

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie  
der Universitätsklinik Hamburg - Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki

## **Der Hämoxygenase-1 GTn-Polymorphismus als prognostischer Faktor für gastrointestinale Stromatumore, neuroendokrine Tumore des Pankreas und für Adenokarzinome des Pankreas**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

**FAIK GÜNTAÇ UZUNOĞLU**  
aus Hildesheim

Hamburg 2010

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.05.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. E. Yekebaş**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. G. Sauter**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD. Dr. O. Mann**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Arbeitshypothese und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>2</b>
2.1 Der Hämoxygenase-1 Polymorphismus .....	3
2.1.1 Die Hämoxygenase-1 .....	3
2.1.2 Das HMOX-1 Gen .....	4
2.2 Gastrointestinale Stromatumore .....	6
2.3 Neuroendokrine Tumoren des Pankreas .....	8
2.4 Duktale Adenokarzinome des Pankreas .....	9
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
3.1 Material .....	11
3.1.1 Ethikvotum und Patienteninformation .....	11
3.1.2 Untersuchungsmaterial und Patientenkollektive .....	11
3.1.2.1 Gastrointestinale Stromatumore .....	11
3.1.2.2 Neuroendokrine Pankreastumore .....	12
3.1.2.3 Duktale Adenokarzinome des Pankreas .....	12
3.1.2.4 Klinisch-pathologische Daten .....	12
3.2 Methoden .....	13
3.2.1 Präparation genomischer DNA .....	13
3.2.1.1 Isolierung genomischer DNA .....	13
3.2.1.2 Verdünnung der DNA .....	13
3.2.2 Sequenzierung des GTn-Polymorphismus .....	13
3.2.2.1 Die Polymerasekettenreaktion .....	13
3.2.2.2 Die Gel-Elektrophorese .....	14
3.2.2.3 Die Kapillarelektrophorese .....	14
3.2.3 Statistische Verfahren .....	15
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>16</b>
4.1 Gastrointestinale Stromatumore .....	16
4.1.1 Patientencharakteristika .....	16
4.1.2 GTn-Polymorphismus Verteilung .....	16
4.1.3 Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten .....	16
4.1.4 Überlebensanalysen .....	17
4.1.5 Multivariate Analyse .....	18
4.2 Neuroendokrine Pankreastumore .....	19
4.2.1 Patientencharakteristika .....	19
4.2.2 GTn-Polymorphismus Verteilung .....	19
4.2.3 Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten .....	20
4.2.4 Überlebensanalysen .....	21
4.2.5 Multivariate Analyse .....	22
4.3 Duktale Adenokarzinome des Pankreas .....	23
4.3.1 Patientencharakteristika .....	23
4.3.2 GTn-Polymorphismus Verteilung .....	23
4.3.3 Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten .....	23
4.3.4 Überlebensanalysen .....	25
4.3.5 Multivariate Analyse .....	27

<b>5. Diskussion.....</b>	<b>29</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>33</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>35</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>37</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>43</b>
<b>10. Lebenslauf .....</b>	<b>44</b>
<b>11. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>45</b>

## 1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Hämoxygenase 1 (HO-1) katalysiert den Abbau von freiem Häm zu Eisen (Fe), Biliverdin (BV) und Kohlenstoffmonoxid (CO). Der Abbau des Häm und die biologisch aktiven Reaktionsprodukte führen zu einer Verminderung des oxidativen Stresses, zu einer Verminderung der Entzündungsreaktion und zur Verminderung der Apoptoserate (Gozzelino et al. 2010) .

Im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass der GTn-Dinukleotidlängenpolymorphismus im Promotor des HMOX-1 Gens die Stärke der Expression der HO-1 beeinflusst und somit einen Einfluss auf Tumorgenese, Tumorprogress und Tumorprognose haben könnte (Chen et al. 2002). Bei Adenokarzinomen des Magens und der Lunge, bei oralen Plattenepithelkarzinomen und beim malignen Melanom (MM) konnten bereits signifikante Korrelationen erarbeitet werden (Kikuchi et al. 2005, Lo et al. 2007, Okamoto et al. 2006). Die Arbeitshypothese war entsprechend, dass der GTn-Polymorphismus auch Korrelationen mit gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), neuroendokrinen Tumoren des Pankreas (NEPT) und sog. duktalem Adenokarzinomen des Pankreas aufweist und als prognostischer Faktor dienen könnte.

44 Patienten mit einem GIST, 46 mit einem NEPT und 150 Patienten mit einem sog. duktalem Adenokarzinom des Pankreas, die sich in der Zeit von 1992 bis 2006 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf einem operativen Eingriff unterzogen hatten, wurden zur Evaluation des GTn-Polymorphismus in die Studie eingeschlossen.

Die Studie ging, bezogen auf für die jeweiligen Tumorentitäten, folgenden Fragen nach:

1. Korreliert der GTn-Repeatpolymorphismus im Promotor des HMOX-1 Gens mit klinisch-pathologischen Parametern?
2. Eignet sich der GTn-Repeatpolymorphismus als unabhängiger prognostischer Marker für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben?
3. Ergeben sich im Falle eines signifikanten Zusammenhanges zwischen dem GTn-Polymorphismus und o.g. Tumorentitäten therapeutische Konsequenzen?

## 2. Einleitung

Die Individualisierung der medizinischen Diagnostik und Therapie hat in den letzten Jahren einen hohen Stellenwert in der Forschung eingenommen. Insbesondere im onkologischen Bereich wird mit großem Aufwand nach potentiellen prädiktiven Faktoren geforscht. In der Vergangenheit konnte vielfach gezeigt werden, dass genetische Variationen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und den Therapieerfolg maligner Erkrankungen haben können.

Im gesamten menschlichen Genom sind durch Mutationen entstandene Unterschiede in der Nukleotidsequenz nachweisbar. Führt die Mutation nur zu einem Austausch einer Base spricht man von Single Nucleotide Polymorphisms (SNP), führt die Mutation zu einem Verlust oder einem Einbau von mindestens einer Base, spricht man von Insertions- und Deletionspolymorphismen. Eine weitere Möglichkeit stellen Längenpolymorphismen dar. Der Längenpolymorphismus entsteht durch ein bestimmtes Basenmotiv, das in einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungen vorkommt.

Treten diese Variationen in einem für ein Protein kodierenden Bereich auf, spricht man von einer Genvariante (Allel). Da das menschliche Genom einen diploiden Chromosomensatz aufweist, kann ein Individuum homozygot oder heterozygot für ein Allel sein. Je nach Vererbungsmuster kann ein Allel dominieren oder es liegt eine Kodominanz der Alle vor.

Während Polymorphismen vielfach keine Konsequenzen nach sich ziehen, beeinflusst ein Dinukleotidlängenpolymorphismus im Promotor des HMOX-1 Gens die Stärke der Expression der HO-1.

Die HO-1 und ihre Reaktionsprodukte wirken antioxidativ, antiinflammatorisch und anti-proliferativ (Tulis et al. 2001, Duckers et al. 2001, Ishikawa et al. 2001, Maines 1988, Tenhunen et al. 1969, Sunamura et al. 2003). Des Weiteren ist die Expression der HO-1 in menschlichen Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe in der Regel erhöht. Dies konnte bei Adenokarzinomen, Kaposisarkomen, malignen Melanomen, Pankreaskarzinomen, Prostatakarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und bei Tumoren des ZNS nachgewiesen werden (Hara et al. 1996).

Somit stellt der Polymorphismus im Promotor des HMOX-1 Gens einen Polymorphismus dar, der potentiell einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf, die individuelle onkologische Therapie und den Therapieerfolg haben könnte.

## 2.1 Der Hämoxigenase 1 Polymorphismus

### 2.1.1 Die Hämoxigenase-1

Die HO-1 katalysiert den Abbau von freiem Häm zu Eisen (Fe), Biliverdin (BV) und Kohlenstoffmonoxid (CO) (Gozellino et al. 2010). Der Abbau des Häm und die biologisch aktiven Reaktionsprodukte führen zu einer Verminderung des oxidativen Stresses, zu einer Verminderung der Entzündungsreaktion und zur Verminderung der Apoptoserate (siehe Abbildung 1). Vor allem das CO verstärkt die antiinflammatorische Wirkung durch Hemmung des Tumornekrosefaktors (TNF), des Interleukin-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ) und des Makrophagen-Entzündungsproteins 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) oder durch Erhöhung der Transkriptionsrate von Interleukin-10 (IL-10) (Tulis et al. 2001, Duckers et al. 2001, Ishikawa et al. 2001, Maines 1988, Tenhunen et al. 1969, Sunamura et al. 2003). Nachweislich wird die HO-1 unter anderem in Leber, Milz, Pankreas, Nieren, Lunge, Prostata, Haut, ZNS, Endothelien und im Intestinaltrakt exprimiert (Exner et al. 2004). Eine weitere Form der Hämoxigenase, die Hämoxigenase-2 (HO-2), unterscheidet sich von ersterer durch ihre konstitutive Expressierung, während die HO-1 induzierbar ist.

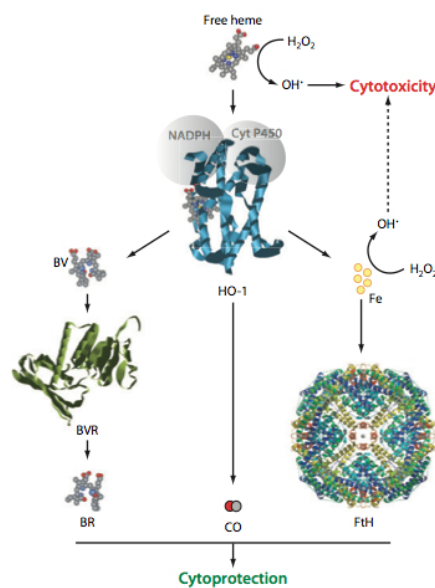


Abbildung 1: Enzymatische Funktion der HO-1 (Gozellino et al. 2010)

### 2.1.2 Das HMOX-1 Gen

Das Gen für die HO-1, das HMOX-1 Gen, befindet sich auf dem Chromosom 22q12. Das HMOX-1 Gen ist über unterschiedliche Signalwege induzierbar. Allen gemeinsam ist, dass die Induktion meist als Folge von oxidativem Stress erfolgt. Im Detail sind folgende Induktoren zu nennen: freies Häm, TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor), PDGF (Platelet-derived growth factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), SDF-1 (Stromal Cell-Derived Factor 1), Stickstoffmonoxid (NO), Hypoxie, Hyperoxie, Zytokine, Endotoxine, Schwermetalle, UV-Strahlung und andere (Fang et al. 2004a, Exner et al. 2004, Sunamura et al. 2003, Goodman 1997, Jozkowicz 2007, Kie 2008).

Die Abbildung 2 stellt die Induktion des HMOX-1 Gens dar. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS – reactive oxygen species) können zur Häm Freisetzung führen, was wiederum zu oxidativem Stress führt. Der HMOX-1 Promotor enthält diverse sog. DNA-responsive Elemente (RE 1-n) die unter oxidativem Stress von spezifischen Transkriptionsfaktoren (TF1-n) aktiviert werden.

Unter Homöostase blockieren die Transkriptionsfaktoren BACH1 und Maf über Bindung an sog. stress responsive elements (StRE) die HMOX-1 Transkription. Unter oxidativem Stress wird BACH1 inaktiviert. Einen Gegenpart stellen die Transkriptionsfaktoren Nrf2/MAF dar, die unter oxidativem Stress an die StRE's binden und die HMOX-1 Transkription fördern (Gozzelino et al. 2010).

