

Aus dem CharitéCentrum für Chirurgische Medizin  
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Neuhaus

## Habilitationsschrift

# **Evaluierung von Prognosemarkern und Untersuchung neuer zielgerichteter Therapiemodelle im biliopankreatischen Karzinom**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach

## Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin  
von

Dr. med. Carsten Hendrik Kamphues  
geboren am 16.03.1978 in Rheine

Eingereicht:	Mai 2014
Dekanin:	Univ.-Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. med. Tobias Keck
2. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ulrich T. Hopt

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	4
1.1. Epidemiologie	4
1.2. Therapie und Prognose	5
1.3. Langzeitüberleben und Notwendigkeit valider Prognosefaktoren	6
1.4. Fragestellung der Arbeit	7
1.5. Einschätzung der postoperativen Komplikationen mit Hilfe des Clavien-Scores	8
1.6. DNA-Ploidie und DNA-Index	9
1.7. Der Hedgehog-Signalweg	11
2. Darstellung der eigenen Arbeiten	13
2.1. Prognostischer Einfluss der postoperativen Komplikationen auf das Langzeitüberleben von Pankreaskarzinompatienten	13
2.2. Prognostische Wertigkeit des DNA-Index beim biliopankreatischen Karzinom	22
2.2.1. DNA-Index als Prognosefaktor des Pankreaskarzinoms	22
2.2.2. DNA-Index als Prognosefaktor des intrahepatischen Cholangiokarzinoms	29
2.3. Die Rolle des Hedgehog-Signalweges beim biliopankreatischen Karzinom	37
2.3.1. Einfluss des Hedgehog-Signalweges beim humanen Pankreaskarzinom und Möglichkeiten der Tumorreduktion durch Signalwegsinhibition	37
2.3.2. Einfluss des Hedgehog-Signalweges beim humanen Cholangiokarzinom und Möglichkeiten der Tumorreduktion durch Signalwegsinhibition	47
3. Diskussion	58
4. Zusammenfassung	67
5. Literaturangaben	69
6. Danksagung	77
7. Erklärung	79

## Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
AUROC	Area under the receiver operating curve
CCC	Cholangiokarzinom
Dhh	Desert Hedgehog
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
HES1	hairy and enhancer of split-1
Hh	Hedgehog
IHC	Intrahepatisches Cholangiokarzinom
Ihh	Indian Hedgehog
p	Signifikanzniveau
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PDX1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
Ptch/PTCH1	Patched/PATCHED1
q-PCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SOX9/17	sex determining region Y-box 9/17
UICC	Union internationale contre le cancer

## **1. Einleitung**

Maligne Tumoren des Pankreas sowie der intra- und extrahepatischen Gallenwege stellen heutzutage trotz großer Fortschritte sowohl im chirurgisch-operativen als auch im onkologischen Bereich weiterhin schwer zu behandelnde Tumorentitäten mit unzufriedenstellender Prognose für die betroffenen Patienten dar. Modelle zur Optimierung der bestehenden Therapien sowie innovative zielgerichtete Behandlungskonzepte sind daher unbedingt notwendig.

### **1.1. Epidemiologie**

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas, welches nach heutigem Wissensstand in erster Linie aus prämaligen Vorstufen des Gangepithels (sog. PanIN) entsteht, ist mit einer Inzidenz von nur 2,5% aller Karzinome weltweit eine relativ seltene Tumorerkrankung [1, 2]. In Deutschland erkrankten in den letzten Jahren jeweils ca. 15.000 Menschen jährlich an einem exokrinen Pankreaskarzinom, wobei beide Geschlechter gleich häufig betroffen sind. Obwohl die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten in den letzten Jahren konstant geblieben sind, steigt durch die zunehmende Überalterung der Gesellschaft die absolute Zahl an Erkrankungs- und Todesfällen stetig an, so dass nach Schätzungen der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister (GEKID) 2014 mehr als 17.500 Neuerkrankungen in Deutschland zu erwarten sein werden. Ähnlich wie in Deutschland, ist das Pankreaskarzinom in den USA zwar nur die zwölft häufigste Krebserkrankung, stellt jedoch die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache dar, was das aggressive Potential dieser Erkrankung unterstreicht.

Auch Cholangiokarzinome (CCC), welche sich aus den Gallengangsepithelien der intrahepatischen, hilären oder distalen Gallengänge entwickeln, sind mit einem Anteil von ca. 3% aller gastrointestinalen Malignome und ca. 5000 neuerkrankten Patienten jährlich in Deutschland ebenfalls als eher seltene Erkrankung anzusehen [3, 4]. Studien konnten jedoch in den letzten Jahren weltweit eine deutlich ansteigende Inzidenz vor allem der intrahepatischen malignen Gallengangstumoren aufzeigen [3, 5, 6], wobei die Ursachen für diese Entwicklung bisher ungeklärt sind.

## 1.2. Therapie und Prognose

Die radikale chirurgische R0-Resektion stellt sowohl für das Pankreas- als auch für das Gallengangskarzinom die einzige kurative Therapieoption dar, wobei Resektabilitätsraten von 20-30% selten überschritten werden. Im Falle einer erfolgreichen R0-Resektion können 5-Jahres-Überlebensraten von 40% oder mehr erreicht werden, wobei ein Großteil aller Patienten aufgrund des oft bei Diagnosestellung schon fortgeschrittenen Stadiums eine mittlere Überlebensdauer von mehr als 20 Monaten selten erreicht [4, 7-9].

Insgesamt wird für Pankreaskarzinompatienten in Deutschland eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 7-8% beschrieben, was mit aktuellen Daten aus den USA (6%) übereinstimmt. Patienten mit Gallengangskarzinomen erreichen etwas bessere, insgesamt aber ebenfalls unzufriedenstellende 5-Jahres-Überlebensraten von 10-20% [4, 10].

Auch durch den Einsatz unterstützender Chemotherapiekonzepte konnte in den letzten 20 Jahren das Überleben der betroffenen Patienten nur unzureichend verlängert werden (s. Abb. 1).

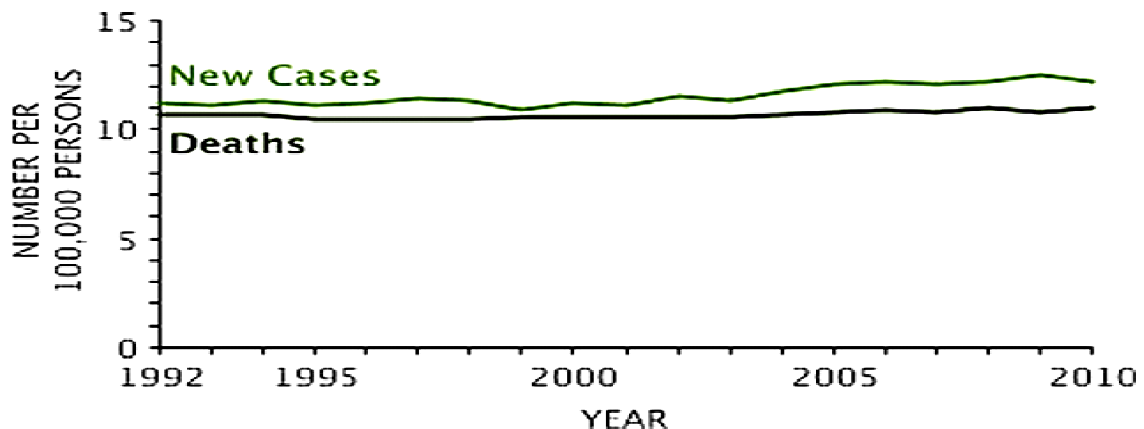


Abb. 1: Pankreaskarzinom: Anzahl von Neuerkrankungen und Todesfällen (pro 100.000) in den USA in den Jahren 1992-2010. Es zeigt sich ein leichter Anstieg bei den Neuerkrankungen bei konstanter Todesfallrate. [modifiziert nach National Cancer Institute]

Durch eine Gemcitabine- oder 5-FU-basierte adjuvante Chemotherapie, welche gemäß S3-Leitlinie nach einer kurativ intendierten Resektion eines Pankreaskarzinoms im Stadium UICC I-III empfohlen wird, wurde für das duktales Pankreaskarzinom im Rahmen mehrerer Studien zwar ein Überlebensvorteil erzielt [11-14], welcher jedoch das 5-Jahresüberleben der Patienten durchschnittlich lediglich um ca. 10% verbesserte. Neue Konzepte, beispielsweise durch die Anwendung einer Kombinationstherapie von Gemcitabine mit nab-Paclitaxel konnten für Patienten mit metastasiertem

Pankreaskarzinom in ersten Phase-III-Studien zwar eine statistische Verlängerung des Überlebens erzielen, wobei der mediane Überlebensvorteil aber nur 1,8 Monate betrug [15].

Für das Cholangiokarzinom ist derzeit keine effektive adjuvante Chemotherapie verfügbar. Im Rahmen der ABC-02-Studie zeigte sich ein leichter Überlebensvorteil für eine Kombinationstherapie aus Gemcitabine und Cisplatin für Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Gallengangskarzinom [16], so dass diese Kombination derzeit als Standardtherapie gilt. Neue Substanzen, wie beispielsweise der EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib werden derzeit in Phase-III-Studien untersucht, die bisherigen Ergebnisse scheinen jedoch keine grundlegende Verbesserung des Chemotherapieerfolges zu bewirken [17].

Insgesamt bleiben die Erfolge der Chemotherapieregime für beide Tumorentitäten häufig unzureichend, so dass für die meisten Patienten die Diagnose eines biliopankreatischen Karzinoms oftmals eine infauste Prognose darstellt.

### ***1.3. Langzeitüberleben und Notwendigkeit valider Prognosefaktoren***

Trotz dieser für den Großteil der Patienten erwiesenen schlechten Prognose, gelang es im Rahmen großer Studien dennoch wiederholt, Patienten mit Langzeitüberleben zu detektieren [9, 18, 19]. Die Suche nach den Ursachen für die große Variabilität im Überleben der Patienten ist derzeit noch nicht abgeschlossen. Allein durch die Betrachtung der derzeit üblichen histopathologischen Prognosefaktoren (z.B. Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Resektionsrand etc.) kann das Langzeitüberleben für den einzelnen Patienten mit einem Karzinom des biliopankreatischen Systems derzeit nicht valide prognostiziert werden. Es erscheint jedoch sinnvoll, durch aussagekräftige prädiktive Faktoren Hochrisikopatienten sowie prognostisch günstige Patienten frühzeitig zu identifizieren und diese Information in die Entscheidungsfindung und Risikoabschätzung der Patienten einzubeziehen. Hierdurch kann eine optimierte individualisierte Therapieentscheidung getroffen werden, welche sekundär mit einem verbesserten Patientenüberleben verbunden sein könnte. In der Vergangenheit beschränkte sich die Suche nach prognostischen Faktoren größtenteils auf die Auswertung der standardmäßig erhobenen histopathologischen Parameter, wobei die Ergebnisse zahlreicher Studien oft widersprüchlich waren und die Aussagekraft der einzelnen Parameter heute weiterhin in der Diskussion steht [8, 20-25]. Normogramme,

welche durch eine Kombination verschiedener Prognosefaktoren die individuelle Fehlerwahrscheinlichkeit reduzieren sollen, zeigen vielversprechende Ansätze, stellen aber derzeit noch keine etablierte Methode dar [26, 27].

Als grundsätzlicher Nachteil wird in diesem Zusammenhang zudem kritisiert, dass die histopathologischen Parameter fast ausschließlich postoperativ erhoben werden können und somit eher den Erfolg des operativen Vorgehens wiedergeben als eine Aussage über die Aggressivität des Tumors selbst zuzulassen. Zudem bleiben essentielle das Überleben beeinflussende Faktoren, wie z.B. die Tumoraggressivität oder das operative Trauma, unbeachtet. Die Suche nach neueren aussagekräftigeren prognostischen Faktoren ist daher unbedingt notwendig.

