

Aus dem Pathologischen Institut,
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Frederick Klauschen

***Charakterisierung von Faktoren für die Progression
des duktales Adenokarzinoms des Pankreas***

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

vorgelegt von

Michael Ulrich Günther

aus

Landsberg am Lech

Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Steffen Ormanns
Prof. Dr. Max Schnurr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jan D' Haese
Prof. Dr. Julia Mayerle

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2022

Affidavit



Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Günther, Michael Ulrich

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Charakterisierung von Faktoren für die Progression des duktalem Adenokarzinoms des Pankreas

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.

München, 30.11.2022
Ort, Datum

Michael Ulrich Günther
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Affidavit	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Publikationsliste	7
Beitrag zu den Veröffentlichungen	8
Beitrag zur Publikation I	8
Beitrag zur Publikation II	9
Einleitung	11
Fragestellung und Zielsetzung	15
Hotspotmutationen der DNA-Polymerase ϵ als möglicher Therapie-Biomarker	15
Lipopolysaccharid als Mikrobiomsurrogat zur Therapie-Stratifizierung	16
Ausblick	18
Zusammenfassung	19
Abstract (English)	21
Literaturverzeichnis	23
Veröffentlichung I	28
Veröffentlichung II	35
Danksagung	43

Abkürzungsverzeichnis

<i>BRCA1</i>	<i>breast cancer 1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>breast cancer 2</i>
CA-19.9	Carbohydrat-Antigen 19-9
CDD	Cytidindesaminase
CDD _L	lange Isoform der Cytidindesaminase
CDD _S	kurze Isoform der Cytidindesaminase
CDKN2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> (auch bekannt als p16-INK4A)
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DFS	<i>disease free survival</i> (krankheitsfreies Überleben)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DPC4	<i>deleted in pancreatic cancer-4</i> (auch bekannt als SMAD4)
EC	Endometriumkarzinom
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FOLFIRINOX	Chemotherapie-Regime bestehend aus 5-Fluorouracil, Leukovorin, Oxaliplatin, Irinotecan
GNAS	<i>guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating activity polypeptide</i>
HR	<i>hazard ratio</i>
HRD	Defizienz der homologen Rekombination
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitoren
IPMN	intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
KRK	kolorektales Karzinom
LPS	Lipopolysaccharid
LPS-IHC	Lipopolysaccharid-Immunhistochemie
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MLH1	MutL Homolog 1
MMR-D	<i>mismatch repair deficiency</i> (Basenfehlpaarungsreparatur)
MSH2	MutS Homolog 2
MSH6	MutS Homolog 6
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
Nab-Paclitaxel	Nanopartikel-Albumin-gebundenes Paclitaxel

OS	<i>overall survival</i> (Gesamtüberleben)
<i>PALB2</i>	<i>partner and localizer of BRCA2</i>
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PARPi	Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Inhibitoren
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas
PD1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PDL1	<i>programmed cell death 1 ligand 1</i>
PFS	<i>progression free survival</i> (Progressionsfreies Überleben)
<i>PMS2</i>	<i>mismatch repair endonuclease PMS2</i>
Pol ϵ	DNA-Polymerase ϵ
POLE	katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase ϵ
RNF43	<i>ring finger protein 43</i>
SMAD4	<i>mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
TMA	<i>tissue microarray</i>
TP53	Protein p53
WNT	<i>wingless and Int-1</i>
95% CI	95% Konfidenz-Intervall

Publikationsliste

Guenther M, Veninga V, Kumbrink J, Haas M, Westphalen CB, Kruger S, Heinemann V, Kirchner T, Boeck S, Jung A, Ormanns S. *POLE* gene hotspot mutations in advanced pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;**144**: 2161–2166.

Journal Impact Factor (2018): 3.332; Journal Ranking: 99/230 (Oncology)

Guenther M, Haas M, Heinemann V, Kruger S, Westphalen CB, von Bergwelt-Baildon M, Mayerle J, Werner J, Kirchner T, Boeck S, Ormanns S. *Bacterial lipopolysaccharide as negative predictor of gemcitabine efficacy in advanced pancreatic cancer – translational results from the AIO-PK0104 Phase 3 study*. *Br J Cancer*. 2020;**123**: 1370–1376.

Journal Impact Factor (2020): 7.640; Journal Ranking: 39/242 (Oncology)

Beitrag zu den Veröffentlichungen

Beitrag zur Publikation I

Mein Beitrag zur Publikation I bestand aus der Organisation, Durchführung und Auswertung des Großteils der molekularpathologischen Analysen. Dabei habe ich Tumor-DNA mittels dem QIAamp DNA FFPE mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) unter mikroskopischer Kontrolle aus ungefärbten Schnittpräparaten tumortragender Paraffinblöcke extrahiert. Diese wurde anschließend in eine PCR-basierte Sequenzierungsreaktion eingesetzt, in deren Rahmen mittels der am Institut etablierten Pyrosequenzierung die Exone 9 und 13 von mir auf das Vorhandensein einer Mutation hin überprüft wurden.

Zur Validierung der Sequenzierung habe ich vor der Untersuchung der Patientenkohorte eine Kontrollgruppe aus 37 Endometriumkarzinom-Fällen aus dem Archiv des Pathologischen Instituts (s. *Supplemental Table 1*, [1]) erstellt und untersucht, da diese verglichen mit anderen Entitäten sehr häufig pathogenetische Alterationen im *POLE*-Gen aufweisen [2, 3].

Dabei konnte ich in vier Fällen eine Mutation im Exon 9 des *POLE*-Gens nachweisen (s. *Figure 1A*, [1]). Da sich jedoch keine Mutation im Exon 13 detektieren ließ, habe ich in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Jörg Kumbrink, Pathologisches Institut, ein DNA-Fragment, das für die Exon 13-Mutation kodiert, mittels *site-directed*-Mutagenese-PCR erzeugt [4]. Die so erzeugte Mutation konnte anschließend ebenfalls mittels Pyrosequenzierung bestätigt werden (s. *Figure 1C*, [1]).

In der von uns untersuchten Kohorte von 115 Pankreaskarzinompatienten bestehend aus 60 Patienten der AIO-PK0104 Studie [5] und 55 Patienten einer translationalen Studienkohorte [6] fanden sich keine Hotspot-Mutationen im *POLE*-Gen [1]. Um die klinische Bedeutung einer *POLE*-Mutation im Pankreaskarzinom besser zu verstehen, habe ich anschließend mittels der Internet-Datenbank *cBioportal.org* [7, 8] die Häufigkeit von *POLE*-Mutationen in den verfügbaren Datensätzen von 741 Pankreaskarzinomen untersucht und hinsichtlich der Auswirkungen auf das Überleben analysiert (s. *Supplemental Table 2*, *Supplemental Figure 3*, [1]).

Für die abschließende Publikation habe ich in Abstimmung mit PD Dr. Steffen Ormanns und Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung die Abbildungen und Tabellen erstellt (s. *Figure 1* und *Table 1* [1]).

Beitrag zur Publikation II

Mein Beitrag zur Publikation II bestand aus der Organisation und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen, der Durchführung der statistischen Berechnungen und der Erstellung der Abbildungen und Tabellen für die Publikation.