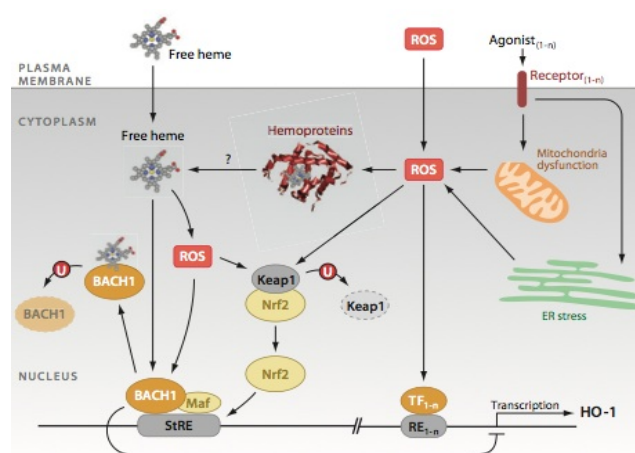


Abbildung 2: Transkriptionsregulation des HMOX-1 Gens (Gozzelino et al. 2010)



Die Expression der HO-1 ist hauptsächlich auf Transkriptionsebene reguliert (Maines 1988). Der HMOX-1 Promotor zeigt eine hohe Polymorphie und weist insgesamt 3 Polymorphismen auf: zwei Mononukleotidpolymorphismen (Single nucleotid polymorphism, SNP) und ein Dinukleotidpolymorphismus (GTn), siehe Abbildung 3 (Yamada et al. 2000, Kimpara et al. 1997, Ono et al. 2003, Ono et al. 2004). Der GTn-Polymorphismus im Promotor des HMOX-1 beeinflusst die Stärke der Expression der HO-1 als Antwort auf oben genannte Stimuli. Chen et al. konnten zeigen, dass die basale Transkriptionsrate bei Vorliegen einer kurzen Repeatsequenz um das 2,5 fache höher ist, als bei Vorliegen einer kurzen Sequenz. Außerdem waren nur HMOX-1 Gene mit kurzer Repeatsequenz im Promotor durch oxidativen Stress induzierbar (Chen et al. 2002). Der Einfluss des HMOX-1 Promotorpolymorphismus und der HO-1 Expression auf nicht maligne Erkrankungen wurde bereits in diversen Arbeiten aufgearbeitet. Exner et al. führten 2004 insgesamt 12 Arbeiten auf, die einen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und der jeweiligen Erkrankung zeigten (Exner et al. 2004). Hierzu zählen kardiovaskuläre Erkrankungen, pulmonale Erkrankungen, hämatologische bzw. serologische Störungen und andere. Beispielhaft konnten Yamada et al. den Einfluss der HO-1 Expression auf die COPD erarbeiten. Die verminderte Expression der HO-1 aufgrund des langen GTn-Repeat Allels (L-GTn) war mit einer erhöhten Anfälligkeit für die Entwicklung einer COPD vergesellschaftet (Yamada et al. 2000).

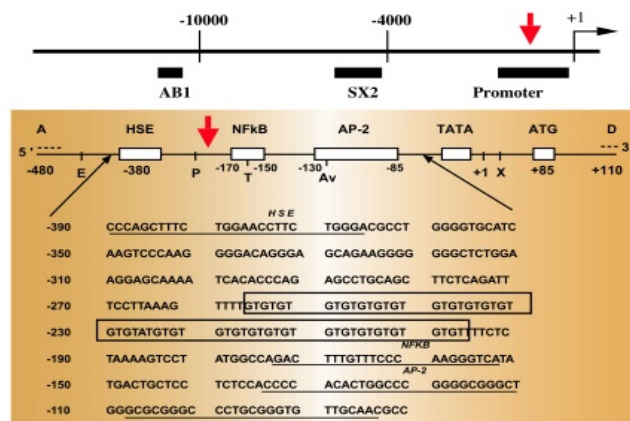


Abbildung 3: GTn-Polymorphismus im Promotor des HMOX-1 Gens (Exner et al. 2004)

Die Expression der HO-1 ist in menschlichem Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe in der Regel erhöht. Dies konnte bei Adenokarzinomen, Kaposisarkomen, malignen Melanomen, Pankreaskarzinomen, Prostatakarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und bei Tumoren des ZNS nachgewiesen werden (Hara et al. 1996). In Anbetracht der wichtigen Funktion der HO-1 auf oxidativen Stress und o.g. Einfluss auf nicht maligne Erkrankungen erscheint es naheliegend, dass die HO-1 Expression einen wichtigen Einfluss auf die Tumorgenese, den Tumorprogress und die Tumorprognose haben könnte. Bisher wurden orale Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome der Lunge, Magenkarzinome und maligne Melanome untersucht. In einer japanischen Studie wiesen Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge signifikant mehr L-GTn Allele auf als die Kontrollgruppe. Auch das Risiko für männliche Raucher an einem Adenokarzinom der Lunge zu erkranken war signifikant mit dem L-GTn Allel assoziiert (Kikuchi et al. 2005). Ähnlich verhält es sich bei einer Studie, die den Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und oralen Plattenepithelkarzinomen untersuchte, sowie bei einer Studie, die Adenokarzinome des Magens untersuchte (Lo et al. 2007). Gegenätzlich verhält es sich jedoch beim malignen Melanom (MM). Das Risiko an einem MM zu erkranken war bei Trägern des L-GTn Allels signifikant geringer als bei homozygoten Trägern des S-GTn Allels. Außerdem ist das kurze Allel signifikant assoziiert mit einem höheren Breslow Index (Okamoto et al. 2006)

Der Einfluss des GTn-Repeatpolymorphismus im Promotor des HMOX-1 Gens auf gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), neuroendokrinen Pankreastumoren (NEPT) sowie duktaalen Adenokarzinomen des Pankreas wurden in bisherigen Studien noch nicht untersucht.

## **2.2 Gastrointestinale Stromatumore**

GIST werden seit 1998 als eigene Gruppe definiert. Es handelt sich um eine selten auftretende Untergruppe der Sarkome mit einer Inzidenz von 2-3/100.000 pro Jahr. Entsprechend kommt es in Deutschland zu ca. 1500 Neuerkrankungen pro Jahr. Ein Großteil der GIST tritt im Magen auf, gefolgt von Dünndarm und anderen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes (Miettinen 2005, Tworek et al. 1997, Tworek et al. 1999a, Tworek et al. 1999b).

Die Diagnose der gastrointestinalen Stromatumoren wird durch den Nachweis der Typ III Rezeptor Tyrosinkinase (c-kit=CD177) auf der Zelloberfläche gestellt. Bei mehr als 90 % der Zellen in GIST ist dieser Rezeptor nachweisbar. Zusätzlich ist in 70% der Fälle eine CD 43-Positivität nachgewiesen. Das c-kit Protoonkogen, lokalisiert auf Chromosom 4q11-21, kodiert für die Typ III Rezeptor-Tyrosinkinase. Infolge einer Mutation im Rezeptor kommt es zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung der Tyrosinkinase mit unkontrollierter Proliferation und Apoptoseschutz. Es kommen zu einem geringen Teil jedoch auch GIST vor, bei denen kein c-kit nachweisbar ist, hier ist wahrscheinlich eine Mutation von PDGFRA, einem verwandten Rezeptor der Tyrosinkinase, die Ursache für die unkontrollierte Proliferation und der Entwicklung eines gastrointestinalen Stromatumors. Zytogenetisch zeichnen sich GIST durch Monosomien der Chromosomen 14 und 22 oder durch eine Deletion von 1p aus (Miettinen 2005).

Zur Abschätzung der Prognose werden die GIST in 4 Risikogruppen - abhängig von der Größe des Primarius und dem Mitoseindex - eingeteilt, siehe Tabelle 1 (Fletcher et al. 2002). Neben Tumorgröße und Mitoseindex wurde ein KI67 Index von über 10 % als unabhängiger prognostischer Indikator für eine schlechte Prognose beschrieben. Als unabhängigen prognostischen Marker für einen günstigen Verlauf wurde die CD44 Expression beschrieben. Zuletzt veröffentlichten Song et al. 2009 in einer Arbeit mit 135 Patienten, dass die Tumorgröße, der Mitoseindex, das Fletcher Ranking, die Tumornekrose, die Lokalisation und der Ki-67 Index unabhängige prognostische Faktoren darstellen. Die therapeutischen Optionen bei einem GIST beschränken sich aktuell auf die chirurgische Resektion und die kompetitive Blockade der ATP-Bindungsstelle spezifischer Tyrosinkinasen (Abl, Bcr-Abl, c-kit, PDGF) durch Phenylaminopyrimidin (Imatinib). Eine Chemotherapie und oder Radiatio erwiesen sich bisher als unwirksam (Gradistanac 2005, Song et al. 2009, Miettinen 2005, Hohenberger 2003, DeMatteo et al. 2000).

**Tabelle 1: Kriterien zur Abschätzung der Prognose von GIST**  
(Fletcher et al. 2002)

Risiko	Größe (cm)	Mitoseindex
sehr niedrig	<2	<5
niedrig	2-5	<5
Mittel	<5	6-10
	5-10	<5
hoch	>5	>5
	>10	Jeglicher Index

### 2.3 Neuroendokrine Tumore des Pankreas

NEPT sind seltene Tumoren des Pankreas und machen bis zu 3% aller malignen Erkrankungen des Pankreas aus. Die Prävalenz beträgt 1/100000. Im Jahr erkranken ca. 12800 Patienten an einem neuroendokrinen Tumor des Pankreas, das durchschnittliche Erkrankungsalter der Männer liegt bei 68 Jahren, der Frauen bei 75 Jahren (Fesinmeyer et al. 2005, Mullan 2001).

Die NEPT können immunhistochemisch eingeteilt werden in Insulinome, Gastrinome, Somatostatinoide, Glucagonome, VIPome sowie funktionell inaktive Tumore. Insulinome und Gastrinome machen 60% der neuroendokrinen Pankreastumoren aus, inaktive 30% (Abbildung 4).

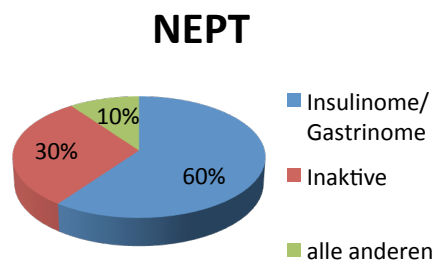


Abbildung 4: Einteilung der NEPT

Die Risikoeinteilung der neuroendokrinen Tumore erfolgt nach Vorhandensein von Metastasen, der Infiltration angrenzender Organe, der histologischen Differenzierung, der Tumorgroße, der Angioinvasion, dem KI-67-Index und dem Vorhandensein von hormonellen Syndromen in benigne, benigne oder niedrigmaligne, niedrigmaligne und hochmaligne (Tabelle 2). Mit Ausnahme des Insulinoms verhalten sich die NEPT häufig maligne (Capella 1995, Klöppel 2004).

Als prognostische Faktoren die präoperativ bestimmt werden können, werden das Alter, das Thrombozyten/Lymphozyten Verhältnis, die alkalische Phosphatase und die Alanin-Transaminase diskutiert (Sakka et al. 2009). In einer retrospektiven Studie mit 3851 Patienten konnte das Alter, die histologische Differenzierung und das Vorhandensein von Fernmetastasen als hochsignifikante unabhängige Faktoren für das Überleben identifiziert werden (Bilimoria et al. 2008). CK19 ist ein Cytokeratin das in allen epithelialen Zellen des Pankreas exprimiert wird und kürzlich als unabhängiger Prognosefaktor für NEPT identifiziert wurde. Ebenso konnte der Inselzellmarker KIT als neuer unabhängiger Prognosefaktor identifiziert

werden (Zhang et al. 2009, Deshpande et al. 2004, La Rosa et al. 2007, La Rosa et al. 2009). Es existiert zurzeit kein Marker um zwischen benignen und malignen neuroendokrinen Tumoren zu unterscheiden. Hier ist die einzige Option die histologische Untersuchung.

Die chirurgische Therapie stellt zurzeit die einzige kurative Option dar und ist Goldstandard. Es konnte auch gezeigt werden, dass Patienten die ein fortgeschrittenes Stadium bzw. Metastasierungen aufwiesen, von der chirurgischen Behandlung profitieren. Bilimoria et al. zeigten, dass trotz signifikanten Vorteilen, die eine chirurgische Behandlung von neuroendokrinen Pankreastumoren beinhaltet, nur ein Drittel von den untersuchten 10.000 Patienten eine chirurgische Behandlung erhielt. Ein Drittel erhielt überhaupt keine Behandlung (Bilimoria et al. 2007, Schurr et al. 2007).

**Tabelle 2: Kriterien zur Einschätzung der Prognose von neuroendokrinen Pankreastumoren**

	Metastasierung	Infiltration	Histologische Differenzierung	Tumorgröße	Angioinvasion	KI-67-Index	Hormonelles Syndrom
	(a)						
<b>Benigne</b>	-	-	Hoch	<2cm	-	<2%	± (b)
<b>Benigne/Niedrigmaligne</b>	-	-	Hoch	>2cm	±	<2%	± (b)
<b>Niedrigmaligne</b>	+	+	Hoch	>3cm	+	>2%	± (c)
<b>Hochmaligne</b>	+	+	Niedrig	beliebig	+	>30%	-
<b>a) Infiltration angrenzender Organe</b>		<b>b) Insulinome</b>		<b>c) Insulinome und andere funktionell aktive Tumoren</b>			

## 2.4 Duktale Adenokarzinome des Pankreas

Duktale Adenokarzinome des Pankreas sind die am häufigsten vorkommenden malignen Tumoren des Pankreas (>90%). In Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen bei Männern auf 4900 und bei Frauen auf über 5500 geschätzt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 67, für Frauen bei 74 Jahren. Charakteristisch ist die späte Diagnosestellung und die schlechte Prognose (Bramhall SR 1995, Cameron et al. 2006, Sener et al. 1999).