#### **1.4. Fragestellung der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit analysiert auf zwei Wegen Möglichkeiten der Verbesserung des Überlebens von Patienten mit biliopankreatischem Karzinom. Zum einen soll durch die hier vorgelegten Untersuchungen neue sowohl auf klinischen als auch auf zellbiologischen Erkenntnissen beruhende Prognosefaktoren für Patienten mit biliopankreatischen Karzinomen untersucht werden. Durch eine valide Prädiktion könnten individualisierte Therapieentscheidungen getroffen werden, welche durch Optimierung der Therapieoptionen bei gleichzeitiger Reduktion der Risiken direkte Auswirkungen auf das Patientenüberleben haben könnten.

Neben den erwähnten histopathologischen Parametern lassen sich auch aus dem klinischen Verlauf eines Patienten relevante Informationen gewinnen, welche die Prognose der Patienten wesentlich beeinflussen. Der operative Eingriff als solcher stellt für die Patienten eine Belastung sowie ein relevantes Risiko dar, was Auswirkungen auf den weiteren Verlauf und damit schließlich auf das Überleben der Patienten haben könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der klinische Einfluss, welcher durch den operativen Eingriff an sich entsteht, bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom analysiert.

Mit einer Weiterentwicklung moderner molekulargenetischer Untersuchungsmethoden konnten mehrere Arbeiten Zusammenhänge zwischen der Karzinogenese und der Zellentwicklung zeigen. Es wurde gezeigt, dass Unterschiede im DNA-Gehalt der Tumorpatienten für unterschiedliche Krankheitsverläufe verantwortlich sind und somit eine Abschätzung des malignen Potentials eines Tumors zulassen. Der prädiktive Einfluss des

DNA-Gehaltes wurde daher in dieser Arbeit sowohl für das Pankreas- als auch für das Gallengangskarzinom untersucht.

Neben der Suche nach prädiktiven Faktoren beschäftigen sich tumorbiologische Studien zur Karzinogenese in letzter Zeit zunehmend mit der Identifizierung bestimmter Signaltransduktionswege, welche Schlüsselpositionen in der Entwicklung eines Karzinoms einnehmen und so gegebenenfalls Ansatzpunkte für neue Therapiekonzepte liefern könnten. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden verschiedene Signalwege identifiziert, welche über Enzyme und Botenstoffe innere und äußere Reize weiterleiten und somit wichtige biologische oder pathologische Prozesse regulieren. Inwieweit der Hedgehog-Signalweg eine prognostische Wertigkeit für das biliopankreatische Karzinom besitzt bzw. welche möglichen Therapieoptionen sich hieraus für die Patienten entwickeln könnten, ist bisher nicht ausreichend untersucht worden. Durch experimentelle in vitro- und in vivo-Untersuchungen sollte daher die Rolle des Hedgehog-Patched-Signalwegs im biliopankreatischen Karzinom beleuchtet und potentielle Ansatzpunkte für eine zielgerichtete Therapie evaluiert werden.

### ***1.5. Einschätzung der postoperativen Komplikationen mit Hilfe des Clavien-Scores***

Der Erfolg einer Operation ist mit den klassischen Parametern, welche zur Beschreibung des „Outcomes“ eines Patienten verwendet werden, nur schwer darzustellen. Zum einen lassen histopathologisches Resultat und Überleben des Patienten grundsätzlich auch auf den technischen Erfolg der Operation rückschließen, die eigentlichen Hauptrisiken, denen der Patient durch die Operation ausgesetzt ist, werden jedoch nicht berücksichtigt. Da das durch die Operation selbst ausgelöste Risiko, welches sich in intra- und postoperativen Komplikationen äußert, gerade bei größeren Eingriffen Einfluss auf die präoperative Entscheidungsfindung haben sollte, ist eine standardisierte Erfassung der perioperativen Komplikationen notwendig. Die derzeit weltweit anerkannte Klassifizierung von chirurgischen Komplikationen beruht auf der Arbeit von Clavien und Dindo[28]. Danach werden 5 Schweregrade unterschieden, welche sich wie folgt definieren:

Grad I: Jede Abweichung vom normalen postoperativen Verlauf ohne die Notwendigkeit einer medikamentösen, chirurgischen, endoskopischen oder radiologischen Intervention. Erlaubte Therapien beinhalten: Antiemetika, Antipyretika, Analgetika, Diuretika, Elektrolytlösungen, Physiotherapie, Behandlung von Wundinfekten am Bett.



- Grad II: Anwendung von medikamentöser Behandlung (mit Ausnahme der unter 1 genannten Gruppen), Bluttransfusionen, totale parenterale Ernährung
- Grad III: Notwendigkeit einer chirurgischen, endoskopischen oder radiologischen Intervention
  - Grad IIIa: nicht unter Vollnarkose
  - Grad IIIb: unter Vollnarkose
- Grad IV: Lebensbedrohliche Komplikation, welche eine intensivmedizinische Behandlung erfordert
  - Grad IVa: singuläre Organdysfunktion (inklusive Dialyse)
  - Grad IVb: Multiorgandysfunktion
- Grad V: Tod des Patienten

Durch die standardisierte Erfassung der chirurgischen Komplikationen, welche mittlerweile in Großteilen der Chirurgie seine Anwendung gefunden hat, lassen sich die Ergebnisse einer operativen Therapie objektiv vergleichen. Dadurch wird es zudem ermöglicht, den Einfluss der Operation auf den Langzeitverlauf der Patienten zu evaluieren und somit die prognostische Wertigkeit des operativen Eingriffes als Teil der Therapie zu ermitteln. In den letzten Jahren wurden daher in Studien vermehrt die direkten Auswirkungen des operativen Eingriffes auf das langfristige Überleben von Tumorpatienten evaluiert. Der Einfluss der perioperativen Komplikationen auf das Langzeitüberleben von Patienten mit Pankreaskopfkarcinom wurde allerdings bisher in der Literatur nicht beleuchtet, stellt jedoch einen relevanten Baustein in der Abschätzung der Prognose dieser Patienten dar und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit analysiert.

### **1.6. DNA-Ploidie und DNA-Index**

Bereits vor einigen Jahren konnte in Studien gezeigt werden, dass in der DNA maligner Tumoren oftmals numerische Chromosomenaberrationen gefunden werden. Weger et al. gelang schon Ende der 80er Jahre der Nachweis einer engen Korrelation zwischen DNA-Ploidie-Status und dem Überleben von Pankreaskarzinompatienten [29]. Weitere Studien unterstrichen in der Folge die schlechte Prognose von aneuploiden Tumoren im Vergleich zu diploiden Chromosomensätzen auch für eine Reihe weiterer solider Karzinome, wie z.B. dem Endometrium-, Mamma- oder dem Kolonkarzinom [30, 31]. Dennoch waren die Ergebnisse der meist retrospektiven Studien oftmals kontrovers und die Sensitivität der Durchflusszytometrie zu gering, so dass die Ploidie lange Zeit nicht mehr als

prognostischer Marker in Betracht gezogen wurde. Erst durch die Einführung verbesserter Methoden, wie der Image Zytometrie, welche im Vergleich zu der früher angewandten Durchflusszytometrie als deutlich sensitiver und reproduzierbar angesehen wird, wurde in den letzten Jahren vermehrt wieder die DNA-Ploidie als möglicher Prognosemarker verschiedener Karzinome analysiert [30, 32, 33]. Aufgrund der verbesserten Sensitivität können kleinere Änderungen im DNA-Gehalt besser detektiert werden und mittels DNA-Index, welcher sich als Quotient des mittleren nuklearen DNA-Gehaltes der Tumorzellen und einer euploiden Kontrollgruppe ergibt, valide angegeben werden (Abb. 2).

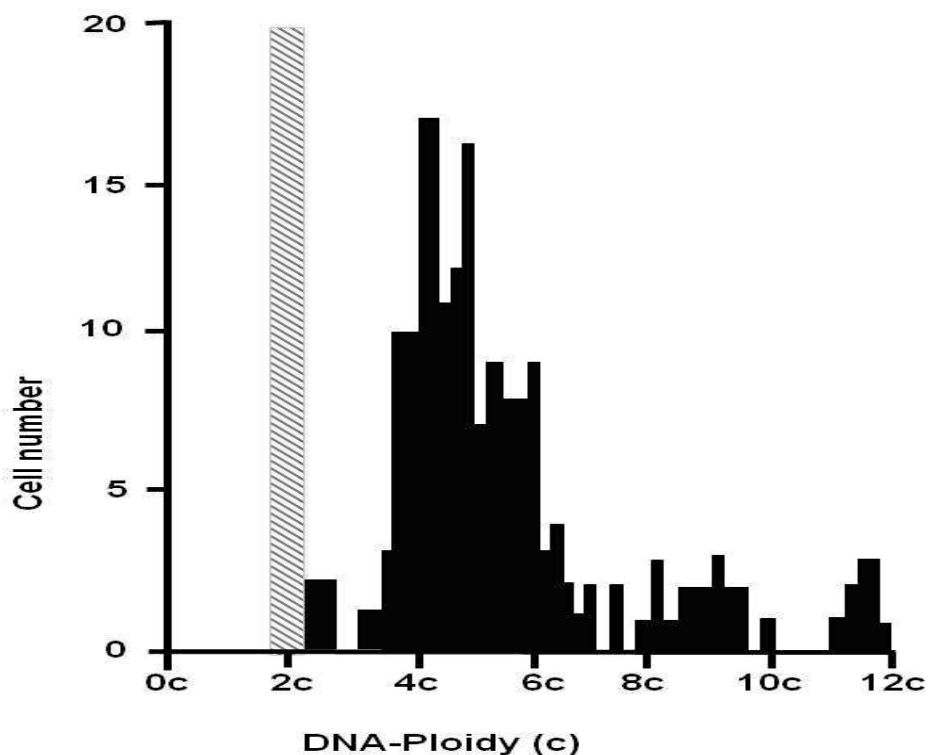


Abb. 2: Image-zytometrische Analyse des DNA-Gehaltes (hier bei intrahepatischen Cholangiokarzinomzellen): Der DNA-Gehalt von 900 CCC-Zellen eines Patienten wird gemessen und das Ergebnis als DNA-Histogramm angegeben. Es zeigt sich hier eine heterogene Verteilung (2,8c bis 12c). Der DNA-Index in diesem Beispiel beträgt 3,39.

Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der Untersuchung frischer Tumorproben, die im Vergleich zu den paraffineingebetteten Proben früherer Studien aussagekräftigere Analysen des DNA-Gehaltes erlauben. Die prognostische Wertigkeit des DNA-Index wurde bisher in keiner prospektiven Studie weder für das Pankreas- noch für das intrahepatische Cholangiokarzinom analysiert und war daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### 1.7. Der Hedgehog-Signalweg

Der Hedgehog-Signalweg beschreibt eine Gruppe von sezernierenden Proteinen, welche verschiedene Prozesse, vor allem während der Embryonalentwicklung steuert. Bei den Mammalia werden derzeit 3 verschiedene Homologe des primär von Nüsslein-Volhard et al. bei *Drosophila* entdeckten Hedgehog-Morphogens beschrieben: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh) [34]. Das für die Embryonalentwicklung wichtige Shh steuert wichtige Entwicklungsschritte in der Rechts-Links-Asymmetrie und der Entwicklung des Neuralrohrs der Somiten. Die Signalkaskade des Shh-Signalweges in den Zielzellen wird wie folgt übertragen: Der Rezeptorkomplex in den Zielzellen wird aus den Proteinen Patched (Ptch) und Smoothened (Smo) gebildet. Ohne die Bindung von Shh wird Smo durch Ptch inhibiert, was zu einer Inaktivierung der Signalübertragung auf die nachfolgenden Kaskadenproteine Fused, Costal-2 und Gli führt. Bei Aktivierung des Signalweges durch die Bindung von Shh an den Rezeptorkomplex wird Gli in eine Aktivatorform gebracht, welche im Zellkern eine Aktivierung der Hedgehog-Zielgene bewirkt. (s. Abb. 3).