In einem ersten Schritt wurde der immunhistochemische Nachweis von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) etabliert. Hierfür habe ich Proben normaler Dickdarmschleimhaut, die typischerweise reichlich LPS-positive gramnegative Keime enthält [9], aus dem Archiv des Pathologischen Institutes entnommen und als Positivkontrollen verwendet (s. *Supplemental Figure S1*, [10]). Anschließend wurde die Färbung an den Tumorproben der AIO-PK0104-Studie [5] und einer weiteren Kohorte von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom [6], die von PD Dr. Steffen Ormanns und mir in Form eines *tissue microarray* (TMA, n=133) aufgearbeitet worden waren, durchgeführt und von mir ausgewertet. Hierbei zeigte sich in einer ersten explorativen Analyse, dass der Nachweis von LPS im Tumorgewebe mit schlechtem Gesamtüberleben (OS) der Patienten nach Beginn der palliativen Chemotherapie assoziiert war, sodass ich weitere, überwiegend in Form von Biopsien vorliegende Tumorproben beider Kohorten, die nicht bereits als TMA aufgearbeitet waren, in die Analyse einbezog. Nach mikroskopischer Auswertung dieser Färbungen (n=110), führte ich statistische Berechnungen mittels des Analyseprogrammes SPSS (Version 26.0.0.1, IBM, Ehningen, Deutschland) durch. Dabei konnte ich den initial beobachteten negativen prognostischen Effekt des Nachweises von LPS bestätigen. In der getrennten Analyse der verschieden behandelten Untergruppen (Gemcitabin-basierte palliative Chemotherapie vs. nicht-Gemcitabin-basierte palliative Chemotherapie) ergab sich nur ein negativer Effekt auf das OS und das progressionsfreie Überleben (PFS) in der Untergruppe der Gemcitabin-basiert therapierten Patienten (s. *Figure 2*, *Table 2* und *Table 3* [10]). In einer multivariaten Analyse (Cox-Regressionsanalyse) zeigte sich, dass der Effekt unabhängig von anderen für das OS und PFS wichtigen Einflussfaktoren, wie bspw. Tumordifferenzierung und Patientenalter ist (s. *Table 3*, [10]).

Folglich scheinen mittels einer LPS-Immunhistochemie (LPS-IHC) detektierte gramnegative Bakterien in Übereinstimmung mit existierenden präklinischen Modellen eine entscheidende Rolle in der Therapieresistenz des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms zu spielen [11].

Im Rahmen der Revision des zur Publikation eingereichten Manuskriptes, wies ich anhand der Daten der AIO-PK0104-Studie nach, dass LPS-Positivität auch biochemisch, anhand der Messung des Serum-CA19.9-Verlaufs unter Therapie [12], mit schlechterem Therapieansprechen in Gemcitabin-basiert therapierten Patienten assoziiert ist (s. *Table 4*, [10]). Zudem zeigte ich ergänzend, dass der verwendete immunhistochemische Nachweis von LPS im TMA im Vergleich zum Flächenschnitt repräsentativ für den Gesamtumor ist und sich die einzelnen Tumorkolonien (Primärtumor oder Metastase) nicht signifikant hinsichtlich ihrer LPS-Positivität unterscheiden (s. *Supplemental Table S3*, *Supplemental Table S5*, *Supplemental Table S6* und *Supplemental Figure S2*, [10]).

Es handelt sich bei der Publikation um eine geteilte Erstautorenschaft.

Die Konzeption, Durchführung, Analyse und Manuskripterstellung erfolgte im Rahmen des Projektes durch meinen Betreuer und mich. Die Erhebung klinischer Daten wie Follow-Up und Therapieansprechen etc. der untersuchten Patientenkohorten war bereits durch unseren Kooperationspartner PD Dr. med. Michael Haas, (Medizinische Klinik 3, LMU Klinikum) durchgeführt worden, der uns diese Datensätze zur Verfügung gestellt hatte. Diese wurde durch die Teilung der Erstautorenschaft berücksichtigt.

Einleitung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist eine hochmaligne Neoplasie, die mit einem 5-Jahres Überleben von 10% ab dem Zeitpunkt der Diagnose im Vergleich zu anderen Malignomen eine nahezu infauste Prognose aufweist [13]. Auch bei einer zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lokal begrenzten und somit operablen Erkrankung, die nur bei 11% der Patienten vorliegt, beträgt das Fünfjahresüberleben lediglich 39% [13]. Weltweit stellt das PDAC derzeit die siebthäufigste malignom-bedingte Todesursache dar [14]. Dies hat einen geschätzten Verlust an weltweiter Lebenszeit von über einer Million Lebensjahren und hohe wirtschaftliche Schäden auch aufgrund der Kosten der krankheitsassoziierten Hospitalisierung zur Folge [15]. Dabei hat sich im Zeitraum von 1990 bis 2017 die weltweite Anzahl der neu diagnostizierten Erkrankungen mehr als verdoppelt [16]. Am höchsten ist die Krankheitsinzidenz in Europa, Nordamerika, Australien sowie Neuseeland [14-17]. Die Erkrankungsinzidenz nimmt mit steigendem Lebensalter zu und ist bei Männern zwischen dem 65. und 69. Lebensjahr und bei Frauen im Alter von 75 bis 79 Jahren am höchsten [18]. Nur ein sehr geringer Anteil aller PDAC Patienten erkrankt vor dem fünfzigsten Lebensjahr [19].

Lokalisiert sind die Tumoren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vorwiegend im Pankreaskopf [20]. Seltener finden sie sich im Pankreaskörper oder Schwanz [20]. Die Lokalisation beeinflusst besonders in der Frühphase die Auftretenswahrscheinlichkeit und Ausprägung der Symptome, wie Bauchschmerzen, neuauftretender Diabetes, Übelkeit oder Ikterus [20, 21]. Dies hat zur Konsequenz, dass vor allem Tumoren des Pankreasschwanzes aufgrund fehlender Frühsymptome und häufig nur schwach ausgeprägter Symptome oftmals erst in einem fortgeschrittenerem Erkrankungsstadium erkannt werden als die Pankreaskopftumoren [20]. Ein weiteres Problem ist das Fehlen geeigneter und spezifischerer Biomarker zur Früherkennung und ein unzureichendes Kosten-Nutzen-Verhältnis für technisch aufwändige apparative Verfahren für eine Reihenuntersuchung nicht selektierter Populationen, was eine Diagnose in frühen Stadien erschwert [22, 23]. Dabei ist die Verbesserung der Früherkennung durch eine erhöhte Sensibilisierung für Frühsymptome und ein besseren Zugang zur medizinischen Versorgung von großer Wichtigkeit, da sie mit einer Zunahme von in frühen Stadien und bei jüngeren Patienten diagnostizierten Fällen vergesellschaftet scheint, was insgesamt die Erkrankungsprognose verbessern könnte [24].

PDAC entwickelt sich zumeist auf dem Boden von Vorläuferläsionen des duktales Epithels, von denen die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) am häufigsten auftreten [25]. Im vergangenen Jahrzehnt haben umfangreiche Sequenzierstudien den molekularen Hintergrund des PDAC aufgeklärt [26, 27].

