

Aus dem Pathologischen Institut  
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner  
Ludwig-Maximilians-Universität München

## **Habilitationsschrift**

**Molekulare Dysregulationen und ihre Biomarker im  
Pankreaskarzinom**

vorgelegt von  
Dr. med. Steffen Ormanns

2018

Aus dem Pathologischen Institut  
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner  
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Molekulare Dysregulationen und ihre Biomarker im  
Pankreaskarzinom**

vorgelegt von  
Dr. med. Steffen Ormanns

2018

## Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	3
2.	Einleitung	4
3.	Zielsetzung und Fragestellung	6
4.	Zusammenfassung und Diskussion themenbezogener eigener Arbeiten	7
4.1	pERK, pAKT and p53 as tissue biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: a translational subgroup analysis from AIO-PK0104	7
4.2	Human equilibrative nucleoside transporter 1 is not predictive for gemcitabine efficacy in advanced pancreatic cancer: translational results from the AIO-PK0104 phase III study with the clone SP120 rabbit antibody	10
4.3	Impact of SPARC expression on outcome in patients with advanced pancreatic cancer not receiving nab-paclitaxel: A pooled analysis from prospective clinical and translational trials	11
4.4	The impact of SMAD4 loss on outcome in patients with advanced pancreatic cancer treated with systemic chemotherapy	13
4.5	ALK expression is absent in pancreatic ductal adenocarcinoma	14
4.6	POLE gene hotspot mutations in advanced pancreatic cancer	15
4.7	Desmogleins as prognostic biomarkers in resected pancreatic ductal adenocarcinoma	16
5.	Ausblick	18
6.	Literaturverzeichnis	19
7.	Danksagung	22

## 1. Zusammenfassung

Gastrointestinale Karzinome weisen häufig spezifische molekulare Alterationen auf, die entscheidende Funktionen in der Initiation der Karzinogenese, Aufrechterhaltung und Progression dieser Tumorerkrankungen haben.

Pankreaskarzinome weisen auch bei vollständiger chirurgischer Resektion eine durchwegs schlechte Prognose auf, da sie in der Regel in Form von Lebermetastasen oder lokalen (Lymphknoten-) Metastasen rezidivieren. Die Untersuchung und Charakterisierung prognostischer Biomarker erlaubt die Identifikation molekularer Zielstrukturen, die möglicherweise für die schlechte Prognose resezierter Pankreaskarzinome mitverantwortlich sind, spezielle Tumor-Subgruppen definieren und potentielle Therapieziele darstellen. Des Weiteren ermöglichen ausführlich im Rahmen von Therapiestudien charakterisierte Patientenkollektive fortgeschrittener Pankreaskarzinome eine Untersuchung sowohl prognostischer als auch prädiktiver Biomarker und somit möglicherweise eine Verbesserung und Individualisierung der Therapie. Insbesondere die Untersuchung der Bedeutung potentieller Zielstrukturen bereits in anderen Tumorerkrankungen etablierter Therapieoptionen könnte im Pankreaskarzinom ein vielversprechender Ansatz sein. Ziel dieses Habilitationsprojektes war es putative Biomarker in diesen Tumoren zu validieren und hinsichtlich ihrer prognostischen und prädiktiven Bedeutung zu analysieren um somit prognostisch oder therapeutisch relevante Patientengruppen zu identifizieren.

Obgleich die große Mehrheit der PDAC aktivierende *KRAS*-Gen Mutationen aufweist, was auf eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges schließen lässt, zeigen wir im fortgeschrittenen Pankreaskarzinom eine heterogene Expression des dem MAPK-Signalweg nachgeschalteten Effektors phospho-ERK, was mit einer schlechteren Prognose von Erlotinib-behandelten Patienten einhergeht. Da Gemcitabine-basierte Chemotherapie in dieser klinischen Situation eine Standardtherapieoption darstellt, untersuchen wir die prognostische Bedeutung der Expression verschiedener Gewebebiomarker in Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, die entweder Gemcitabine- oder Fluoropyrimidin-basiert palliativ chemotherapiert wurden, was letztlich Rückschlüsse über die prädiktive Wertigkeit dieser Biomarker erlaubt. Da Gemcitabine hauptsächlich über das Membranprotein *human equilibrative nucleoside transporter 1* (hENT-1) in die Zelle aufgenommen wird, untersuchen wir retrospektiv die prädiktive Bedeutung der tumoralen hENT-1-

Expression mittels des monoklonalen Antikörpers SP120, wobei sich hier keine prädiktive Aussage über die Effizienz einer Gemcitabin-Therapie ergibt. Im Gegensatz dazu, zeigen wir, dass insbesondere in Gemcitabine-behandelten Patienten die Tumor-Expression des Proteins *secreted protein acidic and rich in cysteins* (SPARC) mit schlechter Prognose assoziiert ist, wohingegen ein Verlust der Expression des Proteins *mothers against decapentaplegic homolog 4* (SMAD4) in diesen Patienten mit besserem progressionsfreiem Überleben zusammenhängt.

Ein weiteres bedeutsames molekulares Therapieziel ist die Kinase *anaplastic lymphoma kinase* (ALK), insbesondere in Adenokarzinomen der Lunge mit ALK/EML4-Translokation, die sehr gut auf eine Therapie mit ALK-Inhibitoren ansprechen. Jedoch zeigen wir, dass ALK-Expression im PDAC ein sehr seltenes Ereignis ist, sodass ALK-Inhibitoren hier in nur sehr wenigen Patienten eine erfolgversprechende Therapieoption darstellen. Eine ähnliche Situation zeigen wir für Mutationen in den sog. „hotspot“-Bereichen des DNA-Polymerase-Epsilon-Gens (*POLE*), die in Endometriumkarzinomen und kolorektalen Karzinomen mit guter Prognose und - durch konsekutive hohe Mutationslast - mit einem möglichen Ansprechen auf eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren assoziiert sind. Da wir jedoch in PDAC keine *POLE* hotspot-Mutationen nachweisen können, spielen sie als möglicher prognostischer oder prädiktiver Biomarker hier keine Rolle.

In weiterführenden Studien zu Zell-Zell-Kontakt-Proteinen in resezierten Pankreaskarzinomen zeigen wir, dass Desmoglein 3 (DSG3) ausschließlich im Karzinom und nicht im Normalgewebe exprimiert wird und dass die DSG3-Expression signifikant mit schlechtem Überleben dieser Patienten assoziiert ist.

Unsere Ergebnisse zu verschiedenen Gewebsbiomarkern im Pankreaskarzinom zeigen in Zusammenschau mit der aktuellen Studienlage, dass spezifisch angreifbare molekulare Alterationen und biologische Eigenschaften einzelner Tumoren zwar selten auftreten, jedoch potentiell mit einer deutlichen Änderung der Prognose für den einzelnen Patienten einhergehen.