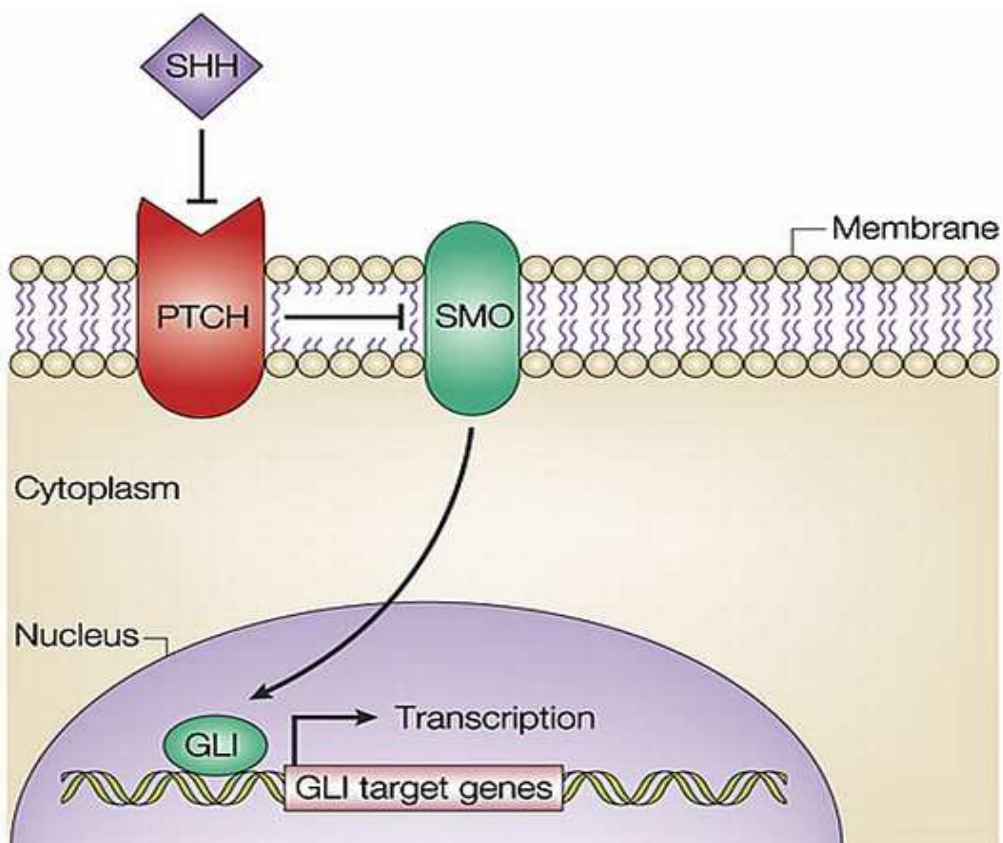


Abb. 3: Der Hedgehog-Signalweg [Abbildung modifiziert nach [35]]

Erste Hinweise darauf, dass der Shh-Signalweg auch bei der Karzinogenese verschiedener humaner Malignome eine Rolle spielen könnte, wurden bereits Mitte der neunziger Jahre veröffentlicht. In ersten Studien zeigte sich eine Verbindung der Signalwegsaktivierung mit der Entstehung des nävoiden Basalzellkarzinoms sowie des desmoplastischen Medulloblastoms [36, 37]. Anschließende Studien konnten schließlich Verbindungen zwischen der Aktivierung des Shh-Signalwegs und weiteren Malignomen feststellen. Berman stellte 2003 eine Überexpression der Zielgene Gli und Patched in gastrointestinalen Tumoren fest [38], ehe Thayer et al. im Mausmodell eine Verbindung zwischen der Überexpression von Shh und dem humanen Pankreaskarzinom nachweisen konnte [39]. Morton et al. zeigten zudem, dass die pankreatische Tumorigenese auf multiplen Wegen durch Shh aktiviert zu sein scheint [40].

Durch die zunehmende Erkenntnis der Rolle des Shh-Signalweges in der Entstehung verschiedener humaner Karzinome wurde in zahlreichen Untersuchungen nach Inhibierungsmöglichkeiten des Signalweges gesucht. Neben dem natürlich vorkommenden steroidal Alkaloid Cyclopamin, welches zu einer Blockade von Smo führt, konnten in weiteren Studien auch synthetische, weniger toxische Hedgehog-Inhibitoren entwickelt werden, welche vielversprechende Ergebnisse in Zellkulturen sowie ersten Mausversuchen zeigen konnten. Während beispielsweise Berman et al. eine Inhibierung der Tumorproliferation durch die Behandlung von Medulloblastomen im Mausmodell mit dem synthetischen Smo-Antagonist GDC-0449 zeigte [37], konnten weitere Studien auch für die Smo-Inhibitoren IPI-926 und BMS-833923 vielversprechende Ergebnisse vorweisen [41-43].

Die Rolle des Shh-Signalweges für das humane Karzinom des biliopankreatischen Systems sowie die möglichen therapeutischen Optionen durch eine Inhibition der Signalkaskade für Patienten mit Pankreas- und Gallengangskarzinom sind trotz des vielversprechenden Ansatzes noch nicht abschließend geklärt und waren daher Ziel der vorliegenden Arbeit.

## 2. Darstellung der eigenen Arbeiten

### 2.1. *Prognostischer Einfluss der postoperativen Komplikationen auf das Langzeitüberleben von Pankreaskarzinompatienten*

Publikation 1: Postoperative complications deteriorate long-term outcome in pancreatic cancer patients.  
**Kamphues C**, Bova R, Schricke D, Hippler-Benscheidt M, Klauschen F, Stenzinger A, Seehofer D, Glanemann M, Neuhaus P, Bahra M.  
Annals of Surgical Oncology. 2012 Mar;19(3):856-63.  
doi: 10.1245/s10434-011-2041-4.

Der Einfluss der chirurgischen Komplikationen auf das Langzeitüberleben von Patienten nach einer Pankreasresektion aufgrund eines Pankreaskopfkarzinoms wurde bisher nicht ausreichend evaluiert. Im Rahmen dieser Langzeitstudie wurden insgesamt 428 Patienten, die in einem 17-Jahres-Zeitraum aufgrund der gesicherten Diagnose eines Adenokarzinoms des Pankreaskopfes in unserem Zentrum operiert wurden, hinsichtlich der prognostischen Wertigkeit der chirurgischen Komplikationen im Vergleich zu den üblichen histopathologischen Parametern untersucht. Eine Einteilung der chirurgischen Komplikationen erfolgte nach der oben erwähnten Klassifikation von Clavien, wobei postoperativ im Krankenhaus verstorbene Patienten (3.2%) von der Langzeitanalyse ausgeschlossen wurden. Insgesamt wurden 198 chirurgische Komplikationen bei 124 Patienten (29.8%) dokumentiert, wobei die postoperative Wundinfektion mit 13.8% die häufigste Komplikation darstellte. Nicht-chirurgische Komplikationen traten bei 55 Patienten (12.8%) auf. Die Gesamtrate an postoperativen Komplikationen betrug 32.7% in der gesamten Kohorte bei einem medianen Überleben von 15.5 Monaten. In der univariaten Überlebensanalyse zeigte sich ein signifikanter Einfluss der folgenden Parameter auf das Patientenüberleben: Alter, T-Stadium, Lymphknotenstatus, Grading, R-Status, UICC-Stadium, adjuvante Chemotherapie, postoperative Komplikationen, schwerwiegende Komplikationen (Grad III-IV), Re-Operation. Die multivariate Überlebensanalyse reduzierte die Anzahl der prognostisch signifikanten Faktoren auf die Parameter Grading ( $p < 0.001$ ), R-Status ( $p = 0.001$ ), Lymphknotenstatus ( $p = 0.003$ ) sowie das Auftreten schwerwiegender Komplikationen ( $p = 0.002$ ). Das mediane Überleben der Patienten, die postoperativ eine Komplikation Grad III oder IV erlitten, war mit 12.4 Monaten signifikant kürzer als bei den Patienten, bei denen keine oder eine geringergradige Komplikation dokumentiert wurde (16.5 Monate,  $p = 0.002$ ).

## 2.2. Prognostische Wertigkeit des DNA-Index beim biliopankreatischen Karzinom

### 2.2.1. DNA-Index als Prognosefaktor des Pankreaskarzinoms

Publikation 2: DNA Index as a Strong Prognostic Factor in Patients With Adenocarcinoma of the Pancreatic Head: Results of a 5-Year Prospective Study.  
**Kamphues C**, Al-Abadi H, Dürr A, Al-Abadi N, Schricke D, Bova R, Müller V, Stenzinger A, Klauschen F, Seehofer D, Neuhaus P, Bahra M.  
Pancreas. 2013 Jul;42(5):807-12.  
doi: 10.1097/MPA.0b013e3182773eb6.

Zur Beurteilung der prognostischen Wertigkeit des DNA-Index bei Adenokarzinomen des Pankreaskopfes wurden im Rahmen einer prospektiven Studie insgesamt 61 Patienten eingeschlossen, die im Zeitraum zwischen 2000 und 2006 in unserer Klinik eine Resektion eines Pankreaskopfkarcinoms erhielten. Die Bestimmung des DNA-Index der kryokonservierten Proben wurde mittels DNA-Image-Zytometrie durchgeführt und die Ergebnisse zusammen mit den üblichen histopathologischen Parametern mit dem Patientenüberleben korreliert. Der mediane DNA-Index der gesamten Kohorte betrug 1.9 (1.0 – 2.5), wobei 24.6% der Tumoren einen diploiden Chromosomensatz aufwiesen, während 75.6% der Tumoren non-diploid waren. Die univariate Überlebensanalyse zeigte einen signifikanten Zusammenhang des Patientenüberlebens mit den Faktoren T-Stadium, Lymphknotenstatus, Lymphangioinvasion und DNA-Index. Die daraufhin durchgeführte multivariate Analyse identifizierte den DNA-Index ( $p = 0.026$ ) gemeinsam mit dem Lymphknotenstatus ( $p = 0.007$ ) als einzige unabhängige prognostischen Marker. Basierend auf einem optimalen Cut-off-Wert von 2.0 zeigte der DNA-Index zudem eine hohe prädiktive Wertigkeit für ein Überleben von weniger als 2 Jahren (AUROC = 0.79) mit einem positiv prädiktiven Wert von 89.7%. Durch eine Kombination der beiden Faktoren DNA-Index und Lymphknotenstatus konnte eine hoch signifikante Vorhersage des Patientenüberlebens erreicht werden. Während ein niedriger DNA-Index ( $< 2.0$ ) in Kombination mit einem negativen Lymphknotenstatus (N0) ein medianes Überleben von 47.6 Monaten ermöglichte, zeigten alle anderen Kombinationen deutlich schlechtere Überlebensergebnisse. So wurde bei Patienten mit der ungünstigen Kombination eines hohen DNA-Index ( $> 2.0$ ) in Verbindung mit positiven Lymphknoten lediglich ein medianes Überleben von 12.5 Monaten dokumentiert.