Mit über 90% weist ein Großteil der Tumoren onkogene, aktivierende Mutationen im *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma virus*) Gen auf [28]. *KRAS* ist integraler Bestandteil der MAPK- (Mitogen aktivierte Protein Kinase) Signaltransduktionskaskade und anderer Signalwege, die extrazelluläre Wachstumssignale von membrangebundenen Rezeptortyrosinkinasen, wie dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), in

intrazelluläre Prozesse umsetzen [29]. KRAS-Mutationen sind bereits in der Mehrheit der frühen nicht-invasiven Vorläuferläsionen des PDAC mit geringer Epitheldysplasie (*low grade* PanIN) nachweisbar [25]. Im weiteren Verlauf der Karzinogenese akkumulieren die neoplastischen Zellen weitere molekulare Alterationen, die analog der Adenom-Karzinom-Sequenz des Dickdarmkarzinoms [30] über schwere Epitheldysplasie (*high grade* PanIN) schließlich im invasiven Karzinom münden [25, 27, 28]. Hierzu gehören inaktivierende Mutationen in SMAD4 (*mothers against decapentaplegic homolog 4*), das vom *DPC4* (*deleted in pancreatic cancer-4*) Gen codiert wird, im Tumorsuppressorgen *TP53* und im für die Zyklin-abhängige Kinase p16-INK4A kodierenden Gen *CDKN2A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*) [28]. Alterationen in *KRAS*, *TP53*, *DPC4* und *CDKN2A* lassen sich in über 50% aller Tumoren nachweisen [27]. Andere molekulare Alterationen, wie eine Mutation des *RNF43* (*ring finger protein 43*), das mit einer Überaktivierung des WNT-Signalweges assoziiert ist [31], sind mit einem Auftreten von 10% deutlich seltener [27].

Eine weitere, seltenere Vorläuferläsion des PDAC ist die Gruppe der intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN), die abhängig von ihrer histologischen Differenzierung (intestinal, gastral, pankreatikobiliär), ein unterschiedliches Entartungspotential aufweisen und sich molekular von den „klassischen“ PDAC unterscheiden, da sie häufig eine *GNAS*-Mutation aufweisen [32].

Die noch selteneren muzinös-zystischen Neoplasien, die fast ausschließlich bei Frauen auftreten, gehen selten in ein invasives PDAC über [33].

Der Hauptrisikofaktor für die Entstehung des PDAC ist der Nikotinkonsum mit einem Anteil von 21,1 % aller PDAC-assoziierten Todesfälle [18]. Daneben sind modifizierbare Risikofaktoren, wie Alkoholkonsum, hohe Blut-Glucosespiegel, Hypercholesterinämie oder körperliche Inaktivität von Bedeutung [17, 34, 35]. Nur 5 – 10 % aller PDAC-Fälle lassen sich auf erbliche Faktoren zurückführen [36]. Besonders hoch ist dabei der Anteil mit pathogenen Keimbahnmutationen in der Patientengruppe der jungen Patienten (Erkrankungsalter ≤ 50 Jahre) [37]. Die häufigsten hereditären Risikofaktoren für die Entstehung eines PDAC sind Keimbahnmutationen der Gene der homologen Rekombination, wie *BRCA1*, *BRCA2* und *PALB2*, die mit einer Defizienz der homologen Rekombination (HRD) einhergehen [36-39]. Diese Mutationen sind einer Therapie mit PARP-Inhibitoren (PARPi), wie Olaparib oder Rucaparib, zugänglich und weisen daher bei entsprechender Diagnose mit anschließender zielgerichteter Therapie in der fortgeschrittenen Situation eine bessere Prognose auf [40-42]. Weitere therapeutisch relevante hereditäre Risikofaktoren sind die im Rahmen eines Lynch-Syndroms auftretenden Mutationen der Gene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*, die für DNA-Basenfehlpaarungsreparatur-Proteine codieren [43]. Aufgrund des Ausfalls dieser Gene kommt es zu einer „*mismatch repair deficiency*“ (MMR-D) der Tumoren mit Akkumulation zahlreicher Mutationen auch auf kurzen nichtkodierenden DNA-Abschnitten, den sog. Mikrosatelliten, was als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet wird und diagnostisch genutzt werden kann [43]. Die hohe Mutationslast führt zudem zur Entstehung

zahlreicher Neoantigene, welche eine systemische Tumortherapie mittels Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) ermöglichen [36, 44, 45].

Trotz erster Verbesserungen bei der Früherkennung kommen dennoch nur wenige Patienten bei Erstdiagnose für die einzig bisher verfügbare kurative Therapie in Form einer chirurgischen Resektion des Primärtumors in Betracht [24, 46]. Bei der Resektion beeinflusst die Tumorgöße stark die Prognose der Erkrankung, da bei großen Tumoren auch unter Einsatz anspruchsvoller chirurgischer Verfahren seltener eine komplette Tumorsektion gelingt und häufiger loko-regionäre Lymphknotenmetastasen oder Komplikationen auftreten [47]. Dabei ist aber besonders eine vollständige Resektion des Tumors von großer prognostischer Bedeutung, da im Patienten verbliebener Residualtumor (postoperative histopathologische R1-Situation) die Prognose signifikant verschlechtert (OS: 15 vs. 22 Monate) [48]. Neben der Tumorgöße ist ein wichtiger Einflussfaktor bei resezierbaren Tumoren die Erfahrung des durchführenden Zentrums mit dem Eingriff und der nachfolgenden medizinischen Betreuung, da dies mit einer signifikanten Reduktion der postoperativen Komplikationen und Mortalität einhergeht [49]. Durch eine adjuvante Systemtherapie mit dem Pyrimidinanalogon Gemcitabine konnte im direkten Vergleich mit reiner Beobachtung in der postoperativen Nachsorge die Prognose der Erkrankung verbessert werden (DFS: 13.4 vs. 6.7 Monate) [50]. Diese Verbesserung war dabei unabhängig vom Resektionsstatus der Patienten, da sowohl Patienten mit inkompletter (HR: 0.33 95% CI: 0.19 – 0.58), als auch Patienten mit einer kompletten Tumorsektion von dieser Therapie signifikant profitierten (HR: 0.59 95% CI: 0.46 – 0.76) [50]. Das aktivere, aber auch toxischere Chemotherapieregime FOLFIRINOX (5-Fluorouracil, Leukovorin, Oxaliplatin, Irinotecan) hat in der adjuvanten Situation für postoperativ körperlich leistungsfähige Patienten die Monotherapie mit Gemcitabine abgelöst, da es im direkten Vergleich deutlich effektiver ist (DFS: 21.6 vs. von 12.8 Monate und OS: 54.4 vs. 35.0 Monate) [51].