Die aktuelle Diagnostik kann oftmals nicht das Fortschreiten der Erkrankung darstellen, was unter Umständen zur verzögerten und oder falschen Therapieanwendung führen kann. Der einzige Tumormarker, der seit einigen Jahren klinisch genutzt wird, ist CA 19-9. Es bleibt anzumerken, dass die ASCO (American Society of Clinical Onkology) diesen Marker nicht

empfiehlt und in einigen Studien über die schlechte Sensitivität von CA 19-9 in Bezug auf duktale Pankreas Karzinome berichtet wurde.

In einer Studie mit 616 Patienten konnten die R0-Resektion, die Tumorgröße, der Blutverlust, die Tumordifferenzierung und die postoperative Radiochemotherapie als signifikante Prognoseparameter identifiziert werden (Sohn et al. 2000). In Anbetracht der hohen Anzahl an falsch negativen R0 Resektionen sind die Ergebnisse in Frage zu stellen. So belegen Studien, dass bis zu 80% aller R0 Resektion eigentlich als R1 einzustufen waren (Verbeke 2006, Verbeke et al. 2008, Verbeke und Menon 2008). Eine weitere Studie unterstreicht die Bedeutung des Verhältnissen von befallenen zu nicht befallenen Lymphknoten als unabhängiger prognostischer Marker (Riediger et al. 2009).

Aktuell ist die chirurgische Therapie ist die einzige potentiell kurative Therapieoption. Trotzdem beträgt die 5 Jahres-Überlebensrate nur 5-10% (Dunphy 2008, Ghaneh et al. 2008, Wolff et al. 2008, Ujiki und Talamonti 2007).

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### 3.1.1 Ethikvotum und Patienteninformation

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg, Deutschland bewilligt. Die Patienten die an der Studie teilgenommen haben, wurden im Vorfeld informiert und die Einwilligung wurde eingeholt.

##### 3.1.2 Untersuchungsmaterial und Probandenkollektive

###### 3.1.2.1 Gastrointestinale Stromatumore

Retrospektiv wurden 44 Patienten, die sich im Zeitraum von 1992 bis 2004 aufgrund eines GIST einem chirurgischen Eingriff in unserer Klinik unterzogen hatten, in die Studie einbezogen und untersucht.

Vor Aufnahme in die Studie wurden die angefertigten Paraffinschnitte erneut immunhistochemisch klassifiziert. Bestimmt wurden CD117, CD34, muscle actin, desmin und das s-100 Protein. Der Proliferationsindex wurde anhand des KI-67 Antigens bestimmt. Alle GIST wurden entsprechend der Risikokategorien nach Fletscher eingeteilt in sehr niedrig, niedrig, mittel und hohes Risiko, siehe Tabelle 1 (Fletcher et al. 2002).

GSIT die bereits metastasiert waren, wurden einer 5. Gruppe (maligne) zugeordnet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Kategorien sehr niedrig, niedrig und mittel in eine Gruppe zusammengefasst, ebenso die Kategorien hohes Risiko und maligne.

Von den in der Studie enthaltenen 44 Patienten wurde DNA aus schockgefrorenem Tumorgewebe und korrespondierendem gesunden Gewebe extrahiert und der GTn-Repeatpolymorphismus analysiert.

###### 3.1.2.2 Neuroendokrine Pankreastumore

Retrospektiv wurden 46 Patienten, die sich im Zeitraum von 1992 bis 2004 aufgrund eines neuroendokrinen Tumors des Pankreas einem chirurgischen Eingriff in unserer Klinik unterzogen hatten, in die Studie einbezogen und untersucht.

Vor Aufnahme in die Studie wurden die angefertigten Paraffinschnitte erneut histologisch entsprechend den Vorgaben der WHO klassifiziert. Der Proliferationsindex wurde anhand des KI-67 Antigens bestimmt. Aktive Tumoren wurden entsprechend der Einteilung von Capella (Capella 1995) durch immunhistochemischen Nachweis von Hormonen, Vorhandensein von

klinischen Symptomen oder Anzeichen von systemischer Ausschüttung von Hormonen, definiert.

Alle Tumoren waren neuroendokrine Pankreastumoren. Bekannte Variablen waren Tumorgöße, Mitoserate, Differenzierungsgrad, Angioinvasion, immunhistochemischer Hormonnachweis und Vorläuferamine und Peptide, um die Tumoren entsprechend der WHO - Klassifikation einzuteilen.

Für die Analyse des GTn-Repeatpolymorphismus erfolgte die DNA Extraktion aus schockgefrorenem neuroendokrinen Pankreastumorgewebe, korrespondierendem gesunden Gewebe sowie 11 Proben, die aus Metastasen entnommen wurden. Des Weiteren standen 10 präoperativ entnommene Blutproben für die DNA Isolation aus Leukozyten zur Verfügung.

### 3.1.2.3 Adenokarzinome des Pankreas

Retrospektiv wurden 150 Patienten, die sich im Zeitraum von 1997 bis 2006 aufgrund eines duktales Pankreaskarzinoms einem chirurgischen Eingriff in unserer Klinik unterzogen hatten, in die Studie einbezogen und untersucht. Patienten die bereits Metastasen aufwiesen, oder Patienten bei denen intraoperativ Metastasen diagnostiziert wurden, wurden ausgeschlossen. Alle Patienten erhielten keine neoadjuvante Behandlung. Histopathologisch wurden nur Patienten mit einbezogen, die eine R0 Resektion aufwiesen. Alle Tumoren wurden entsprechend dem AJCC Cancer Staging Manual klassifiziert (Bilimoria et al. 2007).

### 3.1.2.4 Klinisch-pathologische Daten

Alle Daten wie Geschlecht, Alter, histopathologische Untersuchungsergebnisse (Größe, Metastasen, Tumortyp, Staging) wurden anhand der klinischen und pathologischen Aufzeichnungen eingeholt. In Bezug auf die neuroendokrinen Pankreastumoren ist anzumerken, dass die Tumorgöße, die Mitoserate, der Differenzierungsgrad, die Angioinvasion, der immunhistochemische Hormonnachweis, Vorläuferamine und Peptide evaluiert wurden, um die Tumoren entsprechend der WHO - Klassifikation einzuteilen. Die klinischen Follow-Up Daten wurden anhand der Patiententabellen und oder durch direkte Kontaktaufnahme mit den Patienten erarbeitet.



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Präparation genomischer DNA

#### 3.2.1.1 Isolierung genomischer DNA

Vor DNA Extraktion wurden 7 Schnitte angefertigt (je 2 Schnitte von 7 µm an den äußeren Rändern und 5 Schnitte im Kern von 15 µm Dicke) und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Folgend wurden die Tumoren durch einen Pathologen markiert. Anhand des QIAmp Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde DNA aus Tumorgewebe, gesundem Gewebe, Metastasengewebe und Leukozyten extrahiert. Metastasengewebe und Leukozytengewebe stand bei neuroendokrinen Pankreastumoren zur Verfügung. Bei duktalem Pankreastumoren erfolgte die Analyse ausschließlich anhand von Leukozyten-DNA.

#### 3.2.1.2 Verdünnung der DNA

Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde ein Teil der extrahierten DNA mit sterilem Wasser (DNase frei, RNase frei, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA) auf eine Endkonzentration von 10ng/µl in 50 µl verdünnt und bei -80°C gelagert.

### 3.2.2 Sequenzierung des GTn-Repeatpolymorphismus

#### 3.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1983 durch Dr. Kary Mullis entwickelt. Anhand der PCR können Zielsequenzen in vitro vervielfältigt werden. Das Prinzip der PCR besteht in einer Kettenreaktion, da neu synthetisierte DNA-Stränge als Vorlage für weitere Stränge in den sich wiederholenden Zyklen dienen. Voraussetzung ist, dass die Sequenz der Zielregion bekannt ist.

Die Zielsequenz des HMOX-1 Gens wurde im Vorfeld bereits durch Yamada et. al veröffentlicht (Yamada et al. 2000). Für die Vervielfältigung des 5'Endes mit dem GTn-Repeatpolymorphismus wurde ein sense Primer (5'- AGAGCCTGCAGCTTCTCAGA-3') und ein fluoreszierender (FAM, 6-Carboxyfluorescein) antisense Primer (5'- ACAAAGTCTGGCCATAGGAC-3') benutzt.

Die PCR erfolgte in einem 10 µl umfassendem Reaktionsgemisch bestehend aus 0,2 µl extrahierter DNA, 1 µl 10x PCR Puffer (GeneAmp<sup>®</sup>, Applied Biosystems<sup>™</sup>, USA), 1 µl dNTP's je 2,5 mM (Invitrogen<sup>™</sup>, USA), je 0,5 µl sense und antisense Primer (Eurofins MWG Ope-

ron, Deutschland), 0,05 µl Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold™, Applied Biosystems™, USA), und 5 µl sterilem Wasser, DNase frei und RNase frei (Sigma-Aldrich®, USA).

Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis pipettiert. Die Taq-Polymerase wurde dem Gemisch zuletzt hinzugefügt. Zur Kontrolle von möglichen Verunreinigungen wurde jeweils einem Reaktionsansatz statt DNA steriles Wasser (Sigma-Aldrich®, USA) hinzugegeben.

Der Thermocycler wurde auf Denaturierungstemperatur vorgeheizt. Initial wurde für 10 Minuten bei 94°C denaturiert. Folgend wurde der PCR Zyklus, bestehend aus Denaturierungszeit für 30 Sekunden bei 94°C, der Anlagerungszeit für 30 Sekunden bei 58°C, einer Syntheszeit von einer Minute bei 72°C und einer Elongationszeit von 10 Minuten bei 40°C, insgesamt 40 mal wiederholt. Nach Abschluss aller Zyklen wurde der PCR – Ansatz auf 4°C heruntergekühlt.

#### 3.2.2.2 Die Gel-Elektrophorese

Nach Abschluss der PCR wurden die DNA-Fragmente durch die Gel-Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Auftrennung basiert auf der Wanderungseigenschaft der negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist u.a. von der Größe abhängig. Unter einer Gleichspannung bilden sich DNA-Fragment-Banden aus, die sich aufgrund des hinzugegebenen Farbstoffes Ethidiumbromid unter UV-Licht als orange-fluoreszierende Banden darstellen. Die Größe der Banden wird durch einen hinzugegebenen Längenstandard abgeschätzt. Je kleiner das amplifizierte Fragment, desto größer die Wanderungstrecke.

Zur Herstellung eines 2,5% igen Agarosegels wurden 5g Agarose mit 200 ml 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach vollständiger Auflösung wurde 10 µl Ethidiumbromid (1%ig) hinzugegeben. Die angelegte Spannung betrug 100 V für 20 Minuten.

#### 3.2.2.3 Kapillarelektrophorese

Die Bestimmung des GTn-Polymorphismus erfolgte durch eine Kapillarelektrophorese mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer ® (Applied Biosystems™, USA). Hierfür wurde ein Gemisch aus 40 µl Formamide (HI-DI™, Applied Biosystems™, USA), 0,2 µl Größenstandard (GeneScan™ 500-ROX™, Applied Biosystems™, USA) und 0,1-2,0 µl PCR Material titriert und bei 94° C für zwei Minuten im Thermocycler denaturiert. Die Menge des PCR – Materials war abhängig von der Bandenqualität in der Gelelektrophorese.

Die GTn-Repeats wurden anhand homozygoter DNA - Marker bestimmt. Hierfür wurde die Sequenzierung in einem 20 µl Gemisch bestehend aus 3,0 µl extrahierter DNA, 2,0 µl 5x Sequenzierungspuffer (Applied Biosystems™, USA), 4,0 µl Sequenziermix (BigDye®, Version 1.1 Applied Biosystems™, USA) und OXsFs Primer (5'-GGGTTGCTAAGTTCCT-GATG-3') erstellt. Die Syntheszyklen wurden bei 95°C, 50°C und 60° C für 30 Sekunden bis 4 Minuten wiederholt. Das Sequenzierungsprodukt wurde anschließend automatisch durch den ABI Prism 310 Genetic Analyzer ® (Applied Biosystems™, USA) analysiert.

Die Längenmarker waren zwei homozygote Muster mit 23 und 30 GTn-Repeats. GTn-Repeats kleiner 25 wurden als kurze Repeats klassifiziert,  $\geq 25$  als lange Repeats. Diese Klassifizierung entspricht derjenigen die bereits durch andere Gruppen aufgestellt wurde. Yamada et al. haben in Ihrer Arbeit zwar eine Unterteilung in 3 Klassen vorgenommen, eine Signifikanz bezüglich der Expression war jedoch nur bei einer Repeatsequenz unter 20 bzw. über 29 feststellbar (Chang et al. 2004, Yamada et al. 2000).