## 2.2.2. DNA-Index als Prognosefaktor des intrahepatischen Cholangiokarzinoms

Publikation 3: DNA index is a strong predictive marker in intrahepatic cholangiocarcinoma: Results of a 5-year prospective study.  
**Kamphues C**, Al-Abadi N, Dürr A, Bova R, Klauschen F, Stenzinger A, Bahra M, Al-Abadi H, Neuhaus P, Seehofer D. Surg Today. 2014 Jul;44(7):1336-42  
doi: 10.1007/s00595-013-0701-7

Aufbauend auf den Resultaten der unter Publikation 2 dargestellten Studie wurde in der vorliegenden Publikation 3 der prädiktive Wert des DNA-Index auch beim intrahepatischen Cholangiokarzinom (IHC) evaluiert. Im Zeitraum zwischen 2005 und 2011 wurden 65 Patienten, bei denen aufgrund eines IHC eine Leberteilresektion durchgeführt wurde, in die Studie eingeschlossen. Der DNA-Index wurde erneut mittels Image Zytometrie aus kryokonservierten Proben ermittelt und zusammen mit den Ergebnissen der Histopathologie mit dem Überleben korreliert. Der mediane DNA-Index der gesamten Kohorte wurde mit 1.6 (0.9 – 4.3) gemessen. Die Univarianzanalyse identifizierte lediglich die Faktoren DNA-Index und T-Stadium als signifikant mit dem Überleben korrelierende Parameter, während alle anderen histopathologischen Faktoren keine prognostische Bedeutung in der Studienkohorte zeigten. Bei einem Cut-off-Wert von 1.4 wurde für die Patienten mit niedrigem DNA-Index ein 3-Jahres-Überleben von 64% errechnet, während die Patienten mit höherem Index lediglich einen 3-Jahres-Wert von 41% erreichten. Die multivariate Analyse zeigte zudem, dass sowohl der DNA-Index ( $p = 0.05$ ) als auch das T-Stadium ( $p = 0.028$ ) auch unabhängige statistisch signifikante Faktoren mit dem Überleben der Studienpatienten verbunden waren. Mit Hilfe des T-Tests konnten keine signifikanten Unterschiede im DNA-Index der folgenden histopathologischen Untergruppen gefunden werden: T1/2 vs. T3/4; N0 vs. N1; G2 vs. G3; L0 vs. L1; R0 vs. R1; and V0 vs. V1. Dies unterstreicht die Unabhängigkeit des DNA-Indexes von den üblichen prädiktiven Parametern.

## **2.3. Die Rolle des Hedgehog-Signalweges beim biliopankreatischen Karzinom**

### **2.3.1. Einfluss des Hedgehog-Signalweges beim humanen Pankreaskarzinom und Möglichkeiten der Tumorreduktion durch Signalwegsinhibition**

Publikation 4: Combination of hedgehog signaling blockage and chemotherapy leads to tumor reduction in pancreatic adenocarcinomas. Bahra M, **Kamphues C**, Boas-Knoop S, Lippert S, Esendik U, Schüller U, Hartmann W, Waha A, Neuhaus P, Heppner F, Pietsch T, Koch A. Pancreas. 2012 Mar;41(2):222-9. doi: 10.1097/MPA.0b013e31822896dd

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die klinische Relevanz des Hedgehog-Signalweges bei Patienten mit humanem Pankreaskarzinom evaluiert und aufbauend die Inhibitionsmöglichkeit des Signalweges mit spezifischen Antagonisten in der Zellkultur sowie im Mausmodell untersucht. Hierzu wurde primär die Aktivität des Hedgehog-Signalweges über eine Expressionsanalyse (RT-PCR) der mRNA der Signalweg-Zielgene PTCH1 und GLI1 in humanen Pankreaskarzinomproben gemessen. Es zeigte sich eine deutliche Überexpression der Zielgene PTCH1 (in 13 von 14 Tumorproben) und GLI1 (in 12 von 14 Tumorproben) im Vergleich zu Normalgewebe. Die im Anschluss durchgeführte Mutationsanalyse (SSCP - single strand conformation polymorphism analysis) im PTCH1 Gen zeigte Einzelnukleotidpolymorphismen, jedoch keine somatische Mutation in den analysierten Proben, so dass die Aktivierung des Signalweges als potentiell tumorassoziiert interpretiert wurde. Die Auswirkungen eines Eingreifens in den Signalweg auf das Tumorwachstum wurden mittels in-vitro-Versuchen evaluiert. Dazu wurde zunächst eine humane Pankreaskarzinomzelllinie (Capan-1) mit den Signalweginhibitoren Cyclopamin und GDC-0449 (=Hh-Antag691) behandelt und die Zellproliferation mittels XTT-Proliferationsassay und <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporationsassay gemessen. Es ergab sich hierbei für beide Antagonisten ein wachstumshemmender Effekt. Mittels eines GLI-Luciferase-Assays konnte zudem gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Cyclopamin eine dosisabhängige Reduktion der basalen Hedgehog-Aktivität erreicht wurde, was eine Verbindung der gezeigten Wachstumshemmung mit dem Hedgehog-Signalweg herstellt. Aufbauend auf die Ergebnisse der in-vitro-Versuche wurde im Anschluss die tumorinhibierende Wirkung von Cyclopamin im Rahmen eines Xenograft-Mausversuches evaluiert. Hierzu wurden humane Pankreaskarzinomzellen subkutan in die Flanke von athymen Nacktmäusen implantiert. Nach Anwachsen der Tumoren und



Cyclopamin und/oder Gemcitabine behandelt. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens in den mit Cyclopamin behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden. Die additive Gabe von Gemcitabine ergab zudem einen synergistischen Effekt in Bezug auf die TumorgroÙe.

### 2.3.2. Einfluss des Hedgehog-Signalweges beim humanen Cholangiokarzinom und Möglichkeiten der Tumorreduktion durch Signalwegsinhibition

Publikation 5: The Hedgehog pathway as a potential treatment target in human cholangiocarcinoma.  
Riedlinger D, Bahra M, Boas-Knoop S, Lippert S, Seehofer D, Bova R, Sauer IM, Neuhaus P, Koch A, **Kamphues C**.  
J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014 Aug;21(8):607-15  
doi: 10.1002/jhbp.107

In einem, weiteren Projekt, welches auf den Arbeiten zum Hedgehog-Signalweg beim Pankreaskarzinom aufbaut, sollte im Rahmen dieser Versuchsreihe Rolle des Hedgehog-Signalweges im humanen Cholangiokarzinom untersucht werden. Hierzu erfolgte zunächst die Analyse der Zielgenexpression des Signalweges (SHH, GLI1, PTCH1) an einem Kollektiv von 50 Patienten, die an unserem Zentrum eine Leberteilresektion aufgrund eines CCCs erhielten, mittels quantitativer TaqMan-Real-Time-PCR. Es zeigte sich in eine Aktivierung des Signalwegs in einer Subpopulation von fast 50% aller Patienten, so dass eine weitere Evaluierung des Signalwegs erfolgen konnte. Hierzu wurden zunächst die verfügbaren humanen CCC-Zelllinien TFK-1 und EGI-1 mittels Luciferase Reporter Assay auf eine Aktivierung des Signalwegs untersucht, wobei sich eine höhere Aktivität in der EGI-1 Zelllinie zeigte, welche daher für die weiteren Versuche verwendet wurde. In in-vitro Zellversuchen wurde die Möglichkeit einer Signalwegsinhibition mittels Cyclopamin und dem synthetischen Smo-Antagonisten BMS-833923 mittels XTT-Proliferationsassay analysiert. Es zeigte sich vor allem für die mit BMS-833923 behandelten Zellen ein signifikanter Abfall der Proliferationsaktivität (Reduktion um 89.4% im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe) nach fünftägiger Inkubation. Die behandelten Zellen zeigten zudem eine verringerte Expression der Hh-Signalweg-Zielgene GLI1 und PTCH1, welche erneut mittels qPCR dargestellt werden konnte. Aufbauend auf die in-vitro Resultate erfolgte nun wie bereits in der zuvor präsentierten Arbeit zum Pankreaskarzinom die weiterführende Analyse des Signalwegs in vivo. Nach Inokulation der EGI-1-Zellen in die Flanke der Nacktmäuse wurden diese nach Erreichen der vorgegebenen Tumorgröße entsprechend der Gruppenzugehörigkeit wie folgt behandelt: a) Kontrolle, b) Gemcitabine Monotherapie, c) BMS-833923 Monotherapie, d) Gemcitabine + BMS-833923. Die Analyse des Tumorstwachstums zeigte eine signifikante Reduktion des Tumorstwachstums in der Gruppe, die mit Gemcitabine +

initialen Tumorzellen verzeichneten (Gruppe a: 528%, Gruppe b: 533%, Gruppe c: 413%). In der Expressionsanalyse der Zielgene zeigte sich eine Reduktion der Signalwegsaktivität in den mit dem Antagonisten behandelten Gruppen, wobei der Effekt hier im Vergleich zum Tumorzellwachstum deutlich geringer ausfiel.

### 3. Diskussion

Trotz der insgesamt schlechten Prognose von Patienten mit Karzinomen des biliopankreatischen Systems wird in vielen Studien eine große Variabilität der Überlebenszeiträume der Patienten beschrieben. Das Erreichen eines Langzeitüberleben ist erwiesenermaßen für eine Subpopulation der Patienten möglich, wohingegen andere Patienten trotz einer kurativen R0-Resektion des Tumors nur unzufriedenstellende Überlebenszeiten von weniger als 2 Jahren erreichen [5, 9]. Die Identifikation verlässlicher prognostischer Parameter zur Selektion von Hochrisikopatienten ist daher von großer Bedeutung, um Therapieentscheidungen individualisiert treffen zu können. Mit einer validen Abschätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit eines Patienten können Entscheidungen für oder gegen eine chirurgische oder chemotherapeutische Therapie einfacher getroffen werden und somit überlebensrelevante Risiken vermieden werden.

Es wird vermutet, dass das Überleben von Patienten nach operativer Resektion eines Karzinoms des biliopankreatischen Systems von multiplen Faktoren beeinflusst wird. Neben immer neuen zellbiologischen Erkenntnissen auf dem Gebiet der Karzinogenese sollte auch der Einfluss des operativen Eingriffs an sich berücksichtigt werden. Zahlreiche Arbeiten konnten belegen, dass Resektionen biliopankreatischer Karzinome in großen Zentren heutzutage sicher durchgeführt werden [44-46]. An einem Kollektiv von 428 Patienten, die in unserer Klinik eine Pankreaskopfresektion aufgrund eines Karzinoms erhielten, wurde eine Mortalitätsrate von 3,2 % dokumentiert, was das geringe perioperative Sterblichkeitsrisiko, anderer großer Zentren unterstreicht [44-46]. Aus nicht-spezialisierten Kliniken werden jedoch weiterhin nicht selten postoperative Mortalitätsraten von mehr als 10% berichtet [47], was die Notwendigkeit der Zentrenbildung zur Therapie komplexer biliopankreatischer Tumoren bei teilweise extendierten operativen Eingriffen bekräftigt. Inwieweit auch das Auftreten intra- und postoperativer Komplikationen, welche nicht zum Tod des Patienten führen, das Langzeitüberleben der Patienten beeinflusst, ist bis heute nicht suffizient evaluiert worden. Zwar konnten frühere Studien postoperative Komplikationsraten von teilweise mehr als 60% nach Pankreaskopfresektionen aufzeigen [48], jedoch werden durch zunehmende Optimierung der intra- und perioperativen Therapie heutzutage Morbiditätsrate von ca. 30% nach Pankreasresektionen angegeben [49], was gut mit den eigenen Daten korreliert (chirurgische Komplikationsrate 28,9%). Von den dokumentierten Komplikationen stellten sich in der eigenen Arbeit etwa 50% als weniger schwerwiegend heraus, während 16,6% aller Patienten mit einer mindestens drittgradigen Komplikation auffielen. In größeren Fallserien von beispielsweise Kang et al. [50] und Raut et al. [21] konnte gezeigt werden,

dass schwerwiegende Komplikationen einen negativen Effekt auf das „Outcome“ von Pankreaskarzinompatienten haben, wobei eine reproduzierbare Standardisierung der Komplikationen bisher in keiner Studie erfolgte.