Eine neoadjuvante Systemtherapie kann bei Patienten mit zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nicht operablen Tumoren eine Resektion und ein verbessertes Resektionsergebnis ermöglichen [52]. Dabei kommt es durch die neoadjuvante Therapie zu keiner Zunahme der postoperativen Komplikationen [52]. Jedoch verbessert sich durch die Resektion die Prognose der Patienten deutlich im Vergleich zu einer reinen palliativen Systemtherapie (OS: 27.5 vs. 13.9 Monate) [52]. Bei Patienten mit zum Zeitpunkt der Erstdiagnose resezierbaren Tumoren gibt es anhand der bisherigen Studienlage keinen klaren Nachweis für den Nutzen einer neoadjuvanten Therapie [53].

Trotz der Fortschritte in der adjuvanten und chirurgischen Behandlung, kommt es sehr häufig im Erkrankungsverlauf zu Rezidiven und der Bildung von Fernmetastasen, die chirurgisch nicht mehr therapiert werden können [21, 54]. Für diese Patienten steht, wie für den Großteil der Patienten mit primär inoperablen oder bereits metastasierten Tumoren, meist nur die Option einer palliativen Systemtherapie zur Verfügung [54].

Erstlinientherapien bei Patienten mit hoher körperlicher Leistungsfähigkeit sind aktuell die Therapieregime FOLFIRINOX und die Kombination aus Gemcitabine und Albumin

gebundenes Paclitaxel (Nanopartikel-Albumin-gebundenes-Paclitaxel) [55, 56]. Im Rahmen klinischer Studien wurde bisher kein direkter Vergleich zwischen diesen beiden Regimen durchgeführt [57]. Prospektive Daten einer deutschlandweiten Kohorte zeigten einen leichten Überlebensvorteil für das FOLFIRINOX-Regime (PFS: 5.6 vs. 6.3 Monate und OS: 9.1 vs. 11.3 Monate) [57]. Ein Problem dieser gut wirksamen Therapieregime ist aber die hohe Toxizität, die eine Anwendung nur bei Patienten mit ausreichender körperlicher Leistungsfähigkeit erlaubt, sodass in vielen Fällen in der palliativen Erstlinientherapie nur noch eine weniger wirksame Monotherapie mit Gemcitabine eingesetzt werden kann [55-57].

Molekular zielgerichtete Therapeutika sind bei der Therapie solider Malignome, wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, inzwischen ein wichtiger Therapiebestandteil [58]. Sie spielen jedoch in der systemischen Therapie des PDAC, von den o.g. Ausnahmen der MSI- und HRD-Tumoren, die mit ICI bzw. mit PARPi behandelt werden können [40-42], bisher keine bedeutende Rolle, da sie in Studien die Therapieeffizienz nicht signifikant steigern konnten [59]. Lediglich Patienten, die unter einer Therapie mit dem EGFR-Inhibitor Erlotinib einen typischen und bevorzugt an den Händen auftretenden Hautausschlag (sog. „Rash“) entwickeln, erzielen eine signifikante Verbesserung des OS unter Erlotinib-Therapie [5, 60]. Die Hinzugabe von Erlotinib zu einer Gemcitabine-Systemtherapie kann dann ähnliche Auswirkungen auf die Prognose der Patienten, wie eine Therapie mit dem FOLFIRINOX-Regime haben (OS: 10.1 vs. 10.9 Monate) [61].

Andere Versuche bisheriger experimenteller zielgerichteter Konzepte, wie eine gezielte Therapie des Tumorstromas, in Studien zu übertragen, erbrachten nicht die anhand der präklinischen Daten erhofften Resultate [62]. Erschwerend kommt hinzu, dass selbst nach aufwendigen molekulargenetischen Untersuchungen nur bei wenigen Patienten molekulare Alterationen nachgewiesen werden können, welche eine Rationale für eine zielgerichtete Therapie bieten [44].

Aufgrund der Problemkonstellation bei Therapie und Diagnostik sowie der höheren Inzidenz in Industrieländern stellt das PDAC bei den prognostizierten malignombedingten Todesfällen für das Jahr 2021 in Amerika und in Europa sogar die vierthäufigste Todesursache dar [13, 16, 63]. Das PDAC könnte bei voraussichtlich weiterhin schlechter Therapierbarkeit verbunden mit einem unverändert hohen Anteil an in fortgeschrittenen Stadien diagnostizierten Fällen und einer weiter steigenden Inzidenz ab dem Jahr 2030 die zweithäufigste malignombedingte Todesursache in den westlichen Industrienationen, wie den USA oder Deutschland, darstellen, was die bisherigen sozioökonomischen Belastungen durch die Erkrankung deutlich erhöhen dürfte [64-66].

Daher ist neben der Entwicklung neuer Therapieoptionen und der Identifikation neuer Therapieziele auch die Charakterisierung von Biomarkern zur effektiven Therapie-Stratifizierung von großer Bedeutung. So könnte für einen größeren Anteil der Patienten sichergestellt werden, dass sie von den verfügbaren Therapieoptionen, die am besten auf den Tumor abgestimmte Therapieform erhalten. Dies ist ein entscheidender Schritt, um die Prognose der Erkrankung zu verbessern, da so die bisher oft sehr limitierten Therapieoptionen effektiver eingesetzt werden können.

Fragestellung und Zielsetzung

Ziel des Promotionsprojektes war die Analyse zweier Faktoren zur Therapie-Stratifizierung bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom mithilfe zweier klinisch gut charakterisierten Patientenkohorten.

Die eine Kohorte setzt sich aus den Patienten der multizentrischen Crossover-Studie AIO-PK0104 zusammen, in deren Rahmen die Kombinationstherapie von Gemcitabine und Erlotinib im Vergleich zu der Kombination aus Capecitabine und Erlotinib in der palliativen Therapie des Pankreaskarzinoms untersucht wurde [5].

Die andere Kohorte besteht aus den Patienten dreier abgeschlossener multizentrischer Therapiestudien sowie einer unizentrischen Studie [6]. Dabei haben alle Patienten dieser Kohorte im Rahmen der palliativen Therapie kein Erlotinib erhalten [6].

Bei beiden Kohorten ist ausreichend Tumormaterial für weiterführende molekulargenetische und immunhistochemische Untersuchungen vorhanden.