## **2. Einleitung**

Duktale Adenokarzinome des Pankreas (PDAC) entstehen aus Vorläuferläsionen des Gangepithels des exokrinen Pankreas durch Akkumulation verschiedener molekularer Alterationen. Ein weiterer, im Tiermodell gut belegter Weg der Entwicklung von PDAC geht von einer metaplastischen Differenzierungsänderung der azinären Drüsenzellen

des exokrinen Pankreas aus, der sog. Azinär-duktalen-Metaplasie [30]. Beiden Karzinogenesewegen liegen in der großen Mehrheit der Fälle onkogene Mutationen im *KRAS*-Gen zugrunde, die sich bereits in frühen dysplastischen Veränderungen, der sog. pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN) nachweisen lassen [25]. Im weiteren Verlauf des Fortschreitens von dysplastischen Veränderungen zum invasiven Karzinom kommt es zur Akkumulation weiterer molekularer Alterationen, darunter überproportional häufig Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *TP53*, *DPC4* (das für *SMAD4* kodiert) und *CDKN2A* (das für *p16INK4A* kodiert). Zusammen mit *KRAS*-Mutationen bilden Alterationen in diesen Genen die am häufigsten nachweisbaren molekularen Veränderungen in PDAC, weshalb sie auch als die vier „*major players*“ der pankreatischen Karzinogenese bezeichnet werden. Große Sequenzierstudien der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass es neben diesen vier charakteristischen Alterationen auch molekulare Veränderungen in zahlreichen anderen Genen gibt, die jedoch alle mit weit niedrigerer Prävalenz auftreten, sodass ein heterogenes molekulares Gesamtbild des Pankreaskarzinoms entsteht [61]. Auch nach Fortschritten in der chirurgischen Therapie und der Einführung neoadjuvanter Konzepte bleibt die Prognose von PDAC-Patienten schlecht. Das 5-Jahresüberleben liegt bei unter 8% [51]; das Langzeitüberleben mehr als 10 Jahre nach operativer Therapie wird mit 3,9% angegeben, mit einem Restrisiko von 10% pro Jahr für einen erkrankungsbedingten Tod [40]. Mit 55.400 diagnostizierten Fällen und 44.330 Todesfällen berechnet für das Jahr 2018 alleine in den USA, belegt das Pankreaskarzinom derzeit den 4. Platz krebserkrankungsbedingter Todesursachen in beiden Geschlechtern, mit weiter steigender Inzidenz und bislang ungeahnten sozioökonomischen Auswirkungen [43]. Nur etwa 20% aller Patienten kommen für eine operative Therapie in Betracht, während die Mehrheit der Patienten im lokal fortgeschrittenen, inoperablen oder bereits metastasierten Stadium diagnostiziert wird (Abb. 1) [27]. Auch wenn die Einführung standardmäßiger adjuvanter Chemotherapie nach Resektion einen deutlichen Überlebensvorteil, mit 5-Jahresüberlebensraten von bis zu 30% erreicht hat [36, 37], sind die Fortschritte in der metastasierten Situation bislang mäßig. Insbesondere die sogenannten *targeted therapies*, die in anderen Tumorentitäten zum onkologischen Standardrepertoire gehören, zeigten im PDAC keine oder nur minimale Wirkung im Vergleich zu konventionellen Chemotherapien [32, 39]. In dieser Patientengruppe, der letztlich im Laufe der Erkrankung nahezu alle Patienten angehören, gilt es die Therapie so effektiv wie möglich zu gestalten. Die

Untersuchung prognostischer und potentiell prädiktiver Biomarker kann hierbei einen wertvollen Beitrag leisten und evtl. die Identifikation therapeutisch nutzbarer Zielstrukturen im Sinn einer personalisierten Krebsmedizin (PCM) ermöglichen.

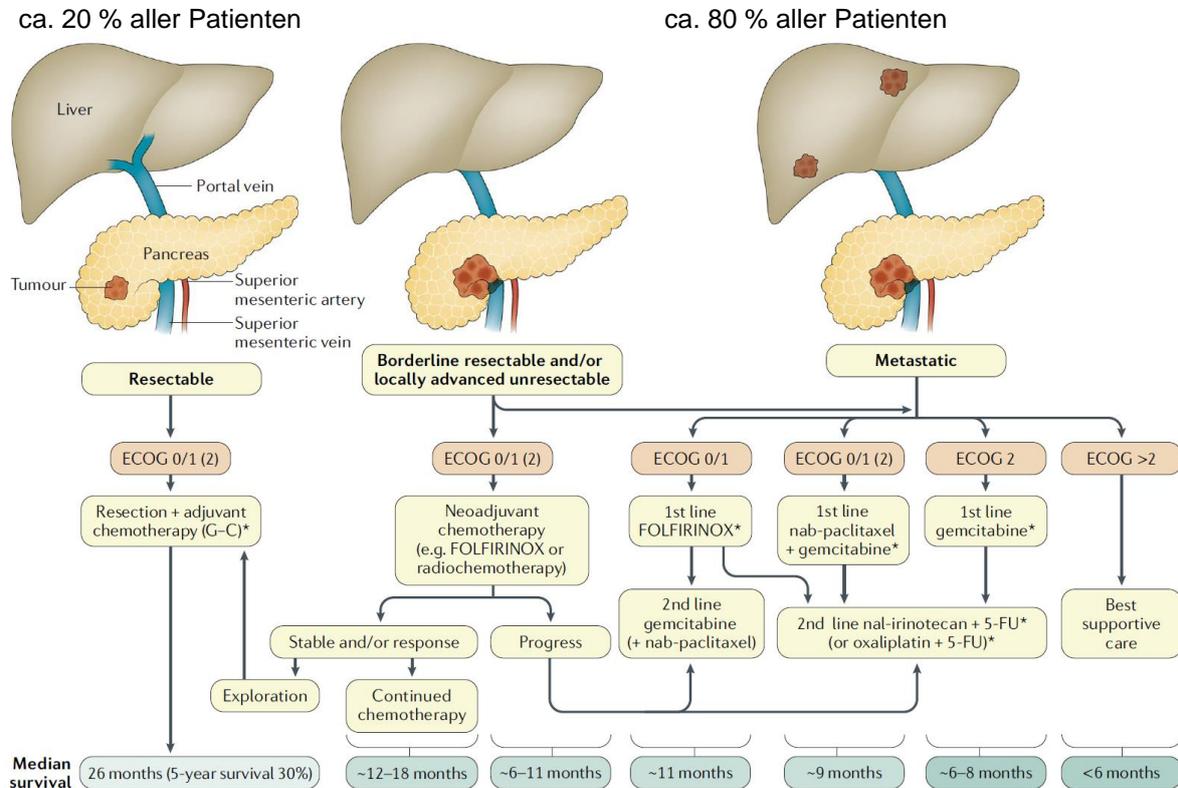


Abb.1: Schematische Darstellung der aktuellen therapeutischen Optionen in Abhängigkeit von der klinischen Ausgangslage sowie die assoziierten durchschnittlichen Überlebenszeiten. (modifiziert nach Neoptolemos et al, Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2018).

### 3. Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieses Habilitationsprojektes war es zu untersuchen, ob sich verschiedene Patientengruppen im fortgeschrittenen oder resezierten Pankreaskarzinom durch spezielle Eigenschaften ihrer Tumoren hinsichtlich einer prognostischen oder prädiktiven Relevanz charakterisieren lassen.

Im Speziellen wurden dazu folgende Fragestellungen angegangen:

1. Welche gewebebasierten Biomarker oder molekularen Alterationen im Tumor oder Tumorstroma haben eine prognostische Funktion, so dass bei bekannter spezifischer Therapie der Patienten eine mögliche Therapieprädiktion abgeleitet werden kann?
2. Gibt es bereits in anderen Tumorerkrankungen charakterisierte molekulare Therapieziele auch im Pankreaskarzinom?

3. Spielen in anderen Tumorerkrankungen etablierte prognostische Biomarker eine Rolle im Pankreaskarzinom und ermöglichen sie die Identifikation potentieller Therapieziele?

Um diese Fragestellungen zu bearbeiten wurden im Rahmen des Habilitationsprojektes Tumormaterial aus Patientenkollektiven mit gut dokumentiertem Verlauf einschließlich der tumorspezifischen Therapie untersucht und die Ausprägung bestimmter Tumormerkmale mit den klinisch-pathologischen Parametern der Patienten korreliert. Durch Untergruppen-Analyse lassen sich somit Rückschlüsse auf eine mögliche prädiktive Wertigkeit der analysierten Biomarker ziehen.