Die Klassifizierung der am eigenen Patientengut dokumentierten Komplikationen nach der etablierten Einteilung nach Clavien und Dindo [28] ermöglicht eine detaillierte Aufschlüsselung der postoperativen Komplikationen sowie eine separate Beurteilung des Einflusses des Schweregrades der Komplikationen auf das Patientenüberleben. Anhand der eigenen Patienten konnte gezeigt werden, dass ein komplikationsfreier postoperativer Verlauf mit einem signifikant verlängerten Patientenüberleben korreliert. Das Auftreten schwerwiegender Komplikationen (Grad III-IV) welche nicht zum Tod des Patienten geführt haben, ist im Vergleich mit den Patienten ohne schwerwiegende Komplikation mit einem signifikant kürzeren Überleben assoziiert (12,4 Monate vs. 16,5 Monate;  $p = 0,002$ ) und stellt sowohl in der uni- als auch in der multivariaten Analyse einen starken prognostischen Faktor dar. In der durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass der prognostische Einfluss der postoperativen Komplikationen zumindest vergleichbar ist mit dem in zahlreichen Studien nachgewiesenen Einfluss etablierter histopathologischer Prognoseparameter, wie z.B. dem Grading, R-Status oder Lymphknotenbefall, und somit in das Gesamtkonzept der Prognosestellung der Patienten mit einbezogen werden sollte. Zudem erlaubt die vorliegende Arbeit die Schlussfolgerung, dass durch Reduktion der Komplikationsrate eine Verbesserung im Langzeitüberleben von Patienten mit biliopankreatischem Karzinom erreicht werden kann, wobei dies zum einen durch Zentrenbildung zum anderen auch durch weitere Optimierung der perioperativen Maßnahmen erreicht werden kann.

Welcher Kausalzusammenhang zwischen den postoperativen Komplikationen und dem Langzeitüberleben besteht, kann anhand der vorliegenden Studie nicht abschließend beantwortet werden. Es bleibt zu vermuten, dass der verspätete Beginn oder der Verzicht einer postoperativen Chemotherapie aufgrund perioperativer Komplikationen einen Einfluss auf das Langzeitüberleben haben könnte. Arbeiten zum kolorektalen Karzinom konnten bereits zeigen, dass postoperative Komplikationen signifikant mit dem Auslassen der postoperativen Chemotherapie assoziiert sind [51]. Analog dazu zeigt auch die Arbeit von Merkow et al., in der mehr als 2000 Patienten nach Pankreasresektion analysiert wurden, dass durch das Auftreten schwerwiegender postoperativer Komplikationen die Wahrscheinlichkeit, keine adjuvante Chemotherapie zu erhalten, mehr als verdoppelt wird [52]. Ebenso führten postoperative Komplikationen zu einem signifikant späteren Beginn der adjuvanten Chemotherapie (70 Tage vs. 52 Tage), wobei eine direkte Verbindung

zum Patientenüberleben in dieser Studie nur vermutet wurde und nicht durch eine Überlebensanalyse belegt werden konnte [52]. Obwohl auch in anderen Pankreaskarzinom-Studien bis zu 10% der in den Behandlungsarm eingeschlossenen Patienten aufgrund postoperativer Komplikationen keine adjuvante Therapie erhalten haben [12, 53], bleibt die Schlussfolgerung, dass der Verzicht bzw. der verspätete Beginn der Chemotherapie ursächlich für das schlechtere Patientenüberleben bei Pankreaskarzinompatienten sei, bisher nicht bewiesen. Bei Patienten mit Rektumkarzinom stellten Tevis et al. anhand einer retrospektiven Analyse von 355 Patienten hingegen fest, dass postoperative Komplikationen zu einer Verzögerung des Chemotherapiebeginns führen und damit direkt mit einem schlechteren Überleben verbunden waren [54]. Weitere Studien sind notwendig um diesen Effekt auch beim biliopankreatischen Karzinom zu untersuchen und gegebenenfalls auch andere Ursachen für den negativen Überlebenseffekt der postoperativen Komplikationen aufzuzeigen.

Die Prognose eines Patienten mit biliopankreatischen Karzinom wird einerseits somit vom klinischen Verlauf beeinflusst, andererseits ist davon auszugehen, dass auch tumorbiologische Aspekte interindividuelle Unterschiede im Patientenergebnis bewirken. Während die standardhistopathologischen Parameter, wie z.B. der R-Status, in erster Linie das operative Ergebnis beurteilen, ist eine Aussage zur eigentlichen Tumorbiologie durch diese Faktoren nicht möglich. Zahlreiche Studien beschäftigen sich daher schon seit langem mit biologischen Aspekten der Tumorzellen, mit denen die tumorspezifische Aggressivität dargestellt werden soll. Ein aussagekräftiger Aspekt in diesem Zusammenhang könnte der DNA-Gehalt der Tumorzelle darstellen. Seit den ersten Studien von Weger et al. Ende der 80er Jahre ist bekannt, dass Änderungen im DNA-Gehalt mit einer vermehrten Inzidenz maligner Erkrankungen einhergehen [29]. Mehrere Studien, wie z.B. von Porschen et al. [55] und Böttger et al. [56], konnten auch für das Pankreaskarzinom mittels Durchflusszytometrie zeigen, dass ein diploider Chromosomensatz in der Tumorzelle mit einem signifikant besseren Überleben assoziiert ist im Vergleich mit aneuploiden Malignomen. Im Gegensatz hierzu gelang es einigen Studien jedoch nicht, einen prädiktiven Effekt der DNA-Ploidie nachzuweisen, so dass der Einfluss der DNA-Ploidie auf das Patientenüberleben bisher kontrovers diskutiert wurde [57, 58]. Die Entwicklung neuer diagnostischer Methoden (DNA Image Zytometrie, Untersuchung von Frischgewebe), welche sich in der neueren Vergangenheit gegenüber der gebräuchlichen Durchflusszytometrie paraffin-eingebetteter Proben als überlegen erwiesen haben, ist jedoch in den letzten Jahren wieder vermehrt die mögliche prognostische Wertigkeit der DNA-Ploidie in den Fokus gerückt. Alanen et al. konnte in

einer Studie an Pankreaskarzinomzellen zeigen, dass der DNA-Index der DNA-Ploidie in der prädiktiven Wertigkeit überlegen ist, was durch die vorliegende Studie bestätigt werden kann [59]. Anhand des eigenen hier dargestellten Kollektives zeigt sich, dass der DNA-Index in der univariaten Überlebensanalyse einen hochsignifikanten prädiktiven Faktor beim Adenokarzinom des Pankreaskopfes darstellt ( $p = 0,008$ ), während die DNA-Ploidie keine statistisch signifikante Wertigkeit erreicht ( $p = 0,099$ ). In der multivariaten Analyse der eigenen Arbeit wird zudem deutlich, dass neben dem DNA-Index nur noch der Lymphknotenstatus einen unabhängigen prognostischen Marker darstellt, während alle anderen histopathologischen Parameter keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten hatten. Weiterhin konnte in der Studie keine Korrelation zwischen DNA-Index und den histopathologischen Faktoren detektiert werden, was den DNA-Index als neuen unabhängigen prognostischen Marker bestätigt.

Zudem erlaubt eine Kombination des DNA-Index mit dem ebenfalls signifikant prädiktiven Lymphknotenstatus eine weitere Optimierung der prädiktiven Wertigkeit. Patienten mit niedrigem DNA-Index ( $< 2,0$ ) und gleichzeitig negativen Lymphknotenstatus (N0) erreichten dementsprechend ein deutlich längeres Überleben als Patienten mit hohem DNA-Index und positivem Lymphknotenbefall (47,6 Monate vs. 12,5 Monate). Der DNA-Index könnte somit als sinnvoller Parameter bei der Identifizierung von Hochrisikopatienten beim Pankreaskarzinom miteinbezogen werden und bei Behandlungsentscheidungen eine sinnvolle Rolle spielen, wie dies bei anderen Malignomen bereits in der Praxis der Fall ist. Susini et al. konnten beispielsweise an einem Kollektiv von 174 Endometriumkarzinompatientinnen mittels DNA-Ploidie Hochrisikopatienten unter Patienten mit gleichem Tumordifferenzierungsgrad identifizieren [33]. Auch bei der Selektion von Transplantationskandidaten unter Patienten mit hepatozellulärem Karzinom in Zirrhose konnte der DNA-Index bereits als sinnvoller prognostischer Marker teilweise etabliert werden, wie die Arbeit von Jonas et al. [32] zeigt.

Obwohl Leber und Pankreas grundsätzlich als unabhängig voneinander betrachtet wurden, zeigen aktuelle Studien zuletzt eine enge histopathologische und entwicklungsbiologische Beziehung zwischen Pankreas- und Gallengangskarzinom [60-62]. Ähnlichkeiten im Expressionsverhalten entwicklungsrelevanter Proteine lassen auf einen gemeinsamen Ursprung des duktales Pankreaskarzinoms sowie des hilären Gallengangskarzinoms schließen [62]. Parallelen bei der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren (PDX1, HES1, SOX9, SOX17) sowie in der Ausbildung von Immunphänotypen unterstützen diese These [61]. Auch klinisch zeigen beide Tumoren in Bezug auf Wachstum und Prognose ähnliche Muster, so dass die in der Arbeit

adressierte Fragestellung für beide Karzinome des biliopankreatischen Systems untersucht wurde.

Aufbauend auf die dargestellte Studie beim Pankreaskarzinom wurde daher auch die prognostische Wertigkeit des DNA-Index beim intrahepatischen Cholangiokarzinom evaluiert. In der ebenfalls prospektiven Studie gelang auch hier der Nachweis einer hohen prädiktiven Aussagekraft des DNA-Index. Sowohl in der uni- als auch in der multivariaten Analyse der vorliegenden Daten zeigte sich lediglich für die Parameter T-Stadium und DNA-Index eine statistische Signifikanz, wobei auch hier eine Korrelation von DNA-Index und histopathologischen Parametern ausgeschlossen werden konnte. Die bereits zuvor für das Pankreaskarzinom gezogene Schlussfolgerung, dass der DNA-Index als unabhängiger prädiktiver Marker in die Therapieentscheidungen miteinbezogen werden sollte, kann somit auch auf das intrahepatische Cholangiokarzinom ausgedehnt werden. Obwohl in der Vergangenheit kleinere Fallserien bereits einen Einfluss der DNA-Ploidie auf das Tumorwachstum auch bei Gallengangstumoren vermuten ließen [63, 64], stellt die vorliegende Studie die erste prospektiv durchgeführte Studie zur prognostischen Wertigkeit des DNA-Index unter Verwendung der DNA Image Zytometrie dar. Neben den bereits genannten Vorteilen des DNA-Index bei der Prognoseermittlung von Patienten mit biliopankreatischem Karzinom kann die Probengewinnung zudem nicht ausschließlich intraoperativ sondern auch durch radiologisch-gestützte Punktion bzw. Feinnadelaspirationsbiopsie erfolgen. Bergquist et al. gelang außerdem die Ploidieanalyse anhand von Proben, die durch Bürstenzytologie im Rahmen einer ERCP gewonnen werden konnten [65], so dass der DNA-Index somit, im Gegensatz zu den meisten histopathologischen Parametern, bereits präoperativ ermittelt werden kann und das Ergebnis somit in die Entscheidung über eine mögliche Resektion mit einbezogen werden könnte. Der DNA-Index stellt somit sowohl für das Pankreas- als auch für das Gallengangskarzinom einen potentiellen prädiktiven Marker dar, der den meisten histopathologischen Parametern überlegen erscheint und bereits in der präoperativen Entscheidungsfindung hilfreich sein könnte. Eigene Untersuchungen weisen zudem auf eine mögliche Rolle des DNA-Index bei der Malignitätseinstufung der intraduktalen papillären muzinösen Neoplasie (IPMN) des Pankreas hin, sodass weitere Untersuchungen gegebenenfalls noch eine Ausweitung des Anwendungsgebietes des DNA-Index ermöglichen könnten.

Diese aus den Ergebnissen der eigenen Studien gezogenen Aussagen könnten in beiden Studien durch jeweils relativ kleine Patientenzahlen in Ihrer Aussagekraft limitiert sein. Zudem ist die Vermutung, dass sich der DNA-Index eines Karzinoms im Laufe einer



Erkrankung nicht verändert, bisher in keiner Studie evaluiert worden. Beide Studien lassen daher zwar den DNA-Index als mögliches prognostisches Werkzeug sinnvoll erscheinen, größere Studien zur Bestätigung der hier erzielten Ergebnisse und Etablierung des DNA-Index erscheinen jedoch sinnvoll.