Hotspotmutationen der DNA-Polymerase ϵ als möglicher Therapie-Biomarker

Die DNA-Polymerase ϵ (Pol ϵ) spielt eine essenzielle Rolle bei der DNA-Replikation eukaryontischer Zellen [67]. Im Gegensatz zur DNA-Polymerase α verfügt sie, wie die DNA-Polymerase δ , über eine auf der katalytischen Untereinheit der Pol ϵ (kodiert vom *POLE*-Gen) befindliche 3'-5'-Exonuklease-Aktivität [67]. Diese erlaubt der Pol ϵ zusätzlich eine Korrektur von DNA-Replikationsfehlern, weshalb sie einen wichtigen Beitrag zur genomischen Stabilität leistet [67]. Im Unterschied zur Exonuklease-Domäne der DNA-Polymerase δ , für die vorwiegend Alterationen durch Keimbahnmutationen beschrieben sind, treten im dem *POLE*-Gen in humanen Krebserkrankungen auch somatische Mutationen auf [68]. Am häufigsten finden sich diese Mutationen in sporadischen Endometriumkarzinomen (EC) [2, 3, 69]. Diese bedingen durch den teils kompletten Ausfall der Exonukleaseaktivität eine massive Anhäufung von Mutationen durch Replikationsfehler mit einer konsekutiven Entstehung zahlreicher Neoantigene [3, 68, 70]. Daher kommt es bei *POLE*-mutierten EC und kolorektalen Karzinomen (KRK), ähnlich wie bei Tumoren mit MMR-D, zur Entstehung eines ausgeprägten intratumoralen Immunzellinfiltrats bestehend aus zytotoxischen T-Zellen bei gleichzeitig erhöhter Expression immunregulatorischer Moleküle, wie PD1, PDL1 und CTLA4 [70, 71]. Die Patienten mit *POLE*-mutierten EC oder KRK, die dabei meist mikrosatellitenstabil sind, haben daher insgesamt eine signifikant bessere Prognose [69, 71]. Aufgrund der hohen konsekutiven Mutationslast könnte der Nachweis einer *POLE*-Mutation im PDAC, ähnlich wie das Vorliegen einer MSI, ein Biomarker für ein gutes Ansprechen auf eine zielgerichtete Tumorthherapie mit ICI sein [44, 68, 70]. Dabei befindet sich der Großteil aller funktionell relevanten *POLE*-Alterationen auf zwei „Hotspot-Regionen“ auf Exon 9 (P286R/H) und Exon 13 (V411L/R/M) [68], was eine Analyse der Mutationen an FFPE-Gewebe mittels Pyrosequenzierung ermöglicht [68].

Folgende Fragestellungen sollten im Rahmen des Projekts untersucht werden:

1. Wie hoch ist die Häufigkeit von *POLE*-Hotspot-Mutationen in den Kohorten mit fortgeschrittenen Pankreaskarzinompatienten und in öffentlich zugänglichen Sequenzierungsdaten von Pankreaskarzinompatienten?
2. Führen Mutationen der Hotspot-Regionen, wie in anderen Tumorentitäten, auch im PDAC zu einer hohen Mutationslast mit Ausbildung eines in anderen Erkrankungen für *POLE*-Mutationen beschriebenen Immuneinfiltrates?
3. Ist ein Screening auf *POLE*-Hotspotmutationen bei PDAC Patienten sinnvoll?

Lipopolysaccharid als Mikrobiomsurrogat zur Therapie-Stratifizierung

Ein wichtiger Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien sind die Lipopolysaccharide (LPS) [72]. Daher kann mit Hilfe von Antikörpern, die gegen LPS gerichtet sind, immunhistochemisch die Abundanz gramnegativer Bakterien im Gewebe untersucht werden [9, 11]. Dies ist von Bedeutung, da bestimmte Bakterien, wie *Escherichia coli*, mit dem Enzym der Cytidindesaminase (CDD) das Chemotherapeutikum Gemcitabine verstoffwechseln können [73]. Dieses besitzt sowohl in der Kombination mit Nab-Paclitaxel als auch in der Monotherapie oder in Verbindung mit anderen Therapeutika immer noch eine große Bedeutung für die Systemtherapie des PDAC [57]. Besonders Bakterien mit einer langen Isoform der CDD (CDD_L) metabolisieren im Vergleich zu solchen mit einer kürzeren Isoform des Enzyms (CDD_S) Gemcitabine besonders effektiv [11]. Tumoren deren Bakterien über eine CDD_L verfügen, zeigten in Mausmodellen ein deutlich beschleunigtes Tumorstadium unter Gemcitabine-Therapie im Vergleich zu Tieren, die entweder antibiotisch therapiert wurden oder bei denen die Tumoren nur Bakterien mit einer funktionslosen CDD enthielten [11]. Dabei besitzen besonders gramnegative Bakterien, mit hoher Abundanz im PDAC, sehr häufig eine CDD_L [11]. Der Metabolismus des Pyrimidinanalogons 5-Fluoruracil wird dabei in *vitro* durch die verschiedenen Isoformen der CDD nicht beeinflusst [11].

Da zum damaligen Zeitpunkt keine Daten über die Auswirkungen intratumoraler gramnegativer Bakterien auf die Effizienz einer palliativen Systemtherapie vorlagen, wollten wir folgende Fragestellungen untersuchen:

1. Wie hoch ist der Anteil der Patienten, bei denen sich intratumorale gramnegative Bakterien im Tumorgewebe mittels der LPS-IHC in den uns zur Verfügung stehenden Patientenkohorten mit fortgeschrittenem PDAC nachweisen lassen?
2. Bestehen Zusammenhänge zwischen einem LPS-Nachweis und klinisch-pathologischen Parametern der Patientenkohorten?
3. Wirkt sich der Nachweis von LPS auf das Überleben und das Ansprechen auf eine palliative Systemtherapie aus, wie es die experimentellen Daten vermuten lassen [11, 73] und ermöglicht der LPS-Nachweis eine Therapieprädiktion?

4. Kann das Ergebnis in einer zweiten unabhängigen Patientenkohorte validiert werden?

Ausblick

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurde in Zusammenschau mit aktuellen Untersuchungen gezeigt, dass die identifizierten Biomarker zu einer Verbesserung der Prognose des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms beitragen können.

Die Relevanz der *POLE*-Mutationen ist aufgrund der geringen Prävalenz in der klinischen Routine insgesamt nur gering. Jedoch bestätigen zwischenzeitlich veröffentlichte Daten, die in unseren Untersuchungen erwarteten, klinischen und biologischen Effekte sowie die therapeutische Relevanz einer *POLE*-Mutation im PDAC [74, 75].

Die erstmalige Beschreibung von LPS als unabhängigen Therapieprädiktor einer Gemcitabine-basierten palliativen Systemtherapie betont die Wichtigkeit einer weiteren Charakterisierung des Tumormikrobioms des Pankreaskarzinoms, da dieses neben der Prognose auch das Therapieansprechen der Erkrankung entscheidend beeinflussen könnte [10].

Gerade die hochdurchsatzbasierte Sequenzierung von klinisch gut charakterisierten Patientenproben zur näheren Charakterisierung des Mikrobioms könnte eine Mikrobiom-basierte Therapiewahl ermöglichen oder den Grundstein für eine gezielte Alteration des Tumormikrobioms zur Steigerung der Therapieeffizienz legen.

Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist eine Erkrankung mit nahezu infauster Prognose. Auch nach einer vollständigen Tumorresektion, die nur bei einer Minderheit der Patienten möglich ist, kommt es trotz Durchführung einer adjuvanten Systemtherapie zu frühzeitigen Rezidiven in Form von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen. So könnte bei weiterhin schlechter Therapierbarkeit der Erkrankung besonders im fortgeschrittenen Stadium das PDAC im Jahr 2030 die zweithäufigste Krebstodesursache in westlichen Industrienationen darstellen. Dies würde die bereits bestehende sozioökonomische Belastung der Erkrankung weiter erhöhen.

Daher ist eine Identifikation und Charakterisierung neuer Biomarker, die eine Therapie-Stratifizierung im Sinne einer personalisierten Tumorthherapie ermöglichen, von großer Bedeutung für die Verbesserung der Erkrankungsprognose.