#### **4. Zusammenfassung und Diskussion themenbezogener eigener Arbeiten**

##### **4.1 pERK, pAKT and p53 as tissue biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: a translational subgroup analysis from AIO-PK0104**

Ormanns S, Siveke JT, Heinemann V, Haas M, Sipos B, Schlitter AM, Esposito I, Jung A, Laubender RP, Kruger S, Vehling-Kaiser U, Winkelmann C, Fischer von Weikersthal L, Clemens MR, Gauler TC, Märten A, Geissler M, Greten TF, Kirchner T, Boeck S. *BMC Cancer*. 2014 Aug 28;14:624. doi: 10.1186/1471-2407-14-624

Während der Einsatz molekular-zielgerichteter Therapien in Form von Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) inzwischen als Standardtherapie nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome (NSCLC) mit Nachweis einer aktivierenden Mutation im *epidermal growth factor receptor (EGFR)*-Gen etabliert ist [38], haben sich TKI im PDAC bislang als nur gering wirksam erwiesen, mit zwar statistisch signifikantem, aber minimalem Überlebensvorteil einer Gemcitabine-Erlotinib-Kombination ggü. einer Gemcitabine-Monotherapie [32]. Dabei blieb insbesondere die Rolle onkogener *KRAS*-Mutationen hinsichtlich einer Therapieprädiktion EGFR-zielgerichteter Substanzen, analog zum Dickdarmkarzinom, wo *KRAS*-Mutationen prädiktiv für eine EGFR-gerichtete Therapie sind, unklar. Zumindest ein negativer prognostischer Effekt einer onkogenen *KRAS*-Exon 2-Mutation wurde festgestellt [3]. Auch andere, in den EGFR-Signaltransduktionsweg involvierte Faktoren, wie bspw. EGFR-Proteinexpression, *EGFR*-Amplifikation oder PTEN-Expression erwiesen sich nicht als prädiktiv für

Erlotinib [4]. Zum damaligen Zeitpunkt gab es keinen validierten gewebebasierten Biomarker zur Therapiestratifizierung im fortgeschrittenen PDAC. Wir haben daher weitere dem EGFR nachgeschaltete (*downstream*) Faktoren im fortgeschrittenen PDAC untersucht und uns hierbei auf die durch Phosphorylierung aktivierten Formen der *Extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK) und der *Proteinkinase B* (AKT) konzentriert. Beide sind downstream-Elemente des EGF-Rezeptors; phospho-ERK (pERK) als Teil der *Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase-Kaskade* (MAPK) und phospho-AKT (pAKT) als Teil des *Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase / mammalian-Target of Rapamycin*-Signaltransduktionsweges (PI3K/mTOR) [47]. Zusätzlich haben wir den Tumorsuppressor p53 in unsere Untersuchungen miteinbezogen, da *TP53*-Mutationen sehr häufig im PDAC auftreten und Hinweise auf eine Interaktion mit *KRAS*-Mutationen vorlagen [28]. Mittels Immunhistochemie untersuchten wir die Expression von pERK, pAKT und p53 am Tumormaterial von Patienten, die in der AIO-PK0104-Studie behandelt wurden und analysierten einen möglichen statistischen Zusammenhang mit der Prognose der Patienten. Zusätzlich haben wir im Tumormaterial von sechs ausgewählten Patienten mit gutem Verlauf und von sechs Patienten mit schlechtem Verlauf die Exone 5 bis 8 des *TP53*-Gens sequenziert. Die pERK-Expression im Tumor konnte bei 153 Patienten untersucht werden, von denen bei dichotomer Auswertung 55 eine niedrige (pERK low) und 98 eine hohe pERK-Expression (pERK high) aufwiesen, was mit einem tendenziell schlechteren Gesamtüberleben (OS) assoziiert war (6,2 Monate im Vgl. zu 5,7 Monate OS, hazard ratio (HR) 1,29,  $p = 0,16$ ). Wir haben zusätzlich die Assoziation der pERK-Expression mit dem OS als kontinuierliche Variable analysiert und konnten dadurch einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Stärke der pERK-Expression und dem OS nachweisen (HR 1,06, 95% Konfidenzintervall (CI) 1,0-1,12,  $p = 0,05$ ). Die Expression von pAKT konnten wir in den Tumoren von 35 Patienten untersuchen, von denen 21 keine oder eine schwache pAKT-Expression und 14 eine starke pAKT-Expression aufwiesen, was jedoch nicht statistisch signifikant mit dem OS zusammenhing (HR 1,03,  $p=0,93$ ). Die p53-Expression konnte in den Tumoren von 50 Patienten untersucht werden. Hierbei wiesen die Tumoren von vier Patienten einen kompletten Verlust der p53-Expression auf, 20 zeigten normale, regulierte Expressionsmuster und 26 Patienten hatten p53-Überexpression in ihrem Tumorgewebe. Die Ausprägung der p53-Expression war nicht mit dem OS assoziiert ( $p=0,91$ ), jedoch ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem progressionsfreien Überleben (PFS) der Patienten (6,0

Monate ggü. 1,8 Monate, HR 0,24,  $p = 0,02$ ). Außerdem zeigten deutlich mehr Patienten einen Erlotinib-assoziierten Hautausschlag (sog. „rash“) sofern in ihrem Tumormaterial eine regulierte p53-Expression vorlag im Vgl. zu den Patienten, deren Tumoren einen kompletten p53-Expressionsverlust aufwiesen (84 % ggü. 25%). Alle Patienten mit einem PFS von über zehn Monaten wiesen keine Mutationen in den untersuchten Exonen des *TP53*-Gens auf. Lediglich von vier Patienten lagen Daten zu *TP53*-Mutation und p53-Expression vor. Wie erwartet zeigten hier aber die *TP53*-Wildtyp-Tumoren eine regulierte p53-Expression und die *TP53*-mutierten Tumoren eine p53-Überexpression.

In dieser Studie erwies sich pERK-Expression in Erlotinib-behandelten Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom als negativer prognostischer Biomarker für das Gesamtüberleben ab Beginn der palliativen Chemotherapie. Da alle untersuchten Patienten mit Erlotinib behandelt wurden, ist anhand der hier untersuchten Patientengruppe eine sichere Aussage über eine mögliche prädiktive Bedeutung von pERK hinsichtlich der Wirksamkeit einer Erlotinib-Therapie nicht möglich. Die fehlende Assoziation von pERK zum PFS oder dem Therapieansprechen deutet aber eher auf eine rein prognostische Funktion hin. Das Auftreten eines charakteristischen Hautausschlages, sog. „rash“, war bereits als prädiktiv für Erlotinib-Wirksamkeit beschrieben [32]. Interessanterweise ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen p53-Expression und dem PFS sowie dem Auftreten eines „rash“, sodass p53-Expression -als Surrogat-Marker einer *TP53*-Mutation- hier möglicherweise einen Prädiktor für Erlotinib-Wirksamkeit darstellt, obgleich die Daten aufgrund der geringen Patientenzahl ( $n=50$ ) mit Vorsicht zu interpretieren sind. In Zusammenschau dieser Ergebnisse mit z.T. aktuellen Daten sind Alterationen des MAPK-Signalweges, wie *KRAS*-Mutation oder pERK-Expression jedoch eher als prädiktiv für Erlotinib anzusehen [17, 26].

#### **4.2 Human equilibrative nucleoside transporter 1 is not predictive for gemcitabine efficacy in advanced pancreatic cancer: translational results from the AIO-PK0104 phase III study with the clone SP120 rabbit antibody**

Ormanns S, Heinemann V, Raponi M, Isaacson J, Laubender RP, Haas M, Kruger S, Kleespies A, Mann E, Bartosiewicz M, Kirchner T, Boeck S.