### 3.2.3 Statistische Verfahren

Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurde SPSS® für Windows® Version 11.5.1 (SPSS Inc., Chicago, IL) genutzt. ANOVA wurde zur Korrelation der klinisch pathologischen Parameter mit den GTn-Genotypen genutzt. Die Überlebenskurven der Patienten wurden anhand der Kaplan -Meyer Methode erstellt, und mit dem log-rank Test analysiert. In der Gruppe der Patienten mit dem LL - Genotyp wurde die mediane Überlebenszeit bei GIST und NEPT, im Gegensatz zu den duktaalen Adenokarzinomen des Pankreas, nicht erreicht. Weder für die rezidivfreie Überlebenszeit noch für die gesamte Überlebenszeit. Aufgrund dessen wurden die Daten für das Überleben als Mittelwerte mit einer Standardabweichung und dem 95% Konfidenzintervall angegeben. Um den unabhängigen Einfluss des HO-1 Längenpolymorphismus und anderer Kovarianzen auf das Überleben herauszuarbeiten, wurde die Cox - Regressionsanalyse angewendet. Signifikante Ergebnisse beziehen sich auf die P-Werte der zweiseitigen Tests die kleiner waren als 0,05.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Gastrointestinale Stromatumore**

#### 4.1.1 Patientencharakteristika

45 Patienten mit operativem Eingriff bei GIST wurden untersucht. Patientenmerkmale wie Geschlecht, Tumorlokalisierung, Metastasierung, Risikoprofil und Rezidiv sind in Tabelle 3 aufgelistet. Das mediane Alter der Studienpopulation betrug 61,5 Jahre. Die Population teilte sich in 27 Patientinnen (61,4 %) und 17 Patienten (54,5 %) auf.

24 Patienten konnten der Gruppe mit geringem Risiko zugeteilt werden (54,5 %), 20 Patienten der Gruppe mit hohem Risiko (45,5 %). Acht Patienten hatten bei Vorstellung bereits Metastasen und wurden der offensichtlich malignen Gruppe zugeordnet (18,2 %). Von diesen acht Patienten erhielten zwei Patienten (4,4 %) Gleevec® präoperativ und weitere zwei Patienten postoperativ. Sechs Patienten aus der Hochrisikogruppe (30 %) erhielten Gleevec® postoperativ.

#### 4.1.2 GTn-Polymorphismus Verteilung

24 Patienten wurden als homozygote Träger (LL) der langen Repeatsequenz identifiziert (54,5%), 20 (45,5%) als heterozygot (SL). Homozygote Träger der kurzen Repeatsequenz konnten nicht der vorliegenden Studienpopulation identifiziert werden.

#### 4.1.3 Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem GTn-Genotyp und klinischen Parametern wie Geschlecht, Alter und primäre Tumorlokalisierung konnte nicht hergestellt werden (siehe Tabelle 3).

Der heterozygote Genotyp war hoch signifikant assoziiert mit stattgehabter Metastasierung zum Zeitpunkt der Vorstellung in unserer Klinik, Rezidiv und der Hochrisikogruppe. (Tabelle 3, ANOVA  $P < 0,0001$ ). Keiner der 24 Patienten in der Gruppe mit geringem Risiko trug ein S-GTn Allel, jedoch wiesen alle 20 Patienten der Hochrisikogruppe ein S-GTn Allel auf. Alle Patienten, die aufgrund von bestehenden Metastasen in die sicher maligne Gruppe eingeordnet wurden, wiesen ein S-GTn Allel auf.

#### 4.1.4 Überlebensanalysen

15 Patienten aus der Studienpopulation erlitten ein Rezidiv, alle Patienten mit Rezidiv wiesen ein S-GTn Allel auf. Es ist jedoch einzuwenden, dass ein Patient der homozygot für das L-GTn Allel war, ebenfalls ein Rezidiv erlitt. Die mediane Follow-Up Zeit betrug 45 Monate (von 2 bis 126 Monaten). Die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit betrug 91,8 Monate (+/- 7,1; KI 77,8-105,9). Patienten, die bei Erstvorstellung bereits Metastasen aufwiesen (n=8) wurden aus der Berechnung der rezidivfreien Überlebenszeit ausgeschlossen. Patienten mit homozygotem L-GTn Genotyp hatten eine signifikant längere rezidivfreie Überlebenszeit mit 110 Monaten (+/- 4; KI 102-117) im Gegensatz zu dem heterozygoten Genotyp mit 57 Monaten (+/- 9,4; KI 38,5-75,6, Abbildung 6, log rank Test, P < 0,0001). In Bezug auf die Gesamtüberlebenszeit hatte der homozygote Genotyp ebenfalls eine signifikant längere Zeit mit 105,9 Monaten (+/- 5,5; KI 95-116,8) im Vergleich zum heterozygoten Typ mit 50,7 Monaten (+/- 10,2; KI 30,7-70,7, Abbildung 5, log rank Test, P<0,0001).

<b>Tabelle 3: Vergleich der Genotypen mit klinisch-pathologischen Charakteristika (GIST)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Patienten (%)</b>	<b>GTn-Genotyp</b>		<b>P-Wert</b>
		<b>SL</b>	<b>LL</b>	
<b>Gesamtzahl</b>	44 (100)	20 (45,5)	24 (54,5)	
<b>Geschlecht</b>				
<b>Männlich</b>	27 (61,4)	14	13	
<b>Weiblich</b>	17 (38,6)	6	11	0,29
<b>Alter</b>				
<b>&lt;60</b>	20 (45,5)	11	9	
<b>≥60</b>	24 (38,6)	6	11	0,25
<b>Lokalisation</b>				
<b>Ösophagus</b>	5 (11,4)	2	3	
<b>Magen</b>	27 (61,4)	11	16	
<b>Dünndarm</b>	8 (18,2)	4	4	
<b>Andere</b>	4 ( 9,1)	3	1	0,21
<b>Risiko Profil</b>				
<b>Sehr niedrig</b>	4 ( 9,1)	0	4	
<b>Niedrig</b>	10 (22,7)	0	10	
<b>Mittel</b>	10 (22,7)	0	10	
<b>Hoch</b>	12 (27,3)	12	0	
<b>Maligne</b>	8 (18,2)	8	0	<0,0001
<b>Metastasierung</b>				
<b>Ja</b>	36 (81,8)	12	24	
<b>Nein</b>	8 (18,2)	8	0	<0,0001
<b>Rezidiv</b>				
<b>Ja</b>	29 (65,9)	6	23	
<b>Nein</b>	15 (34,1)	14	1	<0,0001

#### 4.1.5 Multivariate Analyse

Die Cox-Regressionsanalyse zeigte, dass der GTn-Polymorphismus einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Überleben der an gastrointestinalen Stromatumor erkrankten Patienten darstellt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Multivariate Analyse für das Überleben GIST		
Variable	RR*/KI*	P-Wert
Geschlecht (m. vs. w.)	0,8/0,2-2,4	0,2
Alter (<60 vs. ≥ 60)	0,5 / 0,2 - 1,3	0,7
SL vs. LL Genotyp	11,1 / 2,5 - 49,1	0,0001
Geringes Risiko vs. Hohes Risiko	11,1 / 2,5 - 49,1	0,0001

Cox-Regressionsanalyse \* Relatives Risiko; \*\* 95% Konfidenzintervall

Des Weiteren zeigte sich, dass es eine direkte lineare Korrelation zwischen der Risikoeinschätzung nach Fletscher und dem GTn-Repeatpolymorphismus gibt. Patienten mit der kurzen Repeatsequenz hatten ein relatives Risiko von 11,1 (95% KI 2,5-49,1; P=0,001) im Vergleich zu Patienten mit der homozygot langen Repeatsequenz. Alter und Geschlecht waren in der vorliegenden Studienpopulation nicht von prognostischer Relevanz.

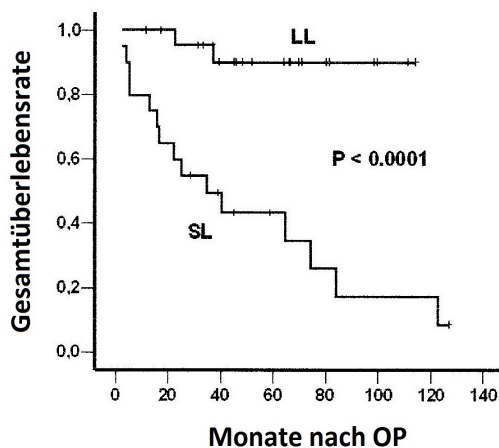


Abbildung 5: Alle Patienten die an gastrointestinalen Tumoren erkrankt waren, wurden in die Analyse mit einbezogen (n=44). Die mittlere Überlebenszeit war signifikant besser bei Patienten mit dem LL Genotyp mit 105,9 Monaten  $\pm$  5,5 Monate versus 50,7 Monate  $\pm$  10,2 bei Patienten mit dem SL Genotyp (log rank Test,  $P < 0,0001$ ).

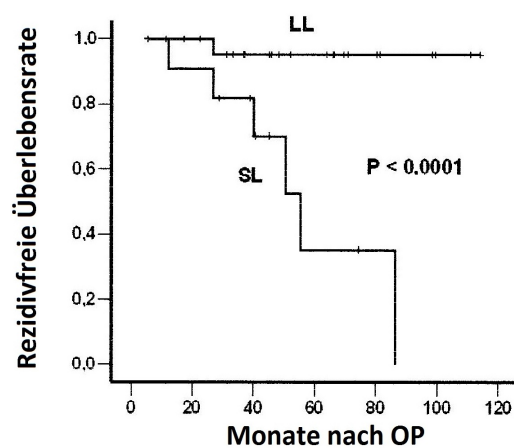


Abbildung 6: Patienten mit gastrointestinalen Tumoren die bei Vorstellung Metastasen aufwiesen sind in der Analyse der rezidivfreien Überlebenszeit nicht enthalten (n=8). Die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit war signifikant besser bei Patienten mit dem LL Genotyp mit 110 Monaten  $\pm$  4 Monate versus 57 Monate  $\pm$  9,4 Monate (log rank Test,  $P < 0,0001$ ).

## 4.2 Neuroendokrine Pankreastumore

### 4.2.1 Patientencharakteristika

46 Patienten, die sich einer operativen Tumorresektion unterzogen hatten, wurden in die Studie mit einbezogen.

Patientencharakteristika wie z.B. Geschlecht, Tumorart- und Rezidiv und Metastasierung bei Vorstellung sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Das mediane Alter der Studienpopulation betrug 52 Jahre (von 27 bis 73 Jahre). 22 Patienten waren männlich (47,8%) und 24 Patienten weiblich (52,2%).

35 Patienten wiesen einen inaktiven NEPT auf (76,1%), 11 Patienten wiesen einen aktiven NEPT auf (23,9%). Von den genannten 11 Patienten wurde bei vier Patienten ein Insulinom nachgewiesen, bei 2 Patienten ein Gastrinom und bei 5 Patienten ein Karzinoid.

Vier Patienten aus der Gesamtstudienpopulation wiesen ein NEPT im Rahmen einer Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ I auf, zwei Patienten wiesen ein NEPT im Rahmen des Zollinger-Ellisson Syndroms auf. Die restlichen 40 Patienten wiesen ein NEPT ohne Assoziation zu einem Syndrom auf.

Histologisch wiesen 38 Patienten einen gut differenzierten Tumor auf (82,6%), zwei einen mäßig differenzierten Tumor (4,3%) und drei Patienten einen schlecht differenzierten Tumor (13%).

Bei 11 Patienten lagen Metastasen zum Zeitpunkt der Vorstellung vor (23,9%). Bei allen Metastasen handelte es sich um hepatische Metastasen, die komplett reseziert wurden.

Nach der aktuell gültigen WHO Klassifikation (Tabelle 2) lag bei 11 Patienten ein gutartiger NEPT vor (23,9%), bei 27 Patienten lag ein gut differenzierter NEPT vor (58,7%) und bei acht Patienten lag ein schlecht differenzierter NEPT vor. Bei 11 Patienten lagen Metastasen zum Zeitpunkt der Vorstellung vor (23,9%), ein Rezidiv trat bei 20 Patienten auf (43,2%).

### 4.2.2 GTn-Polymorphismus Verteilung

Alle DNA Proben wurden bezüglich des GTn-Polymorphismus analysiert. Es war kein Unterschied im Polymorphismus zwischen Tumorgewebe, gesundem Gewebe, Metastasengewebe und Leukozyten-DNA nachweisbar.

Neun Patienten waren homozygote Träger der kurzen GTn-Repeatsequenz (19,6%). 21 Patienten wiesen sowohl das Allel für die kurze GTn-Repeatsequenz als auch für die lange GTn-

Repeat Sequenz auf. Die verbleibenden 16 Patienten der untersuchten Patientenpopulation waren homozygote Träger der langen GTn-Repeat Sequenz.

#### 4.2.3 Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten

Die Überprüfung eines signifikanten Zusammenhanges zwischen dem GTn-Genotyp und klinischen Parametern wie Geschlecht und Alter war negativ (Tabelle 5).