Bei der Suche nach alternativen Therapieoptionen von Karzinompatienten ist der Fokus in den letzten Jahren zunehmend auf an der Karzinogenese beteiligte intrazelluläre Signaltransduktionswege gerichtet worden. Während die Beteiligung einiger Signalwege an der Entstehung maligner Tumoren bereits belegt ist und durch ein medikamentöses Eingreifen im Signalwegsablauf zielgerichtete Therapiekonzepte etabliert wurden (z.B. KRAS beim Kolonkarzinom), ist die Rolle des Hedgehog-Signalwegs bei Karzinomen des biliopankreatischen Systems derzeit noch nicht abschließend geklärt. Aufbauend auf die Ergebnisse der Studien von Thayer et al. [39] sowie Morton et al. [40], die einen direkten Zusammenhang zwischen einer Aktivierung des Hh-Signalwegs und der Entstehung von Pankreaskarzinomen vermuten ließen, konnte auch in der eigenen Arbeit an humanen Pankreaskarzinomzellen eine Überexpression der Signalwegszielgene PTCH1 und GLI1 gezeigt werden, was auf eine Aktivierung des Signalwegs schließen ließ. Aufgrund der Beteiligung des Hh-Signalwegs bei der Entstehung humaner Malignome haben zahlreiche Studien in der Vergangenheit die Möglichkeit einer Signalwegsinhibition als therapeutisches Konzept untersucht. Das steroidale Alkaloid Cyclopamin, welches aus der californischen Kornlilie gewonnen wird, zeigte durch eine Inhibition des G-Protein gebundenen Signalwegrezeptors Smoothed (Smo) eine antitumoröse Wirkung bei verschiedenen Tumoren [37, 41, 66]. Auch der inhibitorische Effekt synthetisch hergestellter Hh-Antagonisten, wie z.B. IPI-926, Hh-Antag-691, BMS-833923 etc., wird derzeit an einer Reihe von Tumoren evaluiert [42, 43, 67-70]. In der vorliegenden Arbeit konnte in vitro gezeigt werden, dass durch eine Inhibition des Hh-Signalwegs durch Cyclopamin sowie durch den synthetischen Smo-Antagonisten Hh-Antag-691 eine Wachstumsinhibition von Pankreaskarzinomzellen erzielt werden konnte. Dies bestätigt unter anderem die Ergebnisse von Feldmann et al., welchem der Nachweis gelang, dass durch Cyclopamin eine Inhibition der Tumordinvasion und -metastasierung in Pankreaskarzinomzelllinien möglich ist [41]. Aufbauend auf die erfolgversprechenden in vitro Versuche wurde in der vorliegenden Arbeit im Rahmen eines Xenograft-Mausmodells die antitumoröse Wirkung des Hh-Antagonisten Cyclopamin evaluiert. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion des Tumordiameters bei den mit Cyclopamin behandelten Mäusen, wobei eine Verstärkung des Effektes durch die additive Gabe von Gemcitabine erzielt werden konnte. Dies unterstreicht erneut die Ergebnisse der

Arbeitsgruppe von Feldmann et al., welche im transgenen Mausmodell einen Überlebensvorteil durch Hh-Inhibition bei bestimmten Pankreaskarzinomzelllinien aufzeigen konnten [41]. Olive et al. beobachteten zudem eine synergistische Wirkung eines Hh-Antagonisten (IPI-926) mit dem Standardchemotherapeutikum Gemcitabine im Pankreaskarzinom-Mausmodell [42]. Dieser Effekt könnte durch eine verbesserte intratumorale Perfusion und somit eine erhöhte lokale Gemcitabine-Konzentration ausgelöst durch eine Verringerung des intratumoralen Stromas durch die Hh-Inhibition begründet werden. Dieser Erklärung widersprechen allerdings aktuelle Studien, welche einen direkten und indirekten proangiogenetischen Effekt des Hh-Signalwegs in malignen Pankreastumoren zeigen konnten [71, 72], so dass die Ursache des auch in der vorliegenden Studie beschriebenen klinischen Effekts unklar bleibt.

Die vorliegende Arbeit lässt auf eine mögliche Bedeutung des Hh-Signalwegs in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms schließen. Weitere Untersuchungen zur Bestätigung und Vertiefung der dargestellten Ergebnisse sind allerdings notwendig, um gegebenenfalls neue Therapiekonzepte für Patienten mit Pankreaskarzinomen zu etablieren.

Während zahlreiche Arbeiten die Rolle des Hh-Signalwegs beim Pankreaskarzinom untersuchen, ist bisher über eine mögliche Beteiligung des Signalwegs an der Karzinogenese von Cholangiokarzinomen wenig bekannt. Erste Studien ließen eine mögliche Rolle des Hh-Signalwegs auch bei der Entstehung primärer Leberzellkarzinome vermuten [73, 74], ausgiebige Untersuchung hierzu stehen derzeit jedoch noch weitestgehend aus. In der vorliegenden Arbeit wurde an humanen Gallengangskarzinomzellen (EGI-1) die Hh-Aktivität mittels Zielgenexpressionsanalyse (qPCR) ermittelt. Es zeigte sich, dass in einer Subpopulation von ca. 50% aller Patienten eine Aktivierung des Signalwegs vorlag. Die Ergebnisse der bisher einzigen ebenfalls zu diesem Thema veröffentlichte Arbeit von El-Khatib et al. [69] bestätigen eine Aktivierung des Signalwegs beim Cholangiokarzinom, wobei der Anteil der Population mit aktiviertem Signalweg mit 89% dort sogar noch größer angegeben wurde. In den auf diesen Erkenntnissen aufbauenden eigenen Zellversuchen wurde eine Inhibition des Zellwachstums durch die Hh-Antagonisten Cyclopamin sowie BMS-833923 gezeigt, wobei die in den behandelten Zellen ermittelte Zielgenexpressionsreduktion auf einen direkten antiproliferativen Effekt der Smo-Antagonisten auch beim humanen Gallengangskarzinom schließen lässt. Da komplexe interagierende Effekte des Tumors mit dem umgebenden Stroma im Rahmen von Zellkulturversuchen nicht ausreichend erfasst werden können, erfolgte auch hier die Evaluierung des Effektes einer Hh-Inhibition auf das

Tumorwachstum im Rahmen eines Xenograft-Mausversuches. In der Analyse der Tumorgröße zeigte sich ein signifikanter Effekt der Kombinationstherapie aus BMS-833923 und Gemcitabine. Während der Tumor der anderen Gruppen am Ende des Beobachtungszeitraums auf ein Vielfaches im Vergleich zum Beginn der Behandlung anwuchs (Kontrolle 528%; Gemcitabine Monotherapie 533%; BMS-833923 413%), zeigte die mit der Kombinationsgruppe behandelte Gruppe ein deutlich reduziertes Tumolvolumen (32%). Analog zur vorher dargelegten Studie zum Pankreaskarzinom konnte durch die eigenen Daten auch beim Gallengangskarzinom ein synergistischer Effekt von Hh-Inhibition und Gemcitabine nachgewiesen werden. Die Expressionsanalyse der aus den Tumorproben gewonnenen Zielgene ergab einen leichten Rückgang in den mit Antagonist behandelten Gruppen, die Effekte waren jedoch im Vergleich zur Tumorregression als eher gering einzustufen und können den klinischen Effekt nicht in ausreichendem Maß erklären. Die Gründe für dieses Phänomen, welches auch bei Untersuchungen des Hh-Signalwegs beim Pankreaskarzinom bereits beschreiben wurde, könnten in der Komplexität der Signalwege liegen, welche in Ihren Zusammenhängen bis dato nicht ausreichend geklärt sind. Zum einen könnte die Expression der im Rahmen der Studien ausgesuchten Zielgene auch durch andere Signalwege, wie beispielsweise den ras-, EGFR- oder Notch-Signalweg beeinflusst werden. Alle genannten Signalwege nehmen Schlüsselpositionen bei der Zellentwicklung ein und weisen zahlreiche bisher noch unklare Interaktionen sowie gemeinsame Transkriptionsfaktoren auf [75, 76]. Zum anderen nähren neuere Studien den Verdacht einer parakrinen nicht-kanonischen Hh-Signalübertragung, welche über noch unbekannte Mechanismen die Karzinogenese verschiedener Karzinome auch außerhalb der bekannten Signalkaskaden beeinflussen könnten [77-79].

Beide vorliegenden Untersuchungen zur Rolle des Hh-Signalwegs beim Karzinom des biliopankreatischen Systems unterstreichen eine mögliche Beteiligung des Signalwegs an der Karzinogenese. Die Möglichkeit der Inhibition des Signalwegs mittels natürlich vorkommenden oder synthetischen Antagonisten konnte in vitro und in vivo gezeigt werden, wobei der klinische Effekt allein mit der Inhibition der Zielgeneexpression nicht zu erklären war. Zudem konnten beide Studien den synergistischen Effekt der Hh-Blockade in Kombination mit Gemcitabine in Bezug auf das Tumorwachstum bestätigen.

In ersten klinischen Phase-I-Studien für die Behandlung von Pankreaskarzinompatienten konnte am Patienten gezeigt werden, dass die Smo-Antagonisten GDC-0449 sowie IPI-926 generell eine gute Verträglichkeit mit minimalen Nebenwirkungen für die Patienten aufweisen [80, 81]. Vorläufige Ergebnisse einer Studie von Stephenson et al.

präsentierten bei einer Kohorte von 15 metastasierten Pankreaskarzinompatienten, die mit einer Kombinationstherapie aus Gemcitabine und IPI-926 behandelt wurden, keine höhergradigen Nebenwirkungen sowie Medikamenteninteraktionen. Zudem zeigte sich für 3 von 9 Patienten mit einer bildgebenden Verlaufskontrolle eine partielle Response auf die Therapie [81]. Aufbauend auf dem mehrfach beobachteten synergistischen Effekt von Hh-Inhibition und Gemcitabine, welcher auch in den vorliegenden Studien nachgewiesen wurde, analysieren aktuelle Phase-I-Studien die Verträglichkeit und Durchführbarkeit eine Kombinationstherapie aus Hh-Antagonist und Gemcitabine mit innovativen Zytostatika, wie beispielsweise Nab-Paclitaxel. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse gelang es bisher keiner klinischen Studie, einen sicheren Behandlungserfolg durch die Inhibition des Hedgehog-Signalwegs an einem großen Patientenkollektiv zu belegen, so dass der Weg aus dem Labor in die Klinik noch nicht abgeschlossen ist.

Die vorliegenden Ergebnisse der eigenen Untersuchungen unterstützen jedoch die Schlussfolgerung, dass weitere molekulargenetische Studien sinnvoll sind, um die Komplexität der an der Karzinogenese des biliopankreatischen Karzinoms beteiligten Signalwege weiter aufzuschlüsseln. Eine mögliche Therapiekonsequenz könnte hieraus zumindest für eine Subgruppe der Patienten mit biliopankreatischem Karzinom entstehen.

Gemeinsam mit einer individualisierten Therapie auf dem Boden einer optimierten Prognosestellung der Patienten durch die in den eigenen Studien vorgestellten Parameter, könnte ein zielgerichtetes Eingreifen in den Hedgehog-Signalweg einen positiven Effekt auf das Überleben von Patienten mit biliopankreatischem Karzinom haben und somit die nach wie vor schlechte Prognose der Patienten verbessern.

#### **4. Zusammenfassung**

Aufgrund der weiterhin unzufriedenstellenden Prognose von Patienten mit Karzinomen des biliopankreatischen Systems ist die Suche nach Möglichkeiten zur „Outcome“-Verbesserung essentiell. Durch die Identifikation von Hochrisikopatienten sowie Patienten mit besonders günstiger Prognose wird eine individualisierte Therapie mit Reduzierung der Risiken für den Patienten möglich. Der Suche nach verlässlichen prädiktiven Parametern kommt daher in diesem Kontext eine große Bedeutung zu. In den vorliegenden Arbeiten konnten unterschiedliche prognostische Marker basierend auf klinischen und zellbiologischen Untersuchungen identifiziert und daraus resultierende mögliche Therapieoptionen aufgezeigt werden.