Ziel des Promotionsprojekts war es, zwei Biomarker in Zusammenschau mit der vorliegenden Klinik der Patienten zu analysieren, um deren Eignung zur Therapiestratifizierung von Patienten mit fortgeschrittenem PDAC zu ermitteln.

Die im ersten Projekt untersuchte DNA-Polymerase ϵ (Pol ϵ) leistet einen wichtigen Beitrag zur genomischen Stabilität, da sie mit Hilfe einer Exonuklease DNA-Replikationsfehler korrigieren kann. Die Exonuklease der Pol ϵ wird dabei von der katalytischen Untereinheit *POLE* codiert. *POLE*-Mutationen führen zu einem Ausfall der Korrekturfunktion bei der DNA-Replikation, was die Entstehung einer hohen Mutationslast mit zahlreichen Neoantigenen in Endometrium- sowie kolorektalen Karzinomen bedingt. Dies erlaubt in beiden Tumorentitäten eine effektive zielgerichtete Tumorthherapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren. Die Untersuchungen fokussierten sich in diesem Projekt auf zwei Hotspot-Regionen des *POLE*-Gens, da diese besonders häufig klinisch relevante somatische Mutationen aufweisen. Dabei konnten wir die von anderen Erkrankungen bekannten Auswirkungen einer *POLE*-Mutation in Zusammenschau mit öffentlich verfügbaren Sequenzierdaten für das PDAC bestätigen. Aufgrund der geringen Frequenz von *POLE*-Mutationen im PDAC ließ sich in den von uns mittels Pyrosequenzierung untersuchten Kohorten keine Hotspot-Mutation nachweisen. Daher erscheint aufgrund der geringen Auftretenswahrscheinlichkeit eine standardmäßige Testung nicht sinnvoll. Jedoch zeigen zwischenzeitlich veröffentlichte Daten, in Übereinstimmung mit unseren Daten, dass *POLE*-Mutationen ein wichtiger Biomarker für die Effizienz einer Immuntherapie im PDAC darstellen können.

Der Einfluss des Mikrobioms auf das Ansprechen einer Chemotherapie wurde bisher für das PDAC nur *in vitro* und in Mausmodellen untersucht. Dabei können bestimmte vorwiegend gramnegative Bakterien Spezies mit einer langen Isoform der Cytidindesaminase (CDD) Gemcitabine metabolisieren, was eine Tumorprogression unter der Therapie ermöglicht. Unsere Untersuchungen zeigten erstmals für Patienten mit einem fortgeschrittenen PDAC, dass der intratumorale Nachweis von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS), als mögliches Surrogat für ein gramnegatives Tumormikrobiom mit einem schlechteren Ansprechen auf eine Gemcitabine-basierte Chemotherapie assoziiert ist. In Übereinstimmung mit experimentellen Daten hatte der

intratumorale LPS-Nachweis keinen Effekt auf die Prognose einer Fluoropyrimidin-basierten Chemotherapie. Dies könnte ein erster Schritt zu einer Mikrobiom-assoziierten Therapie-Stratifizierung oder einer gezielten Alteration des Mikrobioms zur Steigerung der Therapieeffektivität sein.

Die Ergebnisse der mittels der beiden Kohorten im Rahmen des Promotionsprojekts charakterisierten Biomarker zeigen, in Übereinstimmung mit aktuellen Studien, dass spezifische Veränderungen des Tumors oder der Umgebung des Tumors eine deutliche Alteration der biologischen Tumoreigenschaften bewirken können. Diese Veränderungen können sich auch auf das Ansprechen der Tumoren auf bereits verfügbare Therapeutika auswirken, weshalb *POLE* und LPS als Biomarker für eine zielgerichtete Tumorthherapie fungieren können.

Dies ist bei weiterhin limitierten therapeutischen Optionen ein erster Ansatz, um die Prognose des PDAC zu verbessern, da so bereits verfügbare therapeutische Optionen deutlich wirkungsvoller eingesetzt werden können.

Abstract (English)

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a devastating disease. Even in the small subgroup of patients that can undergo tumor resection and adjuvant chemotherapy the recurrence rates are high. Thereby PDAC could be the second leading cause of cancer related death in developed countries in 2030, which will increase its high economic burden. The identification and characterization of biomarkers that allow therapy stratification of patients can be a step towards personal cancer treatment and a possible way to improve the prognosis of PDAC patients.

This work presents research on two different biomarkers that were characterized in two study cohorts to elucidate their importance in the treatment of advanced PDAC.

The first project in this work characterized the function of DNA-polymerase ϵ (Pol ϵ) in PDAC, as Pol ϵ plays an important role for genomic stability during DNA replication. Crucial for this function is the exonuclease encoded on the DNA-polymerase ϵ catalytic subunit gene *POLE*. Mutations in this gene lead to high tumor mutational burden in endometrial and colorectal cancer. Therefore, *POLE* mutations are promising biomarkers for immune therapy with immune checkpoint inhibitors. The *POLE* mutation analysis in the PDAC cohorts focused on two hotspot-regions that harbor most of the clinically relevant somatic *POLE* mutations. We did not detect any *POLE* gene hotspot mutation in the examined patients of the two study cohorts. However, based on publicly available sequencing data we confirmed the expected effects of *POLE* hotspot mutations in PDAC. As *POLE* mutations occur only at low frequency, routine testing of PDAC patients is not recommended, although recently published studies confirmed our suggested function of *POLE* mutations as a biomarker in PDAC.

The influence of the tumor microbiome in PDAC was mostly examined in mouse and cell culture models. Some bacterial species can metabolize gemcitabine by a long isoform of the enzyme cytidinedesaminase (CDD_L) and thus reduce the efficacy of gemcitabine therapy in these models. Remarkably, a large proportion of gram-negative bacteria which occur at high abundance in PDAC possess the gemcitabine metabolizing CDD_L.

Therefore, the second study focused on the detection of the bacterial membrane component lipopolysaccharide (LPS) in PDAC tissue samples by immunohistochemical staining as surrogate marker for gram-negative bacteria and examine its effect on the outcome of patients with advanced PDAC. As a result, we showed that detection of intratumoral LPS is associated with reduced efficacy of a gemcitabine-based chemotherapy in advanced PDAC patients. In accordance with the results of the *in vitro* models there was no influence on a fluoropyrimidine based treatment. Thereby this study underlines the importance of a microbiome associated therapy stratification as well as a selected alteration of the microbiome to increase therapy efficacy in PDAC.

In accordance with recent literature, the results of the research conducted in this work provide evidence for the use of new biomarkers for therapy stratification in PDAC patients. We showed that specific changes in the tumor biology or tumor microenvironment have a significant impact on the patients' prognosis and therapy response. This strategy can improve the prognosis of PDAC patients by selecting a

personalized targeted treatment regime that increases therapy efficacy of established therapeutic options.