<b>Tabelle 5: Klinische Charakteristika NEPT</b>	
<b>Anzahl der Patienten</b>	46 (100)*
<b>Medianes Alter in Jahren</b>	52 (27-73)
<b>Geschlecht</b>	
<b>Männlich</b>	22 (47,8)
<b>Weiblich</b>	24 (52,2)
<b>Tumorbiologie</b>	
<b>Inaktiv</b>	35 (76,1)
<b>Aktiv</b>	11 (23,9)
- <b>Insulinom</b>	4
- <b>Gastrinom</b>	2
- <b>Karzinoid</b>	5
<b>Syndrome</b>	
<b>MEN I</b>	4 ( 8,7)
<b>Zöllinger-Ellison</b>	2 ( 4,3)
<b>Kein Syndrom</b>	40 (87,0)
<b>Metastasierung bei Vorstellung</b>	11 (15,9)
<b>Grading</b>	
<b>1</b>	38 (82,6)
<b>2</b>	2 ( 4,3)
<b>3</b>	6 (13,0)
<b>Rezidive</b>	
<b>0</b>	26 (56,5)
<b>1</b>	29 (43,3)
<b>WHO-Klassifikation</b>	
<b>Benigne</b>	11 (23,9)
<b>Gut differenziert</b>	27 (58,7)
<b>Schlecht differenziert</b>	8 (17,4)
<b>GTn-Polymorphismus</b>	
<b>SS</b>	9 (19,6)
<b>SL</b>	21 (45,7)
<b>LL</b>	16 (34,8)
<b>*Werte in Klammern entsprechen Prozentwerten</b>	

Im Kontrast hierzu korrelierten Tumorrezidiv, Tumorgrading und die WHO Klassifikation signifikant mit dem GTn-Genotyp. Die Träger des Allels für die kurze GTn-Repeatsequenz, sei es homo- oder heterozygot, wiesen signifikant höhere Rezidivraten auf. Bei Patienten, die homozygote Träger des langen GTn-Allels waren, traten nur bei drei von insgesamt 13 Pati-



enten Rezidive auf. Im Gegensatz hierzu traten, bei 17 von 30 Patienten die homozygote oder heterozygote Träger des kurzen GTn-Allels waren, Rezidive auf. (ANOVA, P=0,03, Tabelle 6). Zusätzlich wies keiner der homozygoten Träger des langen Allels einen Tumorgrad II oder III auf, die Tumorgrade II und III traten ausschließlich bei Trägern des kurzen Allels auf (ANOVA, P=0,01, Tabelle 6).

**Tabelle 6: Vergleich der Patientencharakteristika mit dem GTn-Genotyp NEPT**

	Genotyp			P (ANOVA)
	SS	SL	LL	
<b>Tumorrezidive</b>				
<b>0</b>	3	10	13	
<b>1</b>	6	11	3	0,03
<b>Grading</b>				
<b>1</b>	4	18	16	
<b>2</b>	1	1	0	
<b>3</b>	4	2	0	0,01
<b>WHO Klassifikation</b>				
<b>Benigne</b>	0	0	11	
<b>Gut differenziert</b>	4	18	5	
<b>Schlecht differenziert</b>	5	3	0	0,0001

Hervorzuheben ist die Korrelation zwischen dem GTn-Genotyp und der WHO Klassifikation. Der GTn-Genotyp korreliert hoch signifikant mit der WHO Klassifikation. Alle benignen neuroendokrinen Pankreastumore gehörten dem LL-Genotyp an. Im Kontrast hierzu gehörten schlecht differenzierte neuroendokrine Pankreastumoren dem SS/SL-Genotyp an (ANOVA, P=0,0001, Tabelle 6). Es muss aber auch erwähnt werden, dass gut differenzierte neuroendokrine Pankreastumoren alle Genotypen aufwiesen (SS, SL, LL).

#### 4.2.4 Überlebensanalysen

Die mediane Follow-Up Zeit betrug 38,2 Monate (von 2-140 Monate). Die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit betrug 72,6 Monate ( $\pm$  11,4 Monate; KI 50,3-94,9). Der LL-Genotyp hatte ein signifikant längere rezidivfreie Überlebenszeit mit 118,8 Monaten ( $\pm$  14,1; KI 84-139,4) im Gegensatz zu dem SL-Genotyp mit 47 Monaten ( $\pm$  11; KI 25,5-68,4) und dem SS Genotyp mit 6,6 Monaten ( $\pm$  3,3; KI 2,4-12,6). Patienten die zum Zeitpunkt der Vorstellung Metastasen aufwiesen, wurden aus der Analyse der rezidivfreien Überlebenszeit ausgeschlossen (Abbildung 7), log rank Test, P<0,0001). Die gesamte Überlebenszeit der Untersuchten Patienten betrug 75,9 Monate ( $\pm$  9,4; KI 57,3 – 94,5). Der LL-Genotyp wies auch hier eine signifikant längere Überlebenszeit von 101,6 Monaten auf ( $\pm$  14,7; KI 72,7-130,3) im Ver-

gleich zu den Patienten mit dem SL Genotyp mit 61 Monaten (+/- 11,9; KI 37,6-84,4) und dem SS Genotyp mit 25,8 Monaten (+/- 7,5; CI 11,2-40,4; Abbildung 8, log rank Test, P=0,04).

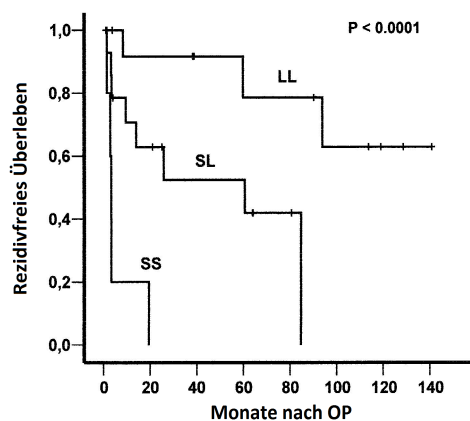


Abbildung 7: Patienten, die an neuroendokrinen Tumoren erkrankt waren und zum Zeitpunkt der Vorstellung Metastasen aufwiesen, sind in der Analyse der Rezidivfreien Überlebenszeit nicht enthalten (n=11). Die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit war bei Patienten mit dem LL Genotyp signifikant besser mit 118,0 Monaten versus 47,0 Monaten bei Patienten mit dem SL Genotyp und 6,1 Monaten bei Patienten mit dem SS Genotyp (log rank Test, P < 0,0001)

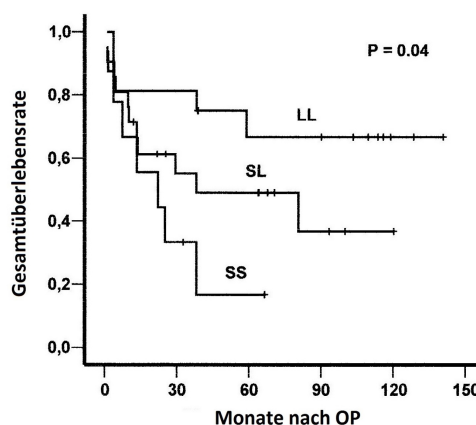


Abbildung 8: Für die Analyse der Gesamtüberlebenszeit sind alle Patienten die an einem neuroendokrinen Pankreastumor erkrankt waren enthalten (n=46). Die mittlere Überlebenszeit war signifikant besser bei Patienten mit dem LL Genotyp mit 101,6 Monaten versus 61 Monate bei Patienten mit dem SL Genotyp und 25,8 Monate bei Patienten mit dem SS Genotyp (log rank Test, P=0,04)

#### 4.2.5 Multivariate Analyse

Die Cox-Regressionsanalyse identifizierte die WHO Klassifikation als den einzigen unabhängigen prognostischen Marker für das Überleben. Patienten mit benignem NEPT hatten im Vergleich zu Patienten mit malignem NEPT ein relatives Risiko von 1,9 ( KI 1-3,9; P=0,04, Tabelle 7). In der multivariaten Analyse erreichte der GTn-Polymorphismus nicht die statistische Signifikanz um als unabhängiger prognostischer Marker für das Überleben zu gelten.

<b>Tabelle 7: Multivariate Analyse für das Überleben NEPT</b>		
	RR*/KI**	P
<b>WHO-Klassifikation</b>	1,9 (1,0;3,9)	0,04
<b>GTn-Polymorphismus</b>	1,0 (0,3;3,7)	0,8

Cox-Regressionsanalyse \* Relatives Risiko; \*\* 95% Konfidenzintervall

## 4.3 Duktale Adenokarzinome des Pankreas

### 4.3.1 Patientencharakteristika

150 Patienten, die sich einer operativen Tumorresektion unterzogen hatten, wurden in die Studie mit einbezogen. Das mediane Alter der Studienpopulation betrug 63,4 Jahre ( von 33 bis 87 Jahre). 78 Patienten waren männlich ( 52 %) und 72 Patienten weiblich (48 %). Die mediane Follow-Up Zeit betrug 16 Monate ( von 2 – 50).

Postoperativ erhielten 46 Patienten (30,7%) eine Chemotherapie. Das nicht alle Patienten einer Chemotherapie unterzogen wurden, hatte institutionelle Gründe: wurden bis 2003 Patienten mit einem kurativ operiertem Pankreaskarzinom lediglich chirurgisch behandelt, erfolgte im Zuge der Veröffentlichung der ESPAC-3 Studie und der Conko Studie eine Umstellung der Therapie. Stadienunabhängig wurden alle Patienten mit potentiell kurativ operiertem Pankreaskarzinom ab 2003 einer auf Gemcitabine basierenden Chemotherapie unterzogen ( Neoptolemos et al. 2010, Oettle und Neuhaus 2007). Das mediane Gesamtüberleben der Patienten mit Chemotherapie betrug 15 Monate (95% KI; 12,7 – 17,3) im Vergleich zu 19 Monaten (95% KI; 13,3 – 24,7) bei Patienten, die eine alleinige chirurgische Resektion erhielten ( $p=0,03$ ; Abbildung 9 b).

Zur Verifizierung einer repräsentativen Studienpopulation wurde das Gesamtüberleben in Bezug zum AJCC Stadium bestimmt. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben und dem AJCC Stadium. Die mediane Gesamtüberlebenszeit betrug 17,5 Monate (95% CI: 14,5-20,6, Abbildung 9 a,  $p<0,0001$ ).

### 4.3.2 GTn-Polymorphismusverteilung

45 Patienten waren homozygote Träger der kurzen GTn-Repeat Sequenz (30 %). 72 Patienten wiesen sowohl das Allel für die kurze GTn-Repeat Sequenz als auch für die lange GTn-Repeat Sequenz auf ( 48 %). Die verbleibenden 33 Patienten der untersuchten Patientenpopulation waren homozygote Träger der langen GTn-Repeatsequenz (22 %).

### 4.3.3 Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten

Die Überprüfung eines signifikanten Zusammenhanges zwischen dem GTn-Genotyp und klinischen Parametern wie Geschlecht und Alter war negativ. Der Vergleich der LL, SL und SS Genotypen konnte eine signifikante Risikosteigerung für ein fortgeschrittenes T-Stadium, die Lymphknotenmetastasierung, das Grading und die Rezidivrate aufzeigen (jeweils  $p<0,0001$ ). Der SS-Genotyp zeigte signifikant fortgeschrittene Tumoren im Vergleich zu Patienten mit

dem SL- und LL-Genotyp. Im Vergleich des SL-Genotyps mit dem LL-Genotyp zeigte sich eine Tendenz zu weniger aggressiver Tumorbiologie. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Stadium III ausschließlich bei Patienten mit dem SS-Genotyp auftrat. Im Kontrast hierzu gehörten Patienten die das Stadium I aufwiesen ausschließlich dem LL-Genotyp an (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Patientencharakteristika und Korrelation des Genotyps mit klinisch – pathologischen Parametern bei Adenokarzinomen des Pankreas**