Bei der Abschätzung des Patientenüberlebens sollte der Einfluss des operativen Eingriffes an sich dabei nicht vernachlässigt werden. In der vorgelegten Studie zum Einfluss der postoperativen Komplikationen auf das Langzeitüberleben von Patienten mit Pankreaskarzinom konnte deutlich gezeigt werden, dass das Auftreten schwerwiegender Komplikationen, selbst wenn diese nicht unmittelbar zum Tod des Patienten führen, ein hochsignifikanter und unabhängiger Parameter für das Langzeitüberleben ist, welches in der prädiktiven Wertigkeit der Mehrheit der standardmäßig erhobenen histopathologischen Parameter überlegen erscheint. Das Risiko, welches durch die Operation an sich eingegangen wird, sollte daher unbedingt minimiert und bei Therapieentscheidungen berücksichtigt werden.

Weiterhin konnten die vorliegenden Arbeiten zur DNA-Ploidie den DNA-Index als ebenfalls hochsignifikanten prädiktiven Parameter sowohl für das Pankreas- als auch für das intrahepatische Gallengangskarzinom bestätigen. In beiden Studien gelang durch die Bestimmung des DNA-Index die Identifikation von Hochrisikopatienten, was im Rahmen von Therapieentscheidungen von großer Wichtigkeit sein könnte. Bestärkt wird diese Theorie zudem durch die Tatsache, dass in beiden Fällen der DNA-Index bereits präoperativ aus einer Tumorprobe ermittelt werden kann. Die präoperative Abschätzung der Tumorbiologie könnte daher auch bei der Entscheidung über ein operatives Vorgehen mit den damit verbundenen Risiken mitberücksichtigt werden.

Auf der Suche nach verbesserten therapeutischen Möglichkeiten ist neben der validen Prädiktion auch die Analyse spezifischer intrazellulärer Signaltransduktionswege, welche bei der Karzinogenese verschiedener Tumoren eine Rolle spielen, von großer Bedeutung. Der Hedgehog-Signalweg wurde in den dargelegten Studien sowohl für das Pankreas- als auch für das Gallengangskarzinom beleuchtet. Es zeigte sich eine Aktivierung des

Signalwegs bei relevanten Subpopulationen der jeweiligen Gruppe. Durch in vitro und in vivo Versuche konnte zudem gezeigt werden, dass eine Inhibition des Signalwegs mittels natürlich vorkommender oder synthetischer Antagonisten möglich ist und zum verringerten Zell- bzw. Tumorwachstum führt. Obwohl die komplexen Zusammenhänge der Signalwege durch die vorliegenden Studien nicht abschließend geklärt werden können, kann der Schluss gezogen werden, dass ein Eingreifen in den Hh-Signalweg bei Karzinomen des biliopankreatischen Systems möglich ist und dadurch gegebenenfalls ein möglicher Ansatzpunkt für therapeutische Alternativen entstehen kann. Weitere Studien zum Verständnis der komplexen Signalwege sind dafür allerdings notwendig.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Arbeiten verlässliche sowohl auf klinischen als auch auf zellbiologischen Untersuchungen basierende prädiktive Marker, welche in der Entscheidung über die Therapie von Patienten mit biliopankreatischem Karzinom mit einbezogen werden sollten. Mögliche therapeutische Konsequenzen hieraus sind theoretisch möglich, wobei die Auswirkungen einer validen Prädiktion auf das Patientenoutcome erst noch in weiteren Studien analysiert werden muss. Zudem unterstreichen die gezeigten Studien die Rolle des Hedgehog-Signalwegs bei der Karzinogenese des biliopankreatischen Karzinoms und lassen weitere Untersuchungen zu einer zielgerichteten Therapie sinnvoll erscheinen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010, 127(12):2893-2917.
2. Maisonneuve P, Lowenfels AB: Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Dig Dis* 2010, 28(4-5):645-656.
3. Shaib YH, Davila JA, McGlynn K, El-Serag HB: Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a true increase? *J Hepatol* 2004, 40(3):472-477.
4. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD, Choti MA, Yeo CJ, Schulick RD: Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg* 2007, 245(5):755-762.
5. Endo I, Gonen M, Yopp AC, Dalal KM, Zhou Q, Klimstra D, D'Angelica M, DeMatteo RP, Fong Y, Schwartz L *et al*: Intrahepatic cholangiocarcinoma: rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection. *Ann Surg* 2008, 248(1):84-96.
6. Patel T: Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology* 2001, 33(6):1353-1357.
7. Konstadoulakis MM, Roayaie S, Gomatos IP, Labow D, Fiel MI, Miller CM, Schwartz ME: Fifteen-year, single-center experience with the surgical management of intrahepatic cholangiocarcinoma: operative results and long-term outcome. *Surgery* 2008, 143(3):366-374.
8. Fatima J, Schnelldorfer T, Barton J, Wood CM, Wiste HJ, Smyrk TC, Zhang L, Sarr MG, Nagorney DM, Farnell MB: Pancreatoduodenectomy for ductal adenocarcinoma: implications of positive margin on survival. *Arch Surg* 2010, 145(2):167-172.
9. Schnelldorfer T, Ware AL, Sarr MG, Smyrk TC, Zhang L, Qin R, Gullerud RE, Donohue JH, Nagorney DM, Farnell MB: Long-term survival after pancreatoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: is cure possible? *Ann Surg* 2008, 247(3):456-462.
10. Luo X, Yuan L, Wang Y, Ge R, Sun Y, Wei G: Survival outcomes and prognostic factors of surgical therapy for all potentially resectable intrahepatic cholangiocarcinoma: a large single-center cohort study. *J Gastrointest Surg* 2014, 18(3):562-572.

11. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C *et al*: Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA* 2010, 304(10):1073-1081.
12. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C *et al*: Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007, 297(3):267-277.
13. Regine WF, Winter KA, Abrams RA, Safran H, Hoffman JP, Konski A, Benson AB, Macdonald JS, Kudrimoti MR, Fromm ML *et al*: Fluorouracil vs gemcitabine chemotherapy before and after fluorouracil-based chemoradiation following resection of pancreatic adenocarcinoma: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008, 299(9):1019-1026.
14. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, Niedergethmann M, Zülke C, Fahlke J, Arning MB *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):1473-1481.
15. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN *et al*: Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 2013, 369(18):1691-1703.
16. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, Madhusudan S, Iveson T, Hughes S, Pereira SP *et al*: Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 2010, 362(14):1273-1281.
17. Lee J, Park SH, Chang HM, Kim JS, Choi HJ, Lee MA, Jang JS, Jeung HC, Kang JH, Lee HW *et al*: Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2012, 13(2):181-188.
18. Garcea G, Dennison AR, Pattenden CJ, Neal CP, Sutton CD, Berry DP: Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature. *JOP* 2008, 9(2):99-132.
19. Ariizumi SI, Kotera Y, Katagiri S, Nakano M, Nakanuma Y, Saito A, Yamamoto M: Long-term Survival of Patients with Cholangiolocellular Carcinoma After Curative Hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 2014, 21(3) 451-8.



20. Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Nakashima A, Kondo N, Sakabe R, Ohge H, Sueda T: Prognostic factors after surgical resection for intrahepatic, hilar, and distal cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2011, 18(3):651-658.
21. Raut CP, Tseng JF, Sun CC, Wang H, Wolff RA, Crane CH, Hwang R, Vauthey JN, Abdalla EK, Lee JE *et al*: Impact of resection status on pattern of failure and survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg* 2007, 246(1):52-60.
22. Riediger H, Keck T, Wellner U, zur Hausen A, Adam U, Hopt UT, Makowiec F: The lymph node ratio is the strongest prognostic factor after resection of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 2009, 13(7):1337-1344.
23. Saxena A, Chua TC, Sarkar A, Chu F, Morris DL: Clinicopathologic and treatment-related factors influencing recurrence and survival after hepatic resection of intrahepatic cholangiocarcinoma: a 19-year experience from an established Australian hepatobiliary unit. *J Gastrointest Surg* 2010, 14(7):1128-1138.
24. Guglielmi A, Ruzzenente A, Campagnaro T, Pachera S, Valdegamberi A, Nicoli P, Cappellani A, Malfermoni G, Iacono C: Intrahepatic cholangiocarcinoma: prognostic factors after surgical resection. *World J Surg* 2009, 33(6):1247-1254.
25. Jamieson NB, Foulis AK, Oien KA, Going JJ, Glen P, Dickson EJ, Imrie CW, McKay CJ, Carter R: Positive mobilization margins alone do not influence survival following pancreatico-duodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg* 2010, 251(6):1003-1010.
26. Wang Y, Li J, Xia Y, Gong R, Wang K, Yan Z, Wan X, Liu G, Wu D, Shi L *et al*: Prognostic nomogram for intrahepatic cholangiocarcinoma after partial hepatectomy. *J Clin Oncol* 2013, 31(9):1188-1195.
27. Hyder O, Marques H, Pulitano C, Marsh JW, Alexandrescu S, Bauer TW, Gamblin TC, Sotiropoulos GC, Paul A, Barroso E *et al*: A Nomogram to Predict Long-term Survival After Resection for Intrahepatic Cholangiocarcinoma: An Eastern and Western Experience. *JAMA Surg* 2014, Mar 5 [Epub ahead of print].
28. Dindo D, Demartines N, Clavien PA: Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 2004, 240(2):205-213.
29. Weger AR, Graf AH, Askensten U, Schwab G, Bodner E, Auer G, Mikuz G: Ploidy as prognostic determinant in pancreatic cancer. *Lancet* 1987, 2(8566):1031.
30. Lanza G, Gafa R, Santini A, Maestri I, Dubini A, Gilli G, Cavazzini L: Prognostic significance of DNA ploidy in patients with stage II and stage III colon carcinoma: a prospective flow cytometric study. *Cancer* 1998, 82(1):49-59.

31. Merkel DE, McGuire WL: Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer* 1990, 65(5):1194-1205.
32. Jonas S, Al-Abadi H, Benckert C, Thelen A, Hippler-Benscheid M, Saribeyoglu K, Radtke B, Pratschke J, Neuhaus P: Prognostic significance of the DNA-index in liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Ann Surg* 2009, 250(6):1008-1013.
33. Susini T, Amunni G, Molino C, Carriero C, Rapi S, Branconi F, Marchionni M, Taddei G, Scarselli G: Ten-year results of a prospective study on the prognostic role of ploidy in endometrial carcinoma: dNA aneuploidy identifies high-risk cases among the so-called 'low-risk' patients with well and moderately differentiated tumors. *Cancer* 2007, 109(5):882-890.
34. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E: Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980, 287(5785):795-801.
35. Owens DM, Watt FM: Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat Rev Cancer* 2003, 3(6):444-451.
36. Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A: Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* 1997, 389(6653):876-881.
37. Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM *et al*: Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 2002, 297(5586):1559-1561.
38. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN *et al*: Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003, 425(6960):846-851.
39. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V *et al*: Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003, 425(6960):851-856.
40. Morton JP, Mongeau ME, Klimstra DS, Morris JP, Lee YC, Kawaguchi Y, Wright CV, Hebrok M, Lewis BC: Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(12):5103-5108.
41. Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A *et al*: Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res* 2007, 67(5):2187-2196.

42. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D *et al*: Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 2009, 324(5933):1457-1461.
43. Xu FG, Ma QY, Wang Z: Blockade of hedgehog signaling pathway as a therapeutic strategy for pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2009, 283(2):119-124.
44. McPhee JT, Hill JS, Whalen GF, Zayaruzny M, Litwin DE, Sullivan ME, Anderson FA, Tseng JF: Perioperative mortality for pancreatectomy: a national perspective. *Ann Surg* 2007, 246(2):246-253.
45. Hill JS, McPhee JT, Whalen GF, Sullivan ME, Warshaw AL, Tseng JF: In-hospital mortality after pancreatic resection for chronic pancreatitis: population-based estimates from the nationwide inpatient sample. *J Am Coll Surg* 2009, 209(4):468-476.
46. Hill JS, Zhou Z, Simons JP, Ng SC, McDade TP, Whalen GF, Tseng JF: A simple risk score to predict in-hospital mortality after pancreatic resection for cancer. *Ann Surg Oncol* 2010, 17(7):1802-1807.
47. Birkmeyer JD, Finlayson SR, Tosteson AN, Sharp SM, Warshaw AL, Fisher ES: Effect of hospital volume on in-hospital mortality with pancreaticoduodenectomy. *Surgery* 1999, 125(3):250-256.
48. Halloran CM, Ghaneh P, Bosonnet L, Hartley MN, Sutton R, Neoptolemos JP: Complications of pancreatic cancer resection. *Dig Surg* 2002, 19(2):138-146.
49. Welsch T, Buchler MW, Schmidt J: [Surgery for pancreatic cancer]. *Z Gastroenterol* 2008, 46(12):1393-1403.
50. Kang CM, Kim DH, Choi GH, Kim KS, Choi JS, Lee WJ: Detrimental effect of postoperative complications on oncologic efficacy of R0 pancreatectomy in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *J Gastrointest Surg* 2009, 13(5):907-914.
51. Hendren S, Birkmeyer JD, Yin H, Banerjee M, Sonnenday C, Morris AM: Surgical complications are associated with omission of chemotherapy for stage III colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2010, 53(12):1587-1593.
52. Merkow RP, Bilimoria KY, Tomlinson JS, Paruch JL, Fleming JB, Talamonti MS, Ko CY, Bentrem DJ: Postoperative Complications Reduce Adjuvant Chemotherapy Use in Resectable Pancreatic Cancer. *Ann Surg* 2013, Dec 26 [Epub ahead of print].

53. Klinkenbijn JH, Jeekel J, Sahmoud T, van Pel R, Couvreur ML, Veenhof CH, Arnaud JP, Gonzalez DG, de Wit LT, Hennisman A *et al*: Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg* 1999, 230(6):776-782; discussion 782-774.
54. Tevis SE, Kohlnhofer BM, Stringfield S, Foley EF, Harms BA, Heise CP, Kennedy GD: Postoperative complications in patients with rectal cancer are associated with delays in chemotherapy that lead to worse disease-free and overall survival. *Dis Colon Rectum* 2013, 56(12):1339-1348.
55. Porschen R, Remy U, Bevers G, Schauseil S, Hengels KJ, Borchard F: Prognostic significance of DNA ploidy in adenocarcinoma of the pancreas. A flow cytometric study of paraffin-embedded specimens. *Cancer* 1993, 71(12):3846-3850.
56. Bottger TC, Storkel S, Wellek S, Stockle M, Junginger T: Factors influencing survival after resection of pancreatic cancer. A DNA analysis and a histomorphologic study. *Cancer* 1994, 73(1):63-73.
57. Herrera MF, van Heerden JA, Katzmann JA, Weiland LH, Nagorney DM, Ilstrup D: Evaluation of DNA nuclear pattern as a prognostic determinant in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg* 1992, 215(2):120-124.
58. Park CS, Wiebke EA, Sidner RA, Miller GA, Cummings OW, Howard TJ, Fineberg NS, Madura JA: The role of flow cytometric DNA analysis in determining prognosis of resectable ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Am Surg* 1996, 62(7):609-615; discussion 615-606.
59. Alanen KA, Joensuu H, Klemi PJ, Nevalainen TJ: Clinical significance of nuclear DNA content in pancreatic carcinoma. *J Pathol* 1990, 160(4):313-320.
60. Zen Y, Fujii T, Itatsu K, Nakamura K, Minato H, Kasashima S, Kurumaya H, Katayanagi K, Kawashima A, Masuda S *et al*: Biliary papillary tumors share pathological features with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Hepatology* 2006, 44(5):1333-1343.
61. Gandou C, Harada K, Sato Y, Igarashi S, Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y: Hilar cholangiocarcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma share similar histopathologies, immunophenotypes, and development-related molecules. *Hum Pathol* 2013, 44(5):811-821.
62. Nakanuma Y, Sato Y: Hilar cholangiocarcinoma is pathologically similar to pancreatic duct adenocarcinoma: suggestions of similar background and development. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2014, Jan 21 [Epub ahead of print]

63. Abou-Rebyeh H, Al-Abadi H, Jonas S, Rotter I, Bechstein WO, Neuhaus P: DNA analysis of cholangiocarcinoma cells: prognostic and clinical importance. *Cancer Detect Prev* 2002, 26(4):313-319.
64. Iachino C, Catsicjannis N, Dallera F: Prognostic significance of tumor DNA content in carcinoma of the hepatic duct confluence. *J Exp Clin Cancer Res* 1998, 17(4):425-430.
65. Bergquist A, Tribukait B, Glaumann H, Broome U: Can DNA cytometry be used for evaluation of malignancy and premalignancy in bile duct strictures in primary sclerosing cholangitis? *J Hepatol* 2000, 33(6):873-877.
66. Bhattacharya R, Kwon J, Ali B, Wang E, Patra S, Shridhar V, Mukherjee P: Role of hedgehog signaling in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2008, 14(23):7659-7666.
67. Romer J, Curran T: Targeting medulloblastoma: small-molecule inhibitors of the Sonic Hedgehog pathway as potential cancer therapeutics. *Cancer Res* 2005, 65(12):4975-4978.
68. Feldmann G, Fendrich V, McGovern K, Bedja D, Bisht S, Alvarez H, Koorstra JB, Habbe N, Karikari C, Mullendore M *et al*: An orally bioavailable small-molecule inhibitor of Hedgehog signaling inhibits tumor initiation and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2008, 7(9):2725-2735.
69. El Khatib M, Kalnytska A, Palagani V, Kossatz U, Manns MP, Malek NP, Wilkens L, Plentz RR: Inhibition of hedgehog signaling attenuates carcinogenesis in vitro and increases necrosis of cholangiocellular carcinoma. *Hepatology* 2013, 57(3):1035-1045.
70. Rosow DE, Liss AS, Strobel O, Fritz S, Bausch D, Valsangkar NP, Alsina J, Kulemann B, Park JK, Yamaguchi J *et al*: Sonic Hedgehog in pancreatic cancer: from bench to bedside, then back to the bench. *Surgery*, 152(3 Suppl 1):19-32.
71. Nakamura K, Sasajima J, Mizukami Y, Sugiyama Y, Yamazaki M, Fujii R, Kawamoto T, Koizumi K, Sato K, Fujiya M *et al*: Hedgehog promotes neovascularization in pancreatic cancers by regulating Ang-1 and IGF-1 expression in bone-marrow derived pro-angiogenic cells. *PLoS One*, 5(1):e8824.
72. Chen W, Tang T, Eastham-Anderson J, Dunlap D, Alicke B, Nannini M, Gould S, Yauch R, Modrusan Z, DuPree KJ *et al*: Canonical hedgehog signaling augments tumor angiogenesis by induction of VEGF-A in stromal perivascular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108(23):9589-9594.

73. Fingas CD, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, Guicciardi ME, Cazanave SC, Mertens JC, Sirica AE, Gores GJ: Myofibroblast-derived PDGF-BB promotes Hedgehog survival signaling in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2011, 54(6):2076-2088.
74. Omenetti A, Choi S, Michelotti G, Diehl AM: Hedgehog signaling in the liver. *J Hepatol* 2011, 54(2):366-373.
75. Pasca di Magliano M, Sekine S, Ermilov A, Ferris J, Dlugosz AA, Hebrok M: Hedgehog/Ras interactions regulate early stages of pancreatic cancer. *Genes Dev* 2006, 20(22):3161-3173.
76. Brechbiel J, Miller-Moslin K, Adjei AA: Crosstalk between hedgehog and other signaling pathways as a basis for combination therapies in cancer. *Cancer Treat Rev* 2014, 40(6):750-759
77. Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, Marshall D, Fu L, Januario T, Kallop D *et al*: A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 2008, 455(7211):406-410.
78. Theunissen JW, de Sauvage FJ: Paracrine Hedgehog signaling in cancer. *Cancer Res* 2009, 69(15):6007-6010.
79. Jenkins D: Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal* 2009, 21(7):1023-1034.
80. Jimeno A, Weiss GJ, Miller WH, Jr., Gettinger S, Eigl BJ, Chang AL, Dunbar J, Devens S, Faia K, Skliris G *et al*: Phase I study of the Hedgehog pathway inhibitor IPI-926 in adult patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 2013, 19(10):2766-2774.
81. Cheng H, Merika E, Syrigos KN, Saif MW: Novel agents for the treatment of pancreatic adenocarcinoma. Highlights from the "2011 ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA; June 3-7, 2011. *JOP* 2011, 12(4):334-338.

## **6. Danksagung:**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Neuhaus, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Charité – Campus Virchow, für die hervorragende klinische Ausbildung in seiner Klinik sowie für die Unterstützung und Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

Ebenso danken möchte ich meinem ehemaligem Chef, Herrn Prof. Dr. Bernd H. Markus, Chefarzt der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Klinikum Kemperhof, Koblenz, durch den mein Interesse an der Viszeralchirurgie maßgeblich geweckt wurde und der mich bei der Entscheidung für eine universitäre Karriere unterstützt und beraten hat.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Herrn PD Dr. Marcus Bahra, der mich als Mentor bei vielen wissenschaftlichen Projekten begleitet hat und ohne dessen Hilfe und Ideen diese Habilitation nicht möglich gewesen wäre.

Auch Herrn Prof. Dr. Ulf P. Neumann sowie Herrn PD Dr. Daniel Seehofer danke ich für die Unterstützung und Hilfestellung bei der Erarbeitung und Durchführung meiner klinischen Forschung sowie für das Lektorat meiner Manuskripte. Ich möchte zudem Herrn PD Dr. Hussein Al-Abadi sowie Frau Angelika Dürr für ihre fortwährende Hilfe bei den zytologischen Studien zur DNA-Ploidie danken.

Frau Sabine Boas-Knoop bin ich für Ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowohl bei den tierexperimentellen Versuchen als auch bei der Bewältigung zahlreicher alltäglicher Probleme äußerst dankbar. Ein Dankeschön geht auch an die Mitarbeiter des Forschungshauses, nicht zuletzt an Frau Anja Schirmeier und Herrn Steffen Lippert, die durch ihre Arbeit maßgeblich zum Gelingen der experimentellen Studien beigetragen haben.

Herrn Michael Hippler-Benscheidt danke ich für die geduldige Hilfestellung bei der Bearbeitung der Datenbanken sowie den statistischen Auswertungen der Studien.

Den Kollegen Herrn Dr. Albrecht Stenzinger aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Heidelberg sowie Herrn PD Dr. Frederick Klauschen, Institut für Pathologie, Charité Campus Mitte, bin ich für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Durchführung der immunhistochemischen Studien sowie für die Auswertung der histologischen Untersuchungen sehr verbunden.

Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich den Kollegen aus der Radiologie, allen voran Herrn Prof. Dr. Ingolf Sack, Herrn PD Dr. Patrick Asbach sowie Herrn Dr. Dirk Schnapauff, für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der interdisziplinären Studien.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern dafür, dass sie mir diese Laufbahn ermöglicht haben und mich bei meinem Weg auch weit weg von zu Hause immer unterstützt haben.

Der größte Dank geht an meine Frau Roberta für das Verständnis und die Unterstützung sowohl bei der klinischen Arbeit als auch bei der Bewältigung der wissenschaftlichen Projekte. Beides wäre ohne ihre Motivation nur schwer erfolgreich zu absolvieren gewesen.



## 7. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charite

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Dr. med. Carsten Kamphues