Der humane Nukleosid-Transporter hENT1 gilt als eines der hauptsächlich für die zelluläre Aufnahme von Nukleosiden verantwortliches Transmembranprotein [8]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass hENT-1-negative Pankreaskarzinomzelllinien resistenter ggü. dem Standardchemotherapeutikum Gemcitabine sind als hENT-1 positive Zelllinien [33, 34]. Zudem führte eine hENT-1 Überexpression in hENT-1-negativen Zelllinien zu gesteigerter Chemosensitivität ggü. Gemcitabine [41]. Diese Ergebnisse ließen auf eine prädiktive Relevanz der hENT-1-Expression für die Effizienz einer Gemcitabine-Therapie im PDAC schließen, was sich teilweise in überwiegend retrospektiven Studien an resezierten Pankreaskarzinompatienten in der adjuvanten Situation zeigen ließ [10, 54]. Einzig die LEAP-Studie (*low hENT-1 and adenocarcinoma of the pancreas*) befasste sich zum damaligen Zeitpunkt prospektiv mit hENT-1 als prädiktivem Marker in der metastasierten Situation, konnte jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zum Überleben Gemcitabine-behandelter PDAC Patienten nachweisen [42].

Wir haben die Expression von hENT-1 in einem Patientenkollektiv aus der AIO-PK0104-Studie untersucht, um eine mögliche Rolle von hENT-1 als Therapieprädiktor im fortgeschrittenen Pankreaskarzinom weiter zu charakterisieren. Von den initial 169 verfügbaren Patientenproben wurden letztlich nur 130 Proben, von denen neue Schnittpräparate hergestellt werden konnten, für die Analysen verwendet, da sich herausstellte, dass am ungefärbten archivierten Leerschnittmaterial die hENT-1 Färbung durchwegs schwächer und somit unzuverlässig ausfiel. In der AIO-PK0104-Studie wurden die Patienten auf zwei Gruppen randomisiert und entweder zuerst mit Gemcitabine und Erlotinib oder Capecitabine und Erlotinib behandelt wurden, gefolgt von Capecitabine oder Gemcitabine nach Progress (sog. cross-over-Design [18]). Da 29 der 130 Patienten lediglich Capecitabine und Erlotinib erhalten hatten, ohne in den folgenden Gemcitabine-Arm zu wechseln, wurden insgesamt 101 Patienten im Verlauf der Studie mit Gemcitabine behandelt. Von diesen Patienten zeigten 71 eine niedrige (hENT-1 low) und 30 eine hohe (hENT-1 high) hENT-1 Expression in ihrem Tumorgewebe, was jedoch nicht mit dem Gesamtüberleben assoziiert war ( $p=0.24$ ). In der Analyse der time-to-treatment-failure 1 (TTF1), also der Zeit bis zu Abbruch des ersten Therapieschemas, i.d.R. durch Progress der Erkrankung, zeigte sich darüber hinaus ein signifikant längeres TTF1 in der hENT1 low-Gruppe als in der hENT-1 high-

Gruppe unter Gemcitabine-Erlotinib-Therapie ( $p= 0.007$ ), sodass sich anhand dieser Studie hENT-1 Expression nicht als prädiktiver Marker einer Gemcitabine-basierten Therapie im fortgeschrittenen PDAC charakterisieren ließ.

In der Folge wurden jedoch weitere, z.T. umfangreiche Studien zu hENT-1 in der adjuvanten Situation veröffentlicht, die einen prädiktiven Effekt für Gemcitabine nachweisen konnten [14], was wiederum andere Autoren nicht bestätigten [53]. Auffällig war bis zu diesem Zeitpunkt, dass die Studien, die einen prädiktiven Effekt der hENT-1 Expression nachwiesen, mit einem nicht kommerziell erhältlichen proprietären monoklonalen murinen Antikörper (10D7G2) durchgeführt wurden, während die negativen Studien den kommerziell erhältlichen Antikörper SP120 (monoklonal Hase, Ventana Medical Systems) verwendeten. In der Tat zeigten vergleichende Untersuchungen in 2015, dass zwischen den Färbungen mit beiden Antikörpern nur 50% Konkordanz bestand und dass sich ein prädiktiver Effekt für eine adjuvante Gemcitabine-Therapie lediglich mit dem 10D7G2-Antikörper nachweisen ließ [57]. Da jedoch in 2017 eine ähnliche Studie an 227 Patienten sowohl für Färbungen mit dem 10D7G2- als auch mit dem SP120-Antikörper einen prädiktiven Effekt für eine adjuvante Gemcitabine-Therapie nachweisen konnte [24], bleibt die Bedeutung von hENT-1 in der Therapieprädiktion, v.a. für fortgeschrittene Pankreaskarzinompatienten, derzeit unklar.

#### **4.3 Impact of SPARC expression on outcome in patients with advanced pancreatic cancer not receiving nab-paclitaxel: A pooled analysis from prospective clinical and translational trials**

Ormanns S, Haas M, Baechmann S, Altendorf-Hofmann A, Remold A, Quietzsch D, Clemens M, Bentz M, Geissler M, Lambertz H, Kruger S, Kirchner T, Heinemann V, Boeck S.

*Br J Cancer. 2016 Nov 1. doi: 10.1038/bjc.2016.355*

Pankreaskarzinome weisen häufig ein sehr dichtes desmoplastisches Stroma auf, das nicht nur im Primärtumor sondern auch in den Metastasenorganen von den Tumorzellen induziert wird und u.a. für die Chemotherapieresistenz und Progression von Pankreaskarzinomen verantwortlich gemacht wird [59]. Dieses Stroma besteht aus unterschiedlichen Zelltypen wie Fibroblasten und Zellen des Immunsystems, aber

auch azellulären Elementen, bspw. den Proteinen der extrazellulären Matrix [29]. Eines dieser Proteine ist *secreted acidic and rich in cysteins* (SPARC, auch bekannt als Osteonectin, ON-1), das häufig im desmoplastischen peritumoralen Stroma von PDAC nachgewiesen werden kann [16]. SPARC war in der Vergangenheit Gegenstand zahlreicher Studien im PDAC: Initial als negativer Prognosemarker im resezierten PDAC beschrieben [23], wurde später postuliert dass SPARC, aufgrund seiner Fähigkeit Albumin zu binden als möglicher Rezeptor für das damals neue Chemotherapeutikum *nanoparticle-albumin-bound-Paclitaxel* (nab-Paclitaxel) fungiert, sodass SPARC ein positiver Prädiktor für die Wirksamkeit einer nab-Paclitaxel-basierten Chemotherapie darstellt [60]. In der Tat zeigten PDAC-Tiermodelle unter nab-Paclitaxel-Behandlung eine deutliche Stromareduktion und ein verbessertes Gesamtüberleben der Tiere [60], obgleich andere Studien einen SPARC-unabhängigen Effekt der nab-Paclitaxel-Therapie im Tiermodell nachwiesen [35]. Multizentrische klinische Studien zeigten letztlich die Überlegenheit einer nab-Paclitaxel-Gemcitabin-Kombinationstherapie über eine Gemcitabin-Monotherapie, unabhängig von der SPARC-Expression im peritumoralen Stroma [20, 58]. Wir haben die SPARC-Expression im Tumormaterial von 134 palliativ konventionell (d.h. ohne nab-Paclitaxel) chemotherapierter Patienten mit fortgeschrittenem PDAC mittels Immunhistochemie charakterisiert und eine Assoziation zu den klinisch-pathologischen Parametern der Patienten überprüft. Dabei haben wir sowohl die SPARC-Expression im peritumoralen Stroma, als auch in den Tumorzellen selbst untersucht. Die Mehrheit der Tumoren (67%) zeigte dabei eine kräftige SPARC-Expression im Tumorstroma, was jedoch nicht statistisch signifikant mit dem Gesamtüberleben ab Beginn der palliativen Chemotherapie assoziiert war ( $p=0,316$ ). Dagegen wiesen 55% der Tumoren eine zytoplasmatische SPARC-Expression auf, was statistisch signifikant mit einem verminderten progressionsfreien Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) einherging ( $p=0,004$  bzw.  $p=0,032$ ) und insbesondere in den Patienten deutlich wurde, von denen wir Primärtumormaterial untersuchten (PFS  $p=0,004$ , OS  $p=0,030$ ) und in denjenigen, die mittels Gemcitabin-basierter Chemotherapie behandelt wurden (PFS  $p=0,002$ , OS  $p=0,012$ ). Diese Ergebnisse bestätigten wir durch multivariate Analysen. Abschließend konnten wir in dieser Arbeit zytoplasmatische SPARC-Expression als negativen Prognosefaktor für PFS und OS in Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, die palliativ chemotherapiert wurden, identifizieren, während sich kein statistischer Zusammenhang zwischen

SPARC-Expression im peritumoralen Stroma und dem PFS oder OS ergab. Da der Effekt der zytoplasmatischen SPARC-Expression in der Untergruppe Gemcitabin-basiert therapierter Patienten am größten war, könnte zytoplasmatische SPARC-Expression ein negativer Prädiktor für die Wirksamkeit einer Gemcitabin-Therapie in dieser Patientengruppe sein.