Variablen	Gesamt	LL	SL	SS	p
<b>Gesamt</b>	150	33 (22.0)	72 (48.0)	45 (30.0)	
<b>Geschlecht</b>					
<b>Männlich</b>	78 (52.0)	21 (26.9)	31 (39.7)	26 (33.3)	
<b>Weiblich</b>	72 (48.0)	12 (16.7)	41 (56.9)	19 (26.4)	0.9
<b>Alter</b>					
<b>≤ 60</b>	74 (49.3)	18 (24.3)	35 (47.3)	21 (28.4)	
<b>&gt;60</b>	76 (50.7)	15 (19.7)	37 (48.7)	24 (31.6)	0.8
<b>Tumorgroße</b>					
<b>pT1</b>	10 (6.7)	8 (80.0)	2 (20.0)		
<b>pT2</b>	49 (32.7)	10 (20.4)	30 (61.2)	9 (18.4)	
<b>pT3</b>	82 (54.7)	15 (18.3)	40 (48.8)	27 (32.9)	
<b>pT4</b>	9 (6.0)		-	9 (100.0)	<0.001
<b>Lymphknotenstatus</b>					
<b>Negativ</b>	34 (22.7)	21 (61.8)	12 (35.3)	1 (2.9)	
<b>Positiv</b>	116 (77.3)	12 (10.3)	60 (51.7)	44 (37.9)	<0.001
<b>Grading</b>					
<b>G1</b>	7 (4.7)	4 (57.1)	3 (42.9)		
<b>G2</b>	67 (44.7)	20 (29.9)	35 (52.2)	12 (17.9)	
<b>G3</b>	76 (50.7)	9 (11.8)	34 (44.7)	33 (43.4)	0.001
<b>Stadium</b>					
<b>IA</b>	9 (6.0)	7 (77.8)	2 (22.2)		
<b>IB</b>	12 (8.0)	7 (58.3)	5 (41.7)		
<b>I IA</b>	13 (8.7)	7 (53.8)	5 (38.5)	1 (7.7)	
<b>I IB</b>	107 (71.3)	12 (11.2)	60 (56.1)	35 (32.7)	
<b>III</b>	9 (6.0)		-	9 (100.0)	<0.001
<b>Adjuvante Chemoth.</b>					
<b>Nein</b>	104 (69.3)	26 (25.0)	46 (44.2)	32 (30.8)	
<b>Ja</b>	46 (30.7)	7 (15.2)	26 (56.5)	13 (28.3)	0.3
<b>Rezidiv</b>					
<b>Nein</b>	36 (24.0)	19 (52.8)	11 (30.6)	6 (16.7)	
<b>Ja</b>	114 (76.0)	14 (12.3)	61 (53.5)	39 (34.2)	<0.001

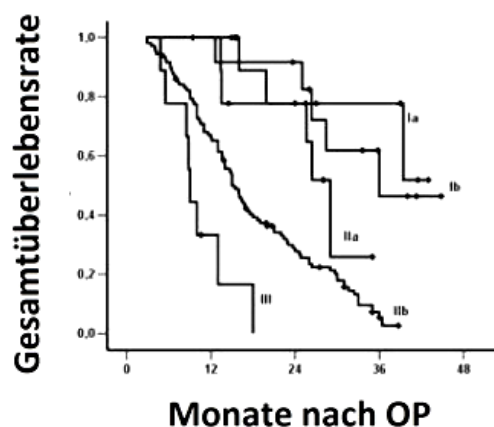


Abbildung 9a: Kaplan – Meier Plot für das Gesamtüberleben in Relation zum Stadium, I-III: AJCC Stadien

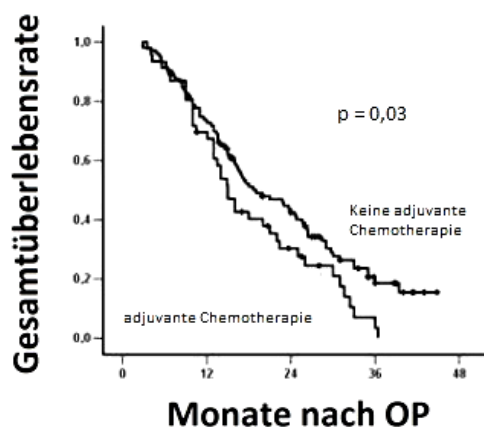


Abbildung 9 b: Kaplan – Meier Plot für das Gesamtüberleben in Relation zur adjuvanten Chemotherapie

#### 4.3.4 Überlebensanalysen

Während der Follow-Up Periode erlitten insgesamt 114 Patienten (76%) ein Rezidiv und 116 Patienten (77,3%) verstarben. Der GTn-Polymorphismus hatte einen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie und das Gesamtüberleben. So sanken die Überlebenszeiten deutlich im Vergleich der LL vs. SL und SL vs. SS Genotypen (Abbildung 9 c, 9 d und Tabelle 9,10).

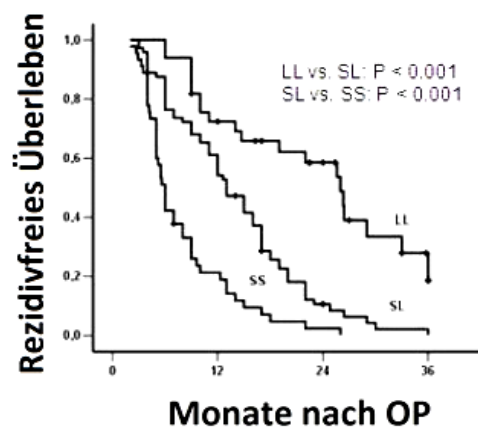


Abbildung 9 c: Kaplan – Meier Plot für das rezidivfreie Überleben in Relation zum GTn-Genotyp

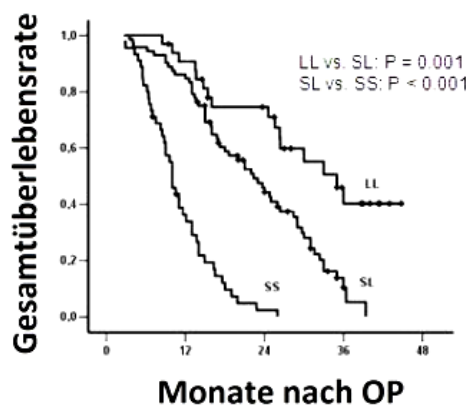


Abbildung 9 d: Kaplan – Meier Plot für das Gesamtüberleben in Relation zum GTn-Genotyp

Betrachtet man nun die Überlebenszeiten der Patienten mit und ohne Chemotherapie getrennt in Bezug auf den GTn-Genotyp, so zeigt sich auch hier, dass die Überlebenszeiten im Vergleich der LL- vs. SL- und SL- vs. SS-Genotypen signifikant sinken. Eine Ausnahme bildet

jedoch der Vergleich des LL- vs. SL-Genotyps mit adjuvanter Chemotherapie. Hier konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,2$ ). Es bleibt jedoch anzumerken, dass nur 7 Patienten mit dem LL-Genotyp eine postoperative Chemotherapie erhielten (Abbildung 10 a-d, Tabelle 9 und 10).

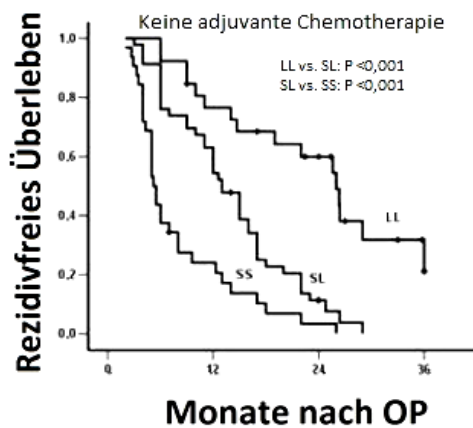


Abbildung 10 a: Kaplan – Meier Plot für rezidivfreies Überleben in Relation zum GTn-Genotyp und der alleinigen chirurgischen Resektion

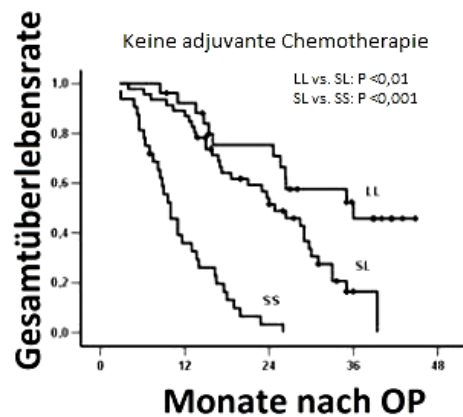


Abbildung 10 b: Kaplan – Meier Plot für das Gesamtüberleben in Relation zum GTn-Genotyp und der alleinigen chirurgischen Resektion

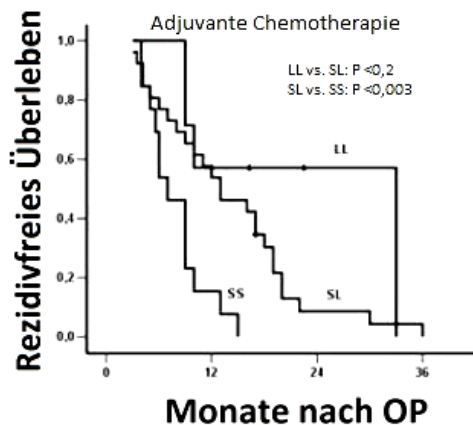


Abbildung 10 c: Kaplan – Meier Plot für rezidivfreies Überleben in Relation zum GTn-Genotyp und der chirurgischen Resektion mit adjuvanter Chemotherapie

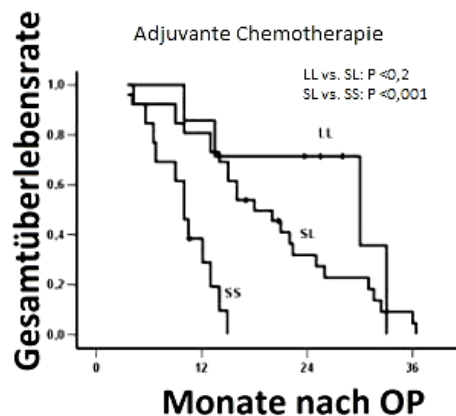


Abbildung 10 d: Kaplan – Meier Plot für das Gesamtüberleben in Relation zum GTn-Genotyp und der chirurgischen Resektion mit adjuvanter Chemotherapie

**Tabelle 9: GTn und rezidivfreies Überleben Adenokarzinom Pankreas**

Genotyp	Alle			Ohne Chemotherapie			Mit Chemotherapie		
	N	Median	P	N	Median	P	N	Median	P
Alle	150	12,9 (10,2-13,8)	<0,001	104	12,3 (9,5-15,1)	<0,001	46	10,0 (7,5-12,4)	0,002
LL	33	12,0 (10,2-13,8)	<0,001 <sup>1</sup>	26	26,0 (20,5-31,5)	<0,001 <sup>1</sup>	7	33,0 (12,8-32,9)	0,2 <sup>1</sup>
SL	72	13,0 (10,6-15,4)	/	46	13,0 (10,6-15,4)	/	26	13,0 (6,7-19,2)	/
SS	45	6,0 (5,3-6,7)	<0,001 <sup>2</sup>	32	5,2 (4,4-6,0)	<0,001 <sup>2</sup>	13	7,0 (7,6-12,4)	0,003 <sup>2</sup>

Werte in Klammern: 95% KI <sup>1</sup> Signifikanz zwischen LL und SL <sup>2</sup> Signifikanz zwischen SL und SS

**Tabelle 10: GTn und Gesamtüberleben Adenokarzinom Pankreas**

Genotyp	Alle			Ohne Chemotherapie			Mit Chemotherapie		
	N	Median	P	N	Median	P	N	Median	P
Alle	150	17,6 (14,5-10,6)	<,001	104	19,0 (13,3-24,7)	<0,001	46	15,0 (12,7-17,3)	0,001
LL	33	35,0 (27,2-42,8)	<0,001 <sup>1</sup>	26	32,6 (27,3-37,9)	<0,01 <sup>1</sup>	7	33,0 (5,9-54,1)	0,2 <sup>1</sup>
SL	72	13,0 (18,2-26,5)	/	46	24,8 (18,8-30,8)	/	26	18,0 (12,4-23,6)	/
SS	45	6,0 (8,8-11,2)	<0,001 <sup>2</sup>	32	10,0 (7,9-12,1)	<0,001 <sup>2</sup>	13	7,0 (8,2-11,8)	0,001 <sup>2</sup>

Werte in Klammern: 95% KI <sup>1</sup> Signifikanz zwischen LL und SL <sup>2</sup> Signifikanz zwischen SL und SS

#### 4.3.5 Multivariate Analyse

Zur Evaluation des GTn-Genotyps als unabhängiger prognostischer Marker wurde die Cox Regressionsanalyse durchgeführt. Alter, Geschlecht, Tumorgröße und postoperative Chemotherapie zeigten keine Signifikanz in der multivariaten Analyse. In Bezug auf das Rezidiv und das Gesamtüberleben konnte aber gezeigt werden, dass der GTn-Polymorphismus den stärksten prognostischen Marker stellt. Die HR für das Rezidiv in der SS-Genotyp Gruppe war im Vergleich mit der LL-Genotyp Gruppe 3,9 (95% KI: 1,7-9,0, p=0,001), und für das Gesamtüberleben 5,5 (95% KI; 2,5-11,9, p<0,001). Der Vergleich des LL-Genotyps mit dem SL-Genotyp erbrachte keinen signifikanten Unterschied. Weiterhin zeigte sich in der Analyse, dass das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen einen unabhängigen prognostischen Marker für das Auftreten eines Rezidivs und das Gesamtüberleben darstellt (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Prognostischer Faktor für Tumorrezidiv und Gesamtüberleben**