Literaturverzeichnis

1. Guenther M, Veninga V, Kumbrink J, Haas M, Westphalen CB, Kruger S, et al. POLE gene hotspot mutations in advanced pancreatic cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2018;144(11):2161-6.
2. Church DN, Briggs SE, Palles C, Domingo E, Kearsley SJ, Grimes JM, et al. DNA polymerase ϵ and δ exonuclease domain mutations in endometrial cancer. *Human molecular genetics*. 2013;22(14):2820-8.
3. Briggs S, Tomlinson I. Germline and somatic polymerase ϵ and δ mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers. *The Journal of pathology*. 2013;230(2):148-53.
4. Hussain H, Chong NF-M. Combined overlap extension PCR method for improved site directed mutagenesis. *BioMed research international*. 2016;2016.
5. Heinemann V, Vehling-Kaiser U, Waldschmidt D, Kettner E, Märten A, Winkelmann C, et al. Gemcitabine plus erlotinib followed by capecitabine versus capecitabine plus erlotinib followed by gemcitabine in advanced pancreatic cancer: final results of a randomised phase 3 trial of the 'Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie'(AIO-PK0104). *Gut*. 2013;62(5):751-9.
6. Ormanns S, Haas M, Baechmann S, Altendorf-Hofmann A, Remold A, Quietzsch D, et al. Impact of SPARC expression on outcome in patients with advanced pancreatic cancer not receiving nab-paclitaxel: a pooled analysis from prospective clinical and translational trials. *Br J Cancer*. 2016;115(12):1520-9.
7. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *AACR*; 2012. p. 401-4.
8. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*. 2013;6(269):pl1-pl.
9. Estes JD, Harris LD, Klatt NR, Tabb B, Pittaluga S, Paiardini M, et al. Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS pathogens*. 2010;6(8):e1001052.
10. Guenther M, Haas M, Heinemann V, Kruger S, Westphalen CB, von Bergwelt-Baildon M, et al. Bacterial lipopolysaccharide as negative predictor of gemcitabine efficacy in advanced pancreatic cancer—translational results from the AIO-PK0104 Phase 3 study. *British journal of cancer*. 2020;123(9):1370-6.
11. Geller LT, Barzily-Rokni M, Danino T, Jonas OH, Shental N, Nejman D, et al. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science*. 2017;357(6356):1156-60.
12. Boeck S, Stieber P, Holdenrieder S, Wilkowski R, Heinemann V. Prognostic and therapeutic significance of carbohydrate antigen 19-9 as tumor marker in patients with pancreatic cancer. *Oncology*. 2006;70(4):255-64.
13. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(1):7-33.
14. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
15. Carrato A, Falcone A, Ducreux M, Valle JW, Parnaby A, Djazouli K, et al. A Systematic Review of the Burden of Pancreatic Cancer in Europe: Real-World Impact on

- Survival, Quality of Life and Costs. *Journal of Gastrointestinal Cancer*. 2015;46(3):201-11.
16. Chen X, Yi B, Liu Z, Zou H, Zhou J, Zhang Z, et al. Global, regional and national burden of pancreatic cancer, 1990 to 2017: Results from the Global Burden of Disease Study 2017. *Pancreatology*. 2020;20(3):462-9.
17. Huang J, Lok V, Ngai CH, Zhang L, Yuan J, Lao XQ, et al. Worldwide burden of, risk factors for, and trends in pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2021;160(3):744-54.
18. Pourshams A, Sepanlou SG, Ikuta KS, Bisignano C, Safiri S, Roshandel G, et al. The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2019;4(12):934-47.
19. Ansari D, Althini C, Ohlsson H, Andersson R. Early-onset pancreatic cancer: a population-based study using the SEER registry. *Langenbeck's archives of surgery*. 2019;404(5):565-71.
20. Modolell I, Guarner L, Malagelada J. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. *Annals of oncology*. 1999;10:S82-S4.
21. Mizrahi JD, Surana R, Valle JW, Shroff RT. Pancreatic cancer. *The Lancet*. 2020;395(10242):2008-20.
22. Owens DK, Davidson KW, Krist AH, Barry MJ, Cabana M, Caughey AB, et al. Screening for pancreatic cancer: US preventive services task force reaffirmation recommendation statement. *Jama*. 2019;322(5):438-44.
23. Benzel J, Fendrich V. Familial Pancreatic Cancer. *Oncol Res Treat*. 2018;41(10):611-8.
24. Blackford AL, Canto MI, Klein AP, Hruban RH, Goggins M. Recent trends in the incidence and survival of stage 1A pancreatic cancer: a surveillance, epidemiology, and end results analysis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2020;112(11):1162-9.
25. Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, et al. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*. 2012;142(4):730-3.e9.
26. 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(5897):1801-6.
27. Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*. 2015;518(7540):495-501.
28. Jaffee EM, Hruban RH, Canto M, Kern SE. Focus on pancreas cancer. *Cancer Cell*. 2002;2(1):25-8.
29. Mimeault M, Brand RE, Sasson AA, Batra SK. Recent advances on the molecular mechanisms involved in pancreatic cancer progression and therapies. *Pancreas*. 2005;31(4):301-16.
30. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1993;9(4):138-41.
31. Jiang X, Hao H-X, Growney JD, Woolfenden S, Bottiglio C, Ng N, et al. Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(31):12649-54.

32. Wu J, Matthaei H, Maitra A, Dal Molin M, Wood LD, Eshleman JR, et al. Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. *Sci Transl Med*. 2011;3(92):92ra66.
33. Crippa S, Fernández-Del Castillo C, Salvia R, Finkelstein D, Bassi C, Domínguez I, et al. Mucin-producing neoplasms of the pancreas: an analysis of distinguishing clinical and epidemiologic characteristics. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(2):213-9.
34. Chung HS, Lee JS, Song E, Kim JA, Roh E, Yu JH, et al. Effect of metabolic health and obesity phenotype on the risk of pancreatic cancer: A nationwide population-based cohort study. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2021;30(3):521-8.
35. Maisonneuve P, Lowenfels AB. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *International Journal of Epidemiology*. 2014;44(1):186-98.
36. Solomon S, Das S, Brand R, Whitcomb DC. Inherited pancreatic cancer syndromes. *Cancer J*. 2012;18(6):485-91.
37. Varghese AM, Singh I, Singh R, Kunte S, Chou JF, Capanu M, et al. Early-onset pancreas cancer: clinical descriptors, genomics, and outcomes. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2021;113(9):1194-202.
38. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2011;378(9791):607-20.
39. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, Lee MK, Pennil CC, Rendi MH, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(3):764-75.
40. Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(4):317-27.
41. Javle M, Shacham-Shmueli E, Xiao L, Varadhachary G, Halpern N, Fogelman D, et al. Olaparib Monotherapy for Previously Treated Pancreatic Cancer With DNA Damage Repair Genetic Alterations Other Than Germline BRCA Variants: Findings From 2 Phase 2 Nonrandomized Clinical Trials. *JAMA Oncol*. 2021;7(5):693-9.
42. Reiss KA, Mick R, O'Hara MH, Teitelbaum U, Karasic TB, Schneider C, et al. Phase II Study of Maintenance Rucaparib in Patients With Platinum-Sensitive Advanced Pancreatic Cancer and a Pathogenic Germline or Somatic Variant in BRCA1, BRCA2, or PALB2. *J Clin Oncol*. 2021;39(22):2497-505.
43. Tamura K, Kaneda M, Futagawa M, Takeshita M, Kim S, Nakama M, et al. Genetic and genomic basis of the mismatch repair system involved in Lynch syndrome. *Int J Clin Oncol*. 2019;24(9):999-1011.
44. Pishvaian MJ, Blais EM, Brody JR, Lyons E, DeArbeloa P, Hendifar A, et al. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(4):508-18.
45. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509-20.
46. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16022.
47. Marchegiani G, Andrianello S, Malleo G, De Gregorio L, Scarpa A, Mino-Kenudson M, et al. Does size matter in pancreatic cancer? *Annals of surgery*. 2017;266(1):142-8.

