC Score 3 (starke Braunfärbung -> hohe Expression)
Abbildung 19:	Übersicht über die Patientenrekrutierung
Abbildung 20:	Korrelation zwischen KRAS-Mutationsstatus und Gesamtüberleben
Tabelle 1:	Patientencharakteristika der Studienpopulation
Tabelle 2:	Häufigste Mutationen des Codons 12 auf dem KRAS-Gen
Tabelle 3:	Korrelation der Patientencharakteristika mit den KRAS-Ergebnissen (dichotome Variablen)

Tabelle 4:	Korrelation der Zeit bis zum Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie mit den KRAS-Ergebnissen
Tabelle 5:	Korrelation des Gesamtüberlebens mit den dichotomen KRAS-Ergebnissen
Tabelle 6:	Häufigkeit der verschiedenen EGFR FISH-Scores
Tabelle 7:	Korrelation der Patientencharakteristika mit den EGFR FISH-Ergebnissen (dichtome Variablen)
Tabelle 8:	Korrelation der Zeit bis zum Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie und dem Gesamtüberleben mit den EGFR FISH-Ergebnissen (dichtome Variable)
Tabelle 9:	Korrelation der Zeit bis zum Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie und dem Gesamtüberleben mit den EGFR FISH-Ergebnissen (stetige Variable)
Tabelle 10:	Häufigkeit der verschiedenen EGFR IHC-Scores
Tabelle 11:	Korrelation der Patientencharakteristika mit den EGFR IHC-Ergebnissen (dichtome Variablen)
Tabelle 12:	Korrelation der Zeit bis zum Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie und dem Gesamtüberleben mit den EGFR IHC-Ergebnissen (dichtome Variable)
Tabelle 13:	Korrelation der Zeit bis zum Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie und dem Gesamtüberleben mit den EGFR IHC-Ergebnissen (stetige Variable)
Tabelle 14:	Korrelation zwischen EGFR FISH und EGFR IHC
Tabelle 15:	Korrelation zwischen den einzelnen Biomarkern mit dem Auftreten eines Hautausschlages
Tabelle 16:	Uni- und multivariate Cox-Regressionsmodelle für das Gesamtüberleben
Tabelle 17:	Uni- und multivariate Cox-Regressionsmodelle für die Zeit bis zum Versagen der Erstlinientherapie (TTF1)
Tabelle 18:	Uni- und multivariate Cox-Regressionsmodelle für die Zeit bis zum Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie (TTF2)

## **8. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Volker Heinemann, (Medizinische Klinik III, Klinikum der Universität München–Großhadern) danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn PD. Dr. med. Stefan Böck (Medizinische Klinik III, Klinikum der Universität München-Großhadern) bin ich für seine Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit zu Dank verpflichtet.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner vom Pathologischen Institut der Universität München für die hervorragende Kooperation und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung (Pathologisches Institut der Universität München) für die Unterstützung beim technischen Teil der Arbeit.

Auch möchte ich allen Mitarbeitern der Studie sowie allen Probanden, die durch ihre Teilnahme diese Studie erst ermöglicht haben, danken.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts für Pathologie der Ludwig-Maximilian-Universität München, die dazu beigetragen haben, dass ich dieses Thema mit Freude bearbeiten konnte. Insbesondere Frau Annegret Schäfer, Medizinisch-Technische-Assistentin des Pathologischen Instituts der Universität München, die bei der Bearbeitung der Immunhistochemischen Analysen viel zum Ergebnis beigetragen hat.

Meinen Eltern möchte ich für die Unterstützung und Ermutigung sowohl während des Studiums als auch darüber hinaus danken.

## Aus dieser Arbeit entstandene wissenschaftliche Publikationen

Boeck S, Jung A, Laubender RP, Neumann J, **Egg R**, Goritschan C, Vehling-Kaiser U, Winkelmann C, Fischer von Weikersthal L, Clemens M, Gauler TC, Märten A, Klein S, Kojouharoff G, Barner M, Geissler M, Greten TF, Mansmann U, Kirchner T, Heinemann V (2012) EGFR pathway biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: translational results from the randomized, cross-over phase 3 trial AIO-PK0104. *Br J Cancer* 2012; doi:10.1038/bjc.2012.495.

### Abstracts/Kongressbeiträge:

Boeck S, Jung A, Laubender RP, Neumann J, **Egg R**, Goritschan C, Vehling-Kaiser U, Winkelmann C, Fischer von Weikersthal L, Clemens MR, Gauler T, Märten A, Klein S, Kojouharoff G, Barner M, Geissler M, Greten TF, Mansmann U, Kirchner T, Heinemann V (2011) Molecular markers of the EGFR pathway in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer (APC): translational analyses of a randomized, cross-over AIO phase III trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 29 (7s): Abstract # 4047.

Böck S, Jung A, Laubender RP, Neumann J, **Egg R**, Goritschan C, Vehling-Kaiser U, Winkelmann C, Fischer von Weikersthal L, Clemens MR, Gauler T, Märten A, Klein S, Kojouharoff G, Barner M, Geissler M, Greten TF, Mansmann U, Kirchner T, Heinemann V (2011) EGFR pathway biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: translational results from a randomized, cross-over AIO phase III trial. *Onkologie* 34 (suppl 6): 216 (V734).

## Eidesstattliche Versicherung

**Egg, Rosalind**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Rolle von KRAS und EGFR Expression bei Erlotinib behandelten  
Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom: Translationale  
Untersuchung einer randomisierten Phase- III- Studie der  
„Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie“ (AIO-PK 0104)**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

**Basel, 19.11.2014**

---

Ort, Datum