#### **4.4 The impact of SMAD4 loss on outcome in patients with advanced pancreatic cancer treated with systemic chemotherapy**

Ormanns S, Haas M, Remold A, Kruger S, Holdenrieder S, Kirchner T, Heinemann V, Boeck S

*Int J Mol Sci.* 2017 May 19;18(5). pii: E1094. doi: 10.3390/ijms18051094

Das Tumorsuppressorprotein *mothers against decapentaplegic homolog 4* (SMAD4), auch bekannt als *deleted in pancreatic cancer 4* (DPC4) wurde im Pankreas als zentraler Regulator von Zellproliferation und Apoptose mittels des transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) – Signaltransduktionsweges beschrieben [64]. Ungefähr 50% aller PDAC weisen einen Verlust von SMAD4 auf, was mit schlechterer Prognose und mit dem Muster des Auftretens von Rezidiven bzw. Fernmetastasen assoziiert wurde [7, 22]. Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung eines Expressionsverlustes von SMAD4 ist die Studienlage uneinheitlich: Mehrere Studien konnten einen negativen prognostischen Effekt zeigen [50, 65], während andere weder einen Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben, noch mit dem Muster des Auftretens von Rezidiven nachwiesen [63]. Darüber hinaus wurde die große Mehrheit dieser Studien an der Gruppe der resezierten Patienten durchgeführt, die aber nur ca. 20% der Patienten mit PDAC ausmachen. Wir haben in dieser Studie die SMAD4-Expression am Tumormaterial von 143 Patienten mit metastasiertem (n=128) oder lokal fortgeschrittenem PDAC (n=15) aus abgeschlossenen multizentrischen Chemotherapiestudien und Biomarkerstudien mittels Immunhistochemie untersucht und eine mögliche Assoziation zu den klinisch-pathologischen Parametern der Patienten analysiert. Die Mehrheit der Tumorproben (64%) zeigte dabei einen Expressionsverlust von SMAD4, was nicht mit den klinisch-pathologischen Eigenschaften der Patienten assoziiert war. Erstaunlicherweise bestand ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen SMAD4-Verlust und einem verlängerten progressionsfreien Überleben (PFS, hazard ratio 1,565, p=0,038) und erwies sich in

der Untergruppe der Gemcitabin-behandelten Patienten in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse sogar als unabhängiger Prognosemarker für ein längeres PFS (hazard ratio 1,790,  $p=0,040$ ). SMAD4-Verlust ist also im fortgeschrittenen PDAC nicht als negativer Prognosemarker zu betrachten und könnte möglicherweise sogar als prädiktiv für die Wirksamkeit einer palliativen Gemcitabin-basierten Chemotherapie interpretiert werden.

#### **4.5 ALK expression is absent in pancreatic ductal adenocarcinoma**

Ormanns S, Assmann G, Reu S, Gallmeier E, Bader DC, Kleespies A, Haas M, Kruger S, Heinemann V, Kirchner T, Boeck S.

*J Cancer Res Clin Oncol.* 2014 Sep;140(9):1625-8. doi: 10.1007/s00432-014-1774-4

Die Anaplastische Lymphom Kinase (ALK) ist eine Tyrosinkinase, die in verschiedenen Malignomen exprimiert wird und als Therapieziel von ALK-Inhibitoren, beschrieben wurde [13]. Insbesondere im nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) liegen Rearrangements des ALK-Gens, mit dem Gen *Echinoderm microtubule-associated protein-like 4* (ALK/EML4) in bis zu 10% aller Fälle vor [15] und ALK-zielgerichtete Therapien sind einer konventionellen Chemotherapie in ALK-positiven NSCLC deutlich überlegen [48, 49]. Goldstandard in der Detektion von ALK-Rearrangements ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Da ALK-Expression außer in Nervengewebe und embryonalem Gewebe nicht physiologisch auftritt, hat sich ein zweistufiges Testverfahren einer ALK-Immunhistochemie als Screeningtest, gefolgt von einer bestätigenden FISH im positiven Fall etabliert [46]. Aufgrund der generell schlechten Prognose von Pankreaskarzinompatienten, könnte ALK-Inhibition ein vielversprechender Therapieansatz im PDAC sein. Daher haben wir die ALK-Expression im Tumorgewebe in einem Kollektiv von 99 resezierten Pankreaskarzinompatienten mittels etablierter und am NSCLC validierter IHC auf einem tissue microarray (TMA) untersucht. Hierbei ließ sich in nahezu allen Fällen keine ALK-Expression nachweisen. In fünf schwach positiven Fällen auf dem TMA wurden die Färbungen am Flächenschnitt wiederholt, ohne hier ALK-Expression zu detektieren. Wir gingen daher davon aus, dass ALK kein relevantes Therapieziel im PDAC darstellt. In der Folge wurden Ergebnisse einer großen Studie an 3170 Pankreaskarzinomen publiziert, von denen 5 Fälle (0.16%) ALK-Rearrangements mit ALK-Überexpression in der Immunhistochemie und ein wildtypisches *KRAS*-Gen

aufwiesen. Drei dieser Patienten reagierten gut auf den ALK-Inhibitor Crizotinib [52]. Abschließend sind ALK-Rearrangements sehr seltene Ereignisse in Pankreaskarzinomen, die in jüngeren Patienten mit *KRAS*-Wildtyp-Tumoren auftreten, jedoch ebenso wie im Lungenkarzinom eine ALK-zielgerichtete Therapie ermöglichen.

#### **4.6 POLE gene hotspot mutations in advanced pancreatic cancer**

Guenther M, Veninga V, Kumbrink J, Haas M, Westphalen CB, Kruger S, Heinemann V, Kirchner T, Boeck S, Jung A, Ormanns S

*J Cancer Res Clin Oncol.* 2018 Nov;144(11):2161-2166. doi: 10.1007/s00432-018-2746-x.