48. Tummers W, Groen J, Sibinga Mulder B, Farina-Sarasqueta A, Morreau J, Putter H, et al. Impact of resection margin status on recurrence and survival in pancreatic cancer surgery. *Journal of British Surgery*. 2019;106(8):1055-65.
49. Hata T, Motoi F, Ishida M, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, et al. Effect of Hospital Volume on Surgical Outcomes After Pancreaticoduodenectomy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg*. 2016;263(4):664-72.
50. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, 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):1473-81.
51. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul J-L, et al. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(25):2395-406.
52. Kunzmann V, Siveke JT, Algül H, Goekkurt E, Siegler G, Martens U, et al. Nab-paclitaxel plus gemcitabine versus nab-paclitaxel plus gemcitabine followed by FOLFIRINOX induction chemotherapy in locally advanced pancreatic cancer (NEOLAP-AIO-PAK-0113): a multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2021;6(2):128-38.
53. Brunner M, Wu Z, Krautz C, Pilarsky C, Grützmann R, Weber GF. Current clinical strategies of pancreatic cancer treatment and open molecular questions. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(18):4543.
54. Ettrich TJ, Seufferlein T. Systemic Therapy for Metastatic Pancreatic Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*. 2021;22(11):1-12.
55. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(18):1691-703.
56. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *New England journal of medicine*. 2011;364(19):1817-25.
57. Hegewisch-Becker S, Aldaoud A, Wolf T, Krammer-Steiner B, Linde H, Scheiner-Sparna R, et al. Results from the prospective German TPK clinical cohort study: treatment algorithms and survival of 1,174 patients with locally advanced, inoperable, or metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *International journal of cancer*. 2019;144(5):981-90.
58. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran Jr WJ, Wu Y-L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet*. 2017;389(10066):299-311.
59. Ottaiano A, Capozzi M, De Divitiis C, De Stefano A, Botti G, Avallone 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):377-83.
60. 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. *Journal of clinical oncology*. 2007;25(15):1960-6.
61. Haas M, Siveke JT, Schenk M, Lerch MM, Caca K, Freiberg-Richter J, et al. Efficacy of gemcitabine plus erlotinib in rash-positive patients with metastatic pancreatic cancer selected according to eligibility for FOLFIRINOX: a prospective phase II study of the 'Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie'. *European Journal of Cancer*. 2018;94:95-103.

62. Van Cutsem E, Tempero MA, Sigal D, Oh D-Y, Fazio N, Macarulla T, et al. Randomized phase III trial of pegvorhyaluronidase alfa with nab-paclitaxel plus gemcitabine for patients with hyaluronan-high metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(27):3185.
63. Carioli G, Malvezzi M, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, et al. European cancer mortality predictions for the year 2021 with focus on pancreatic and female lung cancer. *Annals of Oncology*. 2021;32(4):478-87.
64. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research*. 2014;74(11):2913-21.
65. Draus T, Ansari D, Wikstrom F, Persson U, Andersson R. Projected economic burden of pancreatic cancer in Sweden in 2030. *Acta Oncol*. 2021;60(7):866-71.
66. Quante AS, Ming C, Rottmann M, Engel J, Boeck S, Heinemann V, et al. Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030. *Cancer medicine*. 2016;5(9):2649-56.
67. Henninger EE, Pursell ZF. DNA polymerase ϵ and its roles in genome stability. *IUBMB Life*. 2014;66(5):339-51.
68. Rayner E, van Gool IC, Palles C, Kearsley SE, Bosse T, Tomlinson I, et al. A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(2):71-81.
69. Church DN, Stelloo E, Nout RA, Valtcheva N, Depreeuw J, Ter Haar N, et al. Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(1):dju402.
70. Howitt BE, Shukla SA, Sholl LM, Ritterhouse LL, Watkins JC, Rodig S, et al. Association of Polymerase e-Mutated and Microsatellite-Instable Endometrial Cancers With Neoantigen Load, Number of Tumor-Infiltrating Lymphocytes, and Expression of PD-1 and PD-L1. *JAMA Oncol*. 2015;1(9):1319-23.
71. Domingo E, Freeman-Mills L, Rayner E, Glaire M, Briggs S, Vermeulen L, 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):207-16.
72. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:635-700.
73. Lehouritis P, Cummins J, Stanton M, Murphy CT, McCarthy FO, Reid G, et al. Local bacteria affect the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-12.
74. Kryklyva V, Ter Linden E, Kroeze LI, de Voer RM, van der Kolk BM, Stommel MW, et al. Medullary pancreatic carcinoma due to somatic POLE mutation: a distinctive pancreatic carcinoma with marked long-term survival. *Pancreas*. 2020;49(7):999.
75. Garmezay B, Gheeya J, Lin HY, Huang Y, Kim T, Jiang X, et al. Clinical and Molecular Characterization of POLE Mutations as Predictive Biomarkers of Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Advanced Cancers. *JCO Precision Oncology*. 2022;6:e2100267.

Veröffentlichung I

Guenther M, Veninga V, Kumbrink J, Haas M, Westphalen CB, Kruger S, Heinemann V, Kirchner T, Boeck S, Jung A, Ormanns S. *POLE* gene hotspot mutations in advanced pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;**144**, 2161–2166.

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

Veröffentlichung II

Guenther M, Haas M, Heinemann V, Kruger S, Westphalen CB, von Bergwelt-Baildon M, Mayerle J, Werner J, Kirchner T, Boeck S, Ormanns S. *Bacterial lipopolysaccharide as negative predictor of gemcitabine efficacy in advanced pancreatic cancer – translational results from the AIO-PK0104 Phase 3 study*. Br J Cancer. 2020;**123**, 1370–1376.

<https://doi.org/10.1038/s41416-020-01029-7>

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Ormanns für die exzellente Betreuung der Arbeit. Ebenso möchte ich unseren klinischen Kooperationspartnern der AG Onkologie der Medizinischen Klinik III / Comprehensive Cancer Center am Klinikum der Universität München danken, ohne die eine Durchführung der Studien nicht möglich gewesen wäre. Besonders bedanken möchte ich mich dabei bei Herrn Prof. Dr. Stefan Böck, der mir ein tiefgehendes klinisches Verständnis der Erkrankung ermöglicht hat.

Zudem möchte ich mich bei Andrea Sendelhofert und Anja Heier für die herausragende Unterstützung bei der Durchführung und Etablierung der im Rahmen der Veröffentlichung verwendeten immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Großer Dank gebührt auch dem Team der molekularen Diagnostik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Jung für die Unterstützung bei der Durchführung der molekulargenetischen Analysen.