Variablen	Tumorrezidiv				Gesamtüberleben			
	Univariat		Multivariat		Univariat		Multivariat	
	HR (95% KI)	P	HR (95% KI)	P	HR (95% KI)	P	HR (95% KI)	P
<b>Geschlecht</b>	0,9	0,8	0,8	0,3	1,0	0,9	0,9	0,7
<b>Männlich vs. weiblich</b>	(0,7-1,4)		(0,6-1,2)		(0,78-1,5)		(0,6-1,3)	
<b>Alter in Jahren</b>	0,9	0,62	0,9	0,8	1,2	0,4	1,1	0,5
<b>≤60 vs. &gt;60</b>	(0,6-1,3)		(0,6-1,4)		(0,8-1,7)		(0,8-1,7)	
<b>Tumorgröße</b>								
<b>pT1 Referenz</b>	1,9	0,16	0,3	0,06	3,3	0,02	1,1	0,9
<b>pT1 vs. pT2</b>	(0,8-,5)		(0,1-1,1)		(1,2-9,3)		(0,3-3,8)	
<b>pT1 vs. pT3</b>	2,7	0,02	0,4	0,13	3,6	0,01	0,9	0,9
	(1,1-6,3)		(0,1-1,3)		(1,3-10,0)		(0,3-0,4)	
<b>pT1 vs. pT4</b>	4,4	0,008	0,3	0,13	12,7	<0,001	1,3	0,8
	(1,5-13,1)		(0,1-1,4)		(8,3,7-43,6)		(0,3-5,8)	
<b>LK Status</b>	4,6	<0,001	2,7	0,01	4,9	<0,001	2,7	0,01
<b>Negativ vs. positiv</b>	(2,5-8,2)		(1,2-6,0)		(2,7-8,9)		(1,3-5,8)	
<b>Grading</b>								
<b>G1 Referenz</b>								
<b>G1 vs. G2</b>	3,9	0,06	2,8	0,2	2,2	0,2	1,1	0,9
	(0,9-16,1)		(0,6-12,5)		(0,7-7,2)		(0,3-4,0)	
<b>G1 vs. G3</b>	9,3	0,002	4,9	0,04	4,8	0,009	1,6	0,5
	(2,2-38,3)		(1,1-22,4)		(1,5-15,3)		(0,4-6,2)	
<b>Adjuvante CT</b>	1,3	0,24	1,1	0,6	1,5	0,04	1,4	0,1
<b>Nein vs. Ja</b>	(0,9-1,9)		(0,7-1,7)		(1,1-2,2)		(0,9-2,1)	
<b>Genotyp</b>								
<b>LL Referenz</b>								
<b>LL vs. SL</b>	3,2	<0,001	1,8	0,12	2,5	0,001	1,3	0,5
	(1,7-5,7)		(0,8-4,0)		(1,4-4,5)		(0,7-2,5)	
<b>LL vs. SS</b>	7,1	<0,001	3,9	0,001	11,5	<0,001	5,5	<0,001
	(3,8-13,5)		(1,7-9,0)		(6,1-22,0)		(2,5-11,9)	

HR: hazard ratio mit 95% Konfidenzintervall

P: Signifikanz basierend auf dem Cox Regressionsmodell, spezifizierte Variablen vergleichend.



## 5. Diskussion

Die HO-1 katalysiert den Abbau von freiem Hem zu Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid (Tenhunen et al. 1968). Sowohl die Reaktionsprodukte, als auch die HO-1 selbst wirken antioxidativ, antiinflammatorisch, antiproliferativ und somit insgesamt Cytoprotektiv (Tulis et al. 2001, Duckers et al. 2001, Ishikawa et al. 2001, Maines 1988, Tenhunen et al. 1969, Sunamura et al. 2003).

Aufgrund der genannten Eigenschaften ist es naheliegend, dass die HO-1 einen Einfluss auf die Tumorgenese und den Krankheitsverlauf haben könnte. Die erhöhte Konzentration der HO-1 in Tumorgewebe im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe wurde ebenfalls bereits nachgewiesen.

Der GTn-Polymorphismus im Promotor des HMOX-1 Gens bestimmt die Transkriptionsrate der HO-1 und beeinflusst somit theoretisch die Stärke der Cytoprotektion.

In einer Übersichtsarbeit zur HO-1 in Tumoren werden die verschiedenen Einflüsse der HO-1 diskutiert (Jozkowicz 2007). Die Autoren kommen letztendlich zu dem Ergebnis, dass eine erhöhte Expression der HO-1 vor dem Auftreten neuer Tumoren schützen könnte. Sobald jedoch eine maligne Erkrankung vorliegt, ist die HO-1 eher als tumorfördernd zu betrachten.

Bisher wurde der GTn-Polymorphismus bei oralen Plattenepithelkarzinomen, bei Adenokarzinomen der Lunge, bei Magenkarzinomen und beim malignen Melanom untersucht.

Es zeigte sich, dass Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge signifikant häufiger die lange GTn-Repeatsequenz aufwiesen. Auch das Risiko für männliche Raucher an einem Adenokarzinom der Lunge zu erkranken war signifikant mit der langen GTn-Repeatsequenz assoziiert (Kikuchi et al. 2005). Ähnlich verhält es sich bei einer Studie, die den Zusammenhang zwischen dem GTn-Polymorphismus und dem oralen Plattenepithelkarzinomen untersuchte, sowie bei einer Studie, die den GTn-Polymorphismus bei Adenokarzinomen des Magens untersuchte (Lo et al. 2007).

Die Ergebnisse erscheinen in Anbetracht dessen, dass die basale Transkriptionsrate bei Vorliegen einer kurzen Repeatsequenz um das 2,5 fache höher ist und nur HMOX-1 Gene mit kurzer Repeatsequenz im Promotor durch oxidativen Stress induzierbar sind, schlüssig (Chen et al. 2002).

Gegensätzlich verhält es sich jedoch beim malignen Melanom (MM). Das Risiko an einem MM zu erkranken war bei Trägern des L-GTn Allels signifikant geringer als bei homozygoten Trägern des S-GTn Allels. Außerdem war das kurze Allel signifikant assoziiert mit einem höheren Breslow Index (Okamoto et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde der GTn-Polymorphismus mit klinisch-pathologische Daten und dem Überleben bei gastrointestinalen Stromatumoren, neuroendokrinen Pankreastumoren und duktaalen Adenokarzinomen des Pankreas korreliert.

Zum Zeitpunkt des Beginns der Studie lagen keine Untersuchungen vor, die den Zusammenhang von den o.g. Tumorentitäten und dem HMOX-1 GTn-Promotorpolymorphismus untersuchten.

Die meisten bisherigen Arbeiten haben zur Untersuchung des Polymorphismus DNA aus Leukozyten genutzt. Im Falle der gastrointestinalen Tumoren und teilweise der neuroendokrinen Pankreastumoren lag leider kein solches Material vor.

Es ist aber anzumerken, dass kein Unterschied des Polymorphismus in den verschiedenen Geweben gefunden werden konnte, so dass anzunehmen ist, dass der Polymorphismus in allen Geweben stabil ist.

Dies erscheint wichtig, um den GTn-Polymorphismus als prognostischen Marker für gastrointestinalen Stromatumoren und neuroendokrine Pankreastumore zu evaluieren.

Die Ergebnisse der GIST zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen dem kurzen GTn-Allel und einem aggressiven Krankheitsverlauf, im Umkehrschluss somit einen Vorteil für Träger des langen Allels. Alle Patienten mit Metastasierung gehörten dem SL-Genotyp an, ebenso dominierten die Rezidive bei Patienten mit SL-Genotyp. Des Weiteren korrelierte der GTn-Polymorphismus mit den GIST Einteilungskriterien von 2001. Die Gruppe mit niedrigem Risiko gehörte dem LL-Genotyp an, während der SL-Genotyp der Gruppe mit hohem Risiko zugeteilt werden konnte. Im Vergleich zu Patienten mit dem SL-Genotyp hatten Patienten mit dem LL-Genotyp ein signifikant besseres Ergebnis bezüglich dem rezidivfreien Überleben und dem Gesamtüberleben. Anhand der Cox-Regressionsanalyse konnte der GTn - Polymorphismus als unabhängiger prognostischer Faktor in Bezug auf das Überleben identifiziert werden. Leider wies keiner der Patienten den SS-Genotyp auf. Basierend auf den Ergebnissen wäre hier ein kürzeres rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben zu erwarten.

Bei den NEPT war es möglich, eine signifikante Korrelation zwischen dem GTn-Polymorphismus und der WHO Klassifikation zu demonstrieren. Alle benignen Tumoren gehörten dem LL-Genotyp an, alle schlecht differenzierten Tumoren gehörten dem SL- und SS-Genotyp an. Zusätzlich gehörten Tumoren des Differenzierungsgrades 1 dem LL-Genotyp an, Grad 2 und 3 beinhalteten den SL- und SS-Genotyp. Auch zeigten Träger des LL-Genotyps eine signifikant bessere rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit.

Im Gegensatz zu den GIST konnte bei den NEPT nur die WHO Klassifikation als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert werden. Die multivariate Analyse des GTn-

Polymorphismus erreichte keine statistische Signifikanz. Die Ursache dessen könnte die kleine Zahl der untersuchten Patienten sein. Wichtig ist auch anzumerken, dass unter den untersuchten Patienten nur neun Patienten mit dem SS Genotyp waren.

Bei duktalem Adenokarzinomen des Pankreas konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Träger des S-GTn Allels einen biologisch aktivierten Tumor – in Bezug auf Tumorgroße, Lymphknotenmetastasierung, Differenzierungsgrad und Rezidivrate - aufwiesen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der GTn-Polymorphismus einen unabhängigen prognostischen Marker für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben darstellt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die kurze Repeatsequenz bei allen untersuchten Tumorentitäten mit schlechteren klinisch-pathologischen Daten korreliert. Sowohl bei GIST als auch bei Adenokarzinomen des Pankreas konnte der GTn-Polymorphismus als unabhängiger prognostischer Marker für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben evaluiert werden.

Die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den bisherigen Veröffentlichungen in Bezug auf Adenokarzinome der Lunge und des Magens, sowie in Bezug auf orale Plattenepithelkarzinome. Der GTn-Polymorphismus weist bisher nur bei malignen Melanomen ähnliche Ergebnisse auf (Okamoto et al. 2006). Anzumerken bleibt jedoch, dass alle vorhergehenden Studien retrospektiv waren und kleine Patientenzahlen aufwiesen. Eine Überprüfung an großen Patientenpopulationen ist ausstehend.

Es bleibt unklar, warum die HO-1 Transkriptionsrate sich unterschiedlich auf die genannten Tumorentitäten auswirkt.

Anhand der Datenlage muss davon ausgegangen werden, dass die kurze Repeatsequenz und die damit verbundene hohe HO-1 Konzentration in GIST, NEPT und in duktalem Adenokarzinomen des Pankreas mit einer schlechteren Langzeitprognose assoziiert ist (Berberat et al. 2005, Goodman 1997, Sunamura et al. 2003, Tsuji et al. 1999).

Basierend auf den Ergebnissen kann nur angenommen werden, dass sowohl bei GIST als auch bei NEPT und Adenokarzinomen des Pankreas, Patienten mit dem ein Allel für die kurze Repeatsequenz aufweisen, von einer intensiven und aggressiven Therapie profitieren würden.

Insbesondere Therapien, die auf eine Hemmung der HMOX-1 Transkription bzw. der HO-1 zielen, könnten sich als hoch wirksam erweisen. Hierfür spricht auch, dass die HO-1 die Wirksamkeit einer Chemotherapie und einer Bestrahlung herabsetzt (Mayerhofer et al. 2004, Fang et al. 2004b, Berberat et al. 2005).

Aktuell ist keine Arbeit veröffentlicht, die eine in vivo Hemmung der Hämoxigenase-1 erforscht. Eine besondere Herausforderung stellt hier die selektive Hemmung der Hämoxigenase-1 in Tumorzellen dar.

Es bleibt festzuhalten, dass die präoperative Identifikation des GTn–Polymorphismus anhand von peripheren Leukozyten einfach und schnell durchführbar ist und dass der Polymorphismus individuell stabil ist.

Die präoperative GTn-Polymorphismus Bestimmung kann ein in Zukunft potentiell Hilfsmittel darstellen, um ein individuelles Risikoprofil sowie eine individuelle Therapie zu erstellen. Bisher ist hierfür die Untersuchung von Tumorproben unabdingbar.

Obwohl die Anzahl der untersuchten Patienten für eine genetische Studie gering ist, sind die Signifikanzen eindeutig. Die Ergebnisse stellen eine gute Basis für Folgestudien mit größeren Patientenzahlen dar, um die Effektivität des GTn-Polymorphismus als prognostischer Marker und als therapeutisches Ziel zu verifizieren.