DNA-Polymerase  $\epsilon$  (POLE) ist neben DNA-Polymerase  $\delta$  und DNA-Polymerase  $\alpha$  eine der drei wichtigsten DNA-Polymerasen, die in Eukaryonten die DNA replizieren. Dabei ist sie nicht nur für die Replikation der DNA notwendig, sondern übt über ihre 3'-5'-Exonuklease-Aktivität auch ein sog. „proofreading“ aus, ist also verantwortlich für Fehlerkorrektur und somit für genomische Stabilität [19]. Mutationen in der Exonuklease Domäne des *POLE*-Gens treten häufig in humanen Krebserkrankungen auf, in denen sie mit einem sog. Hypermutator-Phänotyp assoziiert sind, da durch *POLE*-Defekte stark vermehrt Mutationen anfallen. Dabei treten funktionell relevante *POLE*-Mutationen in zwei *hotspot* Regionen des *POLE*-Gens, im Exon 9 (P286R/H) und im Exon 13 (V411L/R/M) auf [44], deren Prävalenz in Endometriumkarzinomen (EC), mit bis zu 12% aller Fälle am größten ist [6, 55]. EC mit *POLE*-Mutationen sind mikrosatellitenstabil, zeigen ein prominentes lymphozytäres Infiltrat mit hochregulierten immunsuppressiven Molekülen wie PD1, PDL1 und CTLA4 und weisen eine insgesamt bessere Prognose auf [6]. Sowohl in EC als auch in kolorektalen Karzinomen, in denen *POLE*-Mutationen in ca 1% der Fälle auftreten, könnte ihr Nachweis ein positiver Prädiktor für die Wirksamkeit einer Immun-Checkpoint-Inhibitor-basierten Therapie sein [9]. Da sich *POLE*-hotspot Mutationen leicht durch Pyrosequenzierung aus FFPE-Material untersuchen lassen, haben wir ihre Prävalenz in einer Kohorte aus 115 Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom analysiert und zusätzlich öffentlich zugängliche Sequenzier-Datenbanken mittels der Online-Plattform cbiportal.org untersucht. Sechzig der untersuchten Patienten stammten aus der AIO-PK0104-Studie [18] und 55 Patienten aus abgeschlossenen retrospektiven Biomarker-Studien [17]. Siebenunddreißig EC Fälle wurden als

potentielle Positivkontrollen ebenfalls untersucht, von denen vier eine Exon 9 - Mutation zeigten (10,8%), jedoch keine Exon 13 - Mutation. Daher haben wir ein kurzes DNA-Fragment als Positivkontrolle für die Exon 13 - Mutation mittels *site-directed*-Mutagenese-PCR erzeugt und in den Sequenzierläufen eingesetzt. In keinem der 115 untersuchten Pankreaskarzinome wurde eine *POLE*-hotspot-Mutation nachgewiesen. Von den 741 zur Verfügung stehenden Proben bei cbiportal.org wurden insgesamt 16 *POLE*-Mutationen in neun Patienten gefunden. Jedoch zeigte nur ein Patient eine P286R-hotspot-Mutation, während die anderen Mutationen als benigne oder unklar eingestuft wurden. Interessanterweise wies der Patient mit der P286R-Mutation eine massiv erhöhte Mutationslast, mit über 14.000 nachgewiesenen Mutationen auf, wohingegen die anderen Patienten mit *POLE*-Mutationen hier nur bis zu 107 Mutationen zeigten. Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass *POLE*-hotspot-Mutationen zwar als potentieller Prädiktor für die Wirksamkeit einer Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie fungieren aber aufgrund der sehr geringen Prävalenz in Pankreaskarzinomen in dieser Tumorentität nicht routinemäßig getestet werden sollten.

#### **4.7 Desmogleins as prognostic biomarkers in resected pancreatic ductal adenocarcinoma**

Ormanns S, Altendorf-Hofmann A, Jackstadt R, Horst D, Assmann G, Zhao Y, Bruns C, Kirchner T, Knösel T.

*Br J Cancer.* 2015 Nov 17;113(10):1460-6. doi: 10.1038/bjc.2015.362

Desmogleine sind Glykoproteine, die eine zentrale Rolle in desmosomalen Verbindungen benachbarter Zellen ausüben. Daher werden sie besonders stark in epithelialen Geweben exprimiert, die mechanischen oder physischen Belastungen ausgesetzt sind, wie bspw. Plattenepithelien der Haut, des Mund- und Rachenraumes aber auch des Gastrointestinaltraktes [21]. Desmogleine haben neben ihrer mechanischen Funktion dabei auch weitere biologische Funktionen. So sind sie bspw. in die Prozesse onkogener Signaltransduktionswege involviert [5, 31]. Die klinische Bedeutung von Desmogleinen ist aus nicht-neoplastischen Erkrankungen bekannt; so ist bspw. Desmoglein 3 (DSG3) das Autoantigen der blasenbildenden Dermatose Pemphigus vulgaris [2]. Auch in neoplastischen Prozessen ist eine Funktion von

Desmogleinen belegt, wobei überwiegend eine abnorme Expression von Desmoglein 2 (DSG2) und DSG3 in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus, des Kopf-Hals-Bereiches und der Lunge beschrieben wurde [12, 62]. DSG3 gilt zudem als sensitiver Marker für Lymphknotenmetastasierung in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches [11]. Trotz ihrer offensichtlichen Bedeutung in verschiedenen epithelialen Neoplasien, war die Expression von Desmogleinen bislang nicht in PDAC untersucht worden. Wir haben daher ein Kollektiv 165 R0-resezierter Pankreaskarzinome immunhistochemisch mittels *tissue microarray* (TMA) auf Expression der Desmogleine 1 (DSG1), DSG2 und DSG3 untersucht und eine mögliche Assoziation der Expression dieser Biomarker mit den klinisch-pathologischen Parametern der Patienten analysiert. Darüber hinaus haben wir exemplarisch Vollflächenschnitte ausgewählter Tumoren und von normalem Pankreasparenchym untersucht um mögliche Expressionsunterschiede zwischen Tumorzentrum und Tumorrand, sowie das Expressionsmuster der untersuchten Biomarker im Normalgewebe darzustellen. Ergänzend wurden bereits veröffentlichte und frei verfügbare Expressionsdatenbanken verschiedener Patientenkollektive [1, 45, 56] analysiert. Dabei konnten wir zeigen, dass DSG1 und DSG2 sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe exprimiert wird, während DSG3-Expression, die in 36% aller untersuchten Tumoren auftrat, auf den Tumor beschränkt ist. Für DSG1 und DSG2 ergab sich kein statistischer Zusammenhang mit der Prognose der Patienten, wohingegen DSG3-Expression signifikant mit einem verkürzten Gesamtüberleben nach Resektion einherging. Diese Ergebnisse wurden in den untersuchten Expressionsdatenbanken deutlich bestätigt. Da DSG3-Expression jedoch auch mit einem niedrigen Differenzierungsgrad der Tumoren assoziiert war, erwies sie sich in multivariaten Analysen nicht als unabhängiger Prognosefaktor.

In dieser Studie haben wir DSG3 als negativen prognostischen Biomarker resezierter Pankreaskarzinompatienten charakterisiert. Die Tatsache, dass DSG3-Expression ausschließlich im Tumorgewebe und nicht im Normalgewebe auftritt, macht DSG3 sowohl diagnostisch als auch therapeutisch interessant. DSG3 selbst oder die Signaltransduktionsnetzwerke in die es involviert ist, könnten therapeutische Zielstrukturen in Tumoren mit hoher DSG3-Expression darstellen. Erste, zwischenzeitlich durchgeführte *in vitro*-Experimente an DSG3-exprimierenden Pankreaskarzinomzelllinien sind positiv verlaufen, sodass eine weitere

Charakterisierung der DSG3-Funktionen im PDAC ein vielversprechender Ansatz zu sein scheint.

## 5. Ausblick

Im Rahmen des Habilitationsprojektes konnte gezeigt werden, dass insbesondere eine Aktivierung des MAPK-Signalweges, aber auch die Expression vormals als rein stromal beschriebener Proteine im Tumor selbst mit einer schlechten Prognose im fortgeschrittenen Pankreaskarzinom assoziiert sind. Potentielle Therapieprädictoren oder aus anderen Tumorerkrankungen bekannte molekulare Therapieziele erwiesen sich z.T. aufgrund sehr niedriger Prävalenz als nicht relevant. Mit geeigneten Studienkollektiven, die ausreichend große Gruppen unterschiedlich therapierter Patienten beinhalten, sollen in Zukunft weiter potentiell prädictive Gewebsbiomarker charakterisiert werden. Hierbei soll auch zunehmend auf den Einsatz von Hochdurchsatzmethoden, wie dem *next generation sequencing* zurückgegriffen werden.

Die Entdeckung, dass desmosomale Proteine, die bislang hauptsächlich an Plattenepithelkarzinomen untersucht wurden, auch im Pankreaskarzinom eine bedeutende prognostische Rolle spielen, macht diese Proteine für weitere Untersuchungen interessant. Erste funktionelle Ergebnisse zellkulturbasierter Experimente liegen diesbezüglich vor, so dass eine weitere Charakterisierung sowohl durch deskriptive *in situ*-Analysen, als auch durch experimentelle Untersuchungen vielversprechend erscheint.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aguirre-Gamboa, R., et al., *SurvExpress: an online biomarker validation tool and database for cancer gene expression data using survival analysis*. PloS one, 2013. **8**(9): p. e74250.
2. Amagai, M., et al., *Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice*. The Journal of clinical investigation, 1998. **102**(4): p. 775-782.
3. Boeck, S., et al., *KRAS mutation status is not predictive for objective response to anti-EGFR treatment with erlotinib in patients with advanced pancreatic cancer*. Journal of Gastroenterology, 2013. **48**(4): p. 544-548.

4. Boeck, S., et al., *EGFR pathway biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: translational results from the randomised, crossover phase 3 trial AIO-PK0104*. British journal of cancer, 2013. **108**(2): p. 469.
5. Chidgey, M. and C. Dawson, *Desmosomes: a role in cancer?* British journal of cancer, 2007. **96**(12): p. 1783.
6. Church, D.N., et al., *Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2015. **107**(1).
7. Crane, C.H., et al., *Phase II trial of cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin followed by chemoradiation with cetuximab for locally advanced (T4) pancreatic adenocarcinoma: correlation of Smad4 (Dpc4) immunostaining with pattern of disease progression*. Journal of Clinical Oncology, 2011. **29**(22): p. 3037-3043.
8. Damaraju, V.L., et al., *Nucleoside anticancer drugs: the role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7524.
9. Domingo, E., et al., *Somatic POLE proofreading domain mutation, immune response, and prognosis in colorectal cancer: a retrospective, pooled biomarker study*. The Lancet Gastroenterology & Hepatology, 2016. **1**(3): p. 207-216.
10. Farrell, J.J., et al., *Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer*. Gastroenterology, 2009. **136**(1): p. 187-195.
11. Ferris, R.L., et al., *Intraoperative qRT-PCR for detection of lymph node metastasis in head and neck cancer*. Clinical Cancer Research, 2011: p. clincanres. 3110.2010.
12. Fukuoka, J., et al., *Desmoglein 3 as a prognostic factor in lung cancer*. Human pathology, 2007. **38**(2): p. 276-283.
13. Grande, E., M.-V. Bolós, and E. Arriola, *Targeting oncogenic ALK: a promising strategy for cancer treatment*. Molecular cancer therapeutics, 2011. **10**(4): p. 569-579.
14. Greenhalf, W., et al., *Pancreatic cancer hENT1 expression and survival from gemcitabine in patients from the ESPAC-3 trial*. Journal of the National Cancer Institute, 2013. **106**(1): p. djt347.
15. Gridelli, C., et al., *ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC*. Cancer treatment reviews, 2014. **40**(2): p. 300-306.
16. Guweidhi, A., et al., *Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells*. Annals of surgery, 2005. **242**(2): p. 224.
17. Haas, M., et al., *Extended RAS analysis and correlation with overall survival in advanced pancreatic cancer*. British journal of cancer, 2017. **116**(11): p. 1462.
18. Heinemann, V., et al., *Gemcitabine plus erlotinib followed by capecitabine versus capecitabine plus erlotinib followed by gemcitabine in advanced pancreatic cancer: final results of a randomised phase 3 trial of the 'Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie' (AIO-PK0104)*. Gut, 2012: p. gutjnl-2012-302759.
19. Henninger, E.E. and Z.F. Pursell, *DNA polymerase  $\epsilon$  and its roles in genome stability*. IUBMB life, 2014. **66**(5): p. 339-351.
20. Hidalgo, M., et al., *SPARC expression did not predict efficacy of nab-paclitaxel plus gemcitabine or gemcitabine alone for metastatic pancreatic cancer in an exploratory analysis of the phase III MPACT trial*. Clinical Cancer Research, 2015: p. clincanres. 3222.2014.
21. Holthöfer, B., et al., *Structure and function of desmosomes*. International review of cytology, 2007. **264**: p. 65-163.
22. Iacobuzio-Donahue, C.A., et al., *DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(11): p. 1806-1813.
23. Infante, J.R., et al., *Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **25**(3): p. 319-325.
24. Kalloger, S.E., et al., *A predictive analysis of the SP120 and 10D7G2 antibodies for human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) in pancreatic ductal adenocarcinoma treated with adjuvant gemcitabine*. The Journal of Pathology: Clinical Research, 2017. **3**(3): p. 179-190.

25. Kanda, M., et al., *Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia*. *Gastroenterology*, 2012. **142**(4): p. 730-733. e9.
26. Kim, S.T., et al., *Impact of KRAS mutations on clinical outcomes in pancreatic cancer patients treated with first-line gemcitabine-based chemotherapy*. *Molecular cancer therapeutics*, 2011: p. molcanther. 0269.2011.
27. Kleeff, J., et al., *Pancreatic cancer*. *Nature reviews Disease primers*, 2016. **2**: p. 16022.
28. Liang, W.S., et al., *Genome-wide characterization of pancreatic adenocarcinoma patients using next generation sequencing*. *PloS one*, 2012. **7**(10): p. e43192.
29. Mahadevan, D. and D.D. Von Hoff, *Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Molecular cancer therapeutics*, 2007. **6**(4): p. 1186-1197.
30. Makohon-Moore, A. and C.A. Iacobuzio-Donahue, *Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective*. *Nature reviews Cancer*, 2016. **16**(9): p. 553.
31. Mannan, T., et al., *RNAi-mediated inhibition of the desmosomal cadherin (desmoglein 3) impairs epithelial cell proliferation*. *Cell proliferation*, 2011. **44**(4): p. 301-310.
32. Moore, M.J., et al., *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. *Journal of clinical oncology*, 2007. **25**(15): p. 1960-1966.
33. Mori, R., et al., *Human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with the chemosensitivity of gemcitabine in human pancreatic adenocarcinoma and biliary tract carcinoma cells*. *Oncology reports*, 2007. **17**(5): p. 1201-1205.
34. Nakano, Y., et al., *Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells*. *British Journal Of Cancer*, 2007. **96**: p. 457.
35. Neesse, A., et al., *SPARC independent drug delivery and antitumour effects of nab-paclitaxel in genetically engineered mice*. *Gut*, 2014. **63**(6): p. 974-983.
36. Neoptolemos, J.P., et al., *Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial*. *The Lancet*, 2017. **389**(10073): p. 1011-1024.
37. Oettle, H., et al., *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial*. *Jama*, 2013. **310**(14): p. 1473-1481.
38. Osmani, L., et al. *Current WHO Guidelines and the Critical Role of Immunohistochemical Markers in the Subclassification of Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC). Moving from Targeted Therapy to Immunotherapy*. in *Seminars in cancer biology*. 2017. Elsevier.
39. Ottaiano, A., et al., *Gemcitabine mono-therapy versus gemcitabine plus targeted therapy in advanced pancreatic cancer: a meta-analysis of randomized phase III trials*. *Acta Oncologica*, 2017. **56**(3): p. 377-383.
40. Paniccia, A., et al., *Characteristics of 10-Year Survivors of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *JAMA Surg*, 2015. **150**(8): p. 701-10.
41. Pérez-Torras, S., et al., *Adenoviral-mediated overexpression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) enhances gemcitabine response in human pancreatic cancer*. *Biochemical pharmacology*, 2008. **76**(3): p. 322-329.
42. Poplin, E., et al., *Randomized, multicenter, phase II study of CO-101 versus gemcitabine in patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: including a prospective evaluation of the role of hENT1 in gemcitabine or CO-101 sensitivity*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(35): p. 4453-61.
43. Rahib, L., et al., *Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States*. *Cancer Res*, 2014. **74**(11): p. 2913-21.
44. Rayner, E., et al., *A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2016. **16**(2): p. 71.

45. Rhodes, D.R., et al., *Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles*. Neoplasia, 2007. **9**(2): p. 166-180.
46. Selinger, C.I., et al., *Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: a multicenter comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization*. Modern pathology, 2013. **26**(12): p. 1545.
47. Seshacharyulu, P., et al., *Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy*. Expert opinion on therapeutic targets, 2012. **16**(1): p. 15-31.
48. Shaw, A.T., et al., *Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(13): p. 1189-1197.
49. Shaw, A.T., et al., *Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced ALK-Positive Lung Cancer*. New England Journal of Medicine, 2013. **368**(25): p. 2385-2394.
50. Shin, S., et al., *The DPC4/SMAD4 genetic status determines recurrence patterns and treatment outcomes in resected pancreatic ductal adenocarcinoma: A prospective cohort study*. Oncotarget, 2017.
51. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2018*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(1): p. 7-30.
52. Singhi, A.D., et al., *Identification of targetable ALK rearrangements in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 2017. **15**(5): p. 555-562.
53. Sinn, M., et al., *Human equilibrative nucleoside transporter 1 expression analysed by the clone SP 120 rabbit antibody is not predictive in patients with pancreatic cancer treated with adjuvant gemcitabine—results from the CONKO-001 trial*. European journal of cancer, 2015. **51**(12): p. 1546-1554.
54. Spratlin, J., et al., *The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma*. Clinical Cancer Research, 2004. **10**(20): p. 6956-6961.
55. Stelloo, E., et al., *Refining prognosis and identifying targetable pathways for high-risk endometrial cancer; a TransPORTEC initiative*. Modern pathology, 2015. **28**(6): p. 836.
56. Stratford, J.K., et al., *A six-gene signature predicts survival of patients with localized pancreatic ductal adenocarcinoma*. PLoS medicine, 2010. **7**(7): p. e1000307.
57. Svrcek, M., et al., *Human equilibrative nucleoside transporter 1 testing in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparison between murine and rabbit antibodies*. Histopathology, 2015. **66**(3): p. 457-462.
58. Von Hoff, D.D., et al., *Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(18): p. 1691-1703.
59. Von Hoff, D.D., R. Korn, and S. Mousses, *Pancreatic cancer—could it be that simple? A different context of vulnerability*. Cancer cell, 2009. **16**(1): p. 7-8.
60. Von Hoff, D.D., et al., *Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial*. Journal of Clinical Oncology, 2011. **29**(34): p. 4548.
61. Waddell, N., et al., *Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer*. Nature, 2015. **518**(7540): p. 495.
62. Wang, L., et al., *Altered expression of desmocollin 3, desmoglein 3, and  $\beta$ -catenin in oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and cell proliferation*. Virchows Archiv, 2007. **451**(5): p. 959-966.
63. Winter, J.M., et al., *Failure patterns in resected pancreas adenocarcinoma: lack of predicted benefit to SMAD4 expression*. Annals of surgery, 2013. **258**(2): p. 331.
64. Xia, X., et al., *SMAD4 and its role in pancreatic cancer*. Tumor Biology, 2015. **36**(1): p. 111-119.
65. Yamada, S., et al., *SMAD4 expression predicts local spread and treatment failure in resected pancreatic cancer*. Pancreas, 2015. **44**(4): p. 660-664.

## 7. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinen klinischen Kooperationspartnern aus der AG Onkologie der Medizinischen Klinik III / Comprehensive Cancer Center am Klinikum der Universität München bedanken, ohne die die Durchführung dieser Studien nicht möglich gewesen wäre. Großer Dank gebührt zudem Herrn Professor Dr. Thomas Kirchner, der mich während meiner Ausbildung zum Pathologen auch in wissenschaftlichen Belangen unterstützt hat. Danke auch an alle an diesen Projekten beteiligten technischen Assistentinnen und Assistenten unserer Standorte Großhadern und Innenstadt. Da die meisten dieser Projekte auf immunhistochemischen Färbungen beruhen, wären sie ohne ihre Hilfe nicht durchführbar gewesen.

## 8. Originalarbeiten

- 1. pERK, pAKT and p53 as tissue biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: a translational subgroup analysis from AIO-PK0104.**  
**Ormanns S,** Siveke JT, Heinemann V, Haas M, Sipos B, Schlitter AM, Esposito I, Jung A, Laubender RP, Kruger S, Vehling-Kaiser U, Winkelmann C, Fischer von Weikersthal L, Clemens MR, Gauler TC, Märten A, Geissler M, Greten TF, Kirchner T, Boeck S.  
*BMC Cancer. 2014 Aug 28;14:624.*  
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-624>
- 2. Human equilibrative nucleoside transporter 1 is not predictive for gemcitabine efficacy in advanced pancreatic cancer: translational results from the AIO-PK0104 phase III study with the clone SP120 rabbit antibody.**  
**Ormanns S,** Heinemann V, Raponi M, Isaacson J, Laubender RP, Haas M, Kruger S, Kleespies A, Mann E, Bartosiewicz M, Kirchner T, Boeck S.  
*Eur J Cancer. 2014 Jul;50(11):1891-9.*  
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.04.023>
- 3. Impact of SPARC expression on outcome in patients with advanced pancreatic cancer not receiving nab-paclitaxel: A pooled analysis from prospective clinical and translational trials**  
**Ormanns S,** Haas M, Baechmann S, Altendorf-Hofmann A, Remold A, Quietzsch D, Clemens M, Bentz M, Geissler M, Lambertz H, Kruger S, Kirchner T, Heinemann V, Boeck S.  
*Br J Cancer. 2016 Nov 1*  
<https://doi.org/10.1038/bjc.2016.355>
- 4. The impact of SMAD4 loss on outcome in patients with advanced pancreatic cancer treated with systemic chemotherapy**  
**Ormanns S,** Haas M, Remold A, Kruger S, Holdenrieder S, Kirchner T, Heinemann V, Boeck S  
*Int J Mol Sci. 2017 May 19;18(5). pii: E1094.*  
<https://doi.org/10.3390/ijms18051094>
- 5. ALK expression is absent in pancreatic ductal adenocarcinoma.**  
**Ormanns S,** Assmann G, Reu S, Gallmeier E, Bader DC, Kleespies A, Haas M, Kruger S, Heinemann V, Kirchner T, Boeck S.  
*J Cancer Res Clin Oncol. 2014 Sep;140(9):1625-8.*

<https://doi.org/10.1007/s00432-014-1774-4>

6. **POLE gene hotspot mutations in advanced pancreatic cancer**

Guenther M, Veninga V, Kumbrink J, Haas M, Westphalen CB, Kruger S, Heinemann V, Kirchner T, Boeck S, Jung A, **Ormanns S**  
*J Cancer Res Clin Oncol.* 2018 September 7.

<https://doi.org/10.1007/s00432-018-2746-x>

7. **Desmogleins as prognostic biomarkers in resected pancreatic ductal adenocarcinoma.**

**Ormanns S**, Altendorf-Hofmann A, Jackstadt R, Horst D, Assmann G, Zhao Y, Bruns C, Kirchner T, Knösel T.

*Br J Cancer.* 2015 Nov 17;113(10):1460-6.

<https://doi.org/10.1038/bjc.2015.362>