## 6. Zusammenfassung

Die Hämoxygenase-1 und der dazugehörige Hämoxygenase-1 Polymorphismus wirken sich in unterschiedliche Weise auf humane Tumoren aus. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des Hämoxygenase-1 Polymorphismus bei gastrointestinalen Stromatumoren, neuroendokrinen Tumoren des Pankreas und in Adenokarzinomen des Pankreas zu evaluieren.

Tumorgewebe, korrespondierendes gesundes Gewebe, Metastasengewebe und Leukozyten-DNA von Patienten die an o.g. Tumoren erkrankten und sich in der chirurgischen Klinik einem operativen Eingriff unterzogen, wurde anhand PCR, Elektrophorese und DNA-Sequenzierung analysiert.

Der GTn-Polymorphismus wurde in kurze (S) und lange (L) Allele unterteilt. In den untersuchten Tumorarten war der GTn-Polymorphismus in allen untersuchten Geweben eines Patienten stabil.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die kurze Repeatsequenz bei allen untersuchten Tumorentitäten mit schlechteren klinisch-pathologischen Daten korreliert.

So war der kurze GTn-Repeatpolymorphismus in gastrointestinalen Stromatumoren signifikant assoziiert mit der Metastasierungsrate, einer höheren Rezidivrate und der Hochrisikoklassifizierung nach den GIST Konsenskriterien.

Ähnliche Ergebnisse erbrachten die Analyse des Polymorphismus bei neuroendokrinen Pankreastumoren - die kurze GTn-Repeatsequenz war signifikant assoziiert mit einem niedrigen Grading und hohen Rezidivraten. Ausnahmslos alle Patienten mit der kurzen Repeatsequenz litten an einem malignen neuroendokrinen Pankreastumor.

Bei Adenokarzinomen des Pankreas zeigten sich vergleichbare Ergebnisse. Träger der kurzen GTn-Repeatsequenz boten – in Bezug auf Tumorgröße, Lymphknotenmetastasierung, Differenzierungsgrad und Rezidivrate - einen biologisch aktiveren Tumor.

Lediglich die Prüfung des GTn-Polymorphismus als unabhängiger prognostischer Marker brachte unterschiedliche Ergebnisse.

In der multivariaten Analyse konnte der GTn-Polymorphismus bei gastrointestinale Stromatumoren als unabhängiger prognostischer Marker für das Überleben identifiziert werden

( $P = 0,0001$ ). Ebenso verhielt es sich bei Adenokarzinomen des Pankreas ( $P < 0,001$ ). Die Analyse in Bezug auf neuroendokrine Pankreastumoren erbrachte nur einen P-Wert von 0,8.

Für alle untersuchten Tumorarten gilt, dass der Polymorphismus in Zukunft zur Risikoprofilierung, zur individuellen Therapie und für das Follow-Up dienen könnte. Um die Ergebnisse an größeren Patientenzahlen zu reproduzieren und den HO-1 GTn-Polymorphismus als unabhängigen prognostischen Marker zu etablieren, erscheinen Folgestudien sinnvoll.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASCO	American Society of Clinical Onkology
BV	Biliverdin
c-KIT	Rezeptor Tyrosinkinase
CA	Carbohydrate-Antigen
CD	Cluster of differentiation
CD117	Rezeptor Tyrosinkinase
CK	Cytokeratin
CO	Kohlenstoffmonoxid
Fe	Eisen
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HO-1	Hämoxygenase-1
HO-2	Hämoxygenase-2
HR	Hazard Ratio
IL-10	Interleukin 10
IL1- $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
KI	Konfidenzintervall
KIT	Rezeptor Tyrosinkinase
MIP-1 $\beta$	Makrophagen-Entzündungsprotein 1 $\beta$
MM	Malignes Melanom
mM	Millimollar
NEPT	Neuroendokriner Pankreastumor
NO	Stickstoffmonoxid

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
RE 1-n	DNA-responsive Element
ROS	Reactive oxygen species
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor 1
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
StRE	stress responsive element
TF1-n	Transkriptionsfaktoren
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem
$\mu$ l	Mikroliter



## 8. Literaturverzeichnis

Berberat PO, Dambrauskas Z, Gulbinas A, Giese T, Giese N, Kunzli B, Autschbach F, Meuer S, Buchler MW, Friess H (2005) Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin Cancer Res* 11(10):3790-3798.

Bilimoria KY, Talamonti MS, Tomlinson JS, Stewart AK, Winchester DP, Ko CY, Bentrem DJ (2008) Prognostic score predicting survival after resection of pancreatic neuroendocrine tumors: analysis of 3851 patients. *Ann Surg* 247(3):490-500.

Bilimoria KY, Tomlinson JS, Merkow RP, Stewart AK, Ko CY, Talamonti MS, Bentrem DJ (2007) Clinicopathologic features and treatment trends of pancreatic neuroendocrine tumors: analysis of 9,821 patients. *J Gastrointest Surg* 11(11):1460-7; discussion 1467-9.

Bramhall SR AWH, Jones AG, Allwood A, Cummins C, Neoptolemos JP (1995) Treatment and survival in 13,560 patients with pancreatic cancer, and incidence of the disease, in the West Midlands: an epidemiological study. *The British journal of surgery* 82(111-115).

Cameron JL, Riall TS, Coleman J, Belcher KA (2006) One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies. *Ann Surg* 244(1):10-15.

Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, und Klöppel G (1995) Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. *Virchows Arch* 425(6):547-560.

Chang KW, Lee TC, Yeh WI, Chung MY, Liu CJ, Chi LY, Lin SC (2004) Polymorphism in heme oxygenase-1 (HO-1) promoter is related to the risk of oral squamous cell carcinoma occurring on male areca chewers. *Br J Cancer* 91(8):1551-1555.

Chen YH, Lin SJ, Lin MW, Tsai HL, Kuo SS, Chen JW, Charng MJ, Wu TC, Chen LC, Ding YA, Pan WH, Jou YS, Chau LY (2002) Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum Genet* 111(1):1-8.

DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF (2000) Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 231(1):51-58.

Deshpande V, Fernandez-del Castillo C, Muzikansky A, Deshpande A, Zukerberg L, Warshaw AL, Lauwers GY (2004) Cytokeratin 19 is a powerful predictor of survival in pancreatic endocrine tumors. *Am J Surg Pathol* 28(9):1145-1153.

Duckers HJ, Boehm M, True AL, Yet SF, San H, Park JL, Clinton Webb R, Lee ME, Nabel GJ, Nabel EG (2001) Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat Med* 7(6):693-698.

- Dunphy EP (2008) Pancreatic cancer: a review and update. *Clin J Oncol Nurs* 12(5):735-741.
- Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M (2004) The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med* 37(8):1097-1104.
- Fang J, Akaike T, Maeda H (2004a) Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 9(1):27-35.
- Fang J, Sawa T, Akaike T, Greish K, Maeda H (2004b) Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int J Cancer* 109(1):1-8.
- Fesinmeyer MD, Austin MA, Li CI, De Roos AJ, Bowen DJ (2005) Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(7):1766-1773.
- Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW (2002) Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 33(5):459-465.
- Ghaneh P, Smith R, Tudor-Smith C, Raraty M, Neoptolemos JP (2008) Neoadjuvant and adjuvant strategies for pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 34(3):297-305.
- Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML und Abraham NG (1997) Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 214(1):54-61.
- Gozzelino R, Jeney V, Soares MP (2010) Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:323-354.
- Gradistanac T, Wittekind CH (2005) Gastrointestinale Stromatumoren. *Aerzteblatt Sachsen* 1:17-19.
- Hara E, Takahashi K, Tominaga T, Kumabe T, Kayama T, Suzuki H, Fujita H, Yoshimoto T, Shirato K, Shibahara S (1996) Expression of heme oxygenase and inducible nitric oxide synthase mRNA in human brain tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 224(1):153-158.
- Hohenberger P, Reichardt P, Stroszczyński C, Schneider U, Hossfeld DK (2003) Gastrointestinale Stromatumoren - Tumorentität und Therapie mit Imatinib. *Dtsch Aerztebl* 100(23): A-1612/B-1334/C-1250
- Ishikawa K, Sugawara D, Wang X, Suzuki K, Itabe H, Maruyama Y, Lusis AJ (2001) Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in ldl-receptor knockout mice. *Circ Res* 88(5):506-512.

- Jozkowicz A, Was H und Dulak J (2007) *Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend?* Antioxid Redox Signal 9(12):2099-2117.
- Kie JH, Kaptureczak MH, Traylor A, Agarwal A, Hill-Kaptureczak N (2008) Heme oxygenase-1 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. J Am Soc Nephrol 19(9):1681-1691.
- Kikuchi A, Yamaya M, Suzuki S, Yasuda H, Kubo H, Nakayama K, Handa M, Sasaki T, Shibahara S, Sekizawa K, Sasaki H (2005) Association of susceptibility to the development of lung adenocarcinoma with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism. Hum Genet 116(5):354-360.
- Kimpara T, Takeda A, Watanabe K, Itoyama Y, Ikawa S, Watanabe M, Arai H, Sasaki H, Higuchi S, Okita N, Takase S, Saito H, Takahashi K, Shibahara S (1997) Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. Hum Genet 100(1):145-147.
- Klöppel G, Perren A, Heitz PU (2004) The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. Ann N Y Acad Sci 1014:13-27.
- La Rosa S, Klersy C, Uccella S, Dainese L, Albarello L, Sonzogni A, Doglioni C, Capella C, Solcia E (2009) Improved histologic and clinicopathologic criteria for prognostic evaluation of pancreatic endocrine tumors. Hum Pathol 40(1):30-40.
- La Rosa S, Rigoli E, Uccella S, Novario R, Capella C (2007) Prognostic and biological significance of cytokeratin 19 in pancreatic endocrine tumours. Histopathology 50(5):597-606.
- Lo SS, Lin SC, Wu CW, Chen JH, Yeh WI, Chung MY, Lui WY (2007) Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with risk of gastric adenocarcinoma and lymphovascular tumor invasion. Ann Surg Oncol 14(8):2250-2256.
- Maines MD (1988) Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. Federation Proceedings 2(10):2557-2568.
- Mayerhofer M, Florian S, Krauth MT, Aichberger KJ, Bilban M, Marculescu R, Printz D, Fritsch G, Wagner O, Selzer E, Sperr WR, Valent P, Sillaber C (2004) Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. Cancer Research 64(9):3148-3154.
- Miettinen M, Sobin, LH und Lasota, J (2005) Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow up. Am J Surg Pathol 29:52-68.

Mullan MH, P.G. Gauger und N.W. Thompson (2001) Endocrine tumours of the pancreas: review and recent advances. *ANZ J Surg* 71(8):475-482.

Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C, Wente MN, Izbicki JR, Friess H, Lerch MM, Dervenis C, Olah A, Butturini G, Doi R, Lind PA, Smith D, Valle JW, Palmer DH, Buckels JA, Thompson J, McKay CJ, Rawcliffe CL, Buchler MW (2010) Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA* 304(10):1073-1081.

Oettle H, Neuhaus P (2007) Adjuvant therapy in pancreatic cancer: a critical appraisal. *Drugs* 67(16):2293-2310.

Okamoto I, Krogler J, Endler G, Kaufmann S, Mustafa S, Exner M, Mannhalter C, Wagner O, Pehamberger H (2006) A microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with risk for melanoma. *Int J Cancer* 119(6):1312-1315.

Ono K, Goto Y, Takagi S, Baba S, Tago N, Nonogi H, Iwai N (2004) A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese. *Atherosclerosis* 173(2):315-319.

Ono K, Mannami T, Iwai N (2003) Association of a promoter variant of the haeme oxygenase-1 gene with hypertension in women. *J Hypertens* 21(8):1497-1503.

Riediger H, Keck T, Wellner U, zur Hausen A, Adam U, Hopt UT, Makowiec F (2009) The lymph node ratio is the strongest prognostic factor after resection of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 13(7):1337-1344.

Sakka N, Smith RA, Whelan P, Ghaneh P, Sutton R, Raraty M, Campbell F, Neoptolemos JP (2009) A preoperative prognostic score for resected pancreatic and periampullary neuroendocrine tumours. *Pancreatology* 9(5):670-676.

Schurr PG, Strate T, Rese K, Kaifi JT, Reichelt U, Petri S, Kleinhans H, Yekebas EF, Izbicki JR (2007) Aggressive surgery improves long-term survival in neuroendocrine pancreatic tumors: an institutional experience. *Ann Surg* 245(2):273-281.

Sener SF, Fremgen A, Menck HR, Winchester DP (1999) Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* 189(1):1-7.

Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, Sauter PK, Coleman J, Hruban RH, Lillemoe KD (2000) Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg* 4(6):567-579.

- Song Z, Wang JL, Pan YL, Tao DY, Gan MF, Huang KE (2009) Survival and prognostic factors analysis in surgically resected gastrointestinal stromal tumor patients. *Hepatogastroenterology* 56(89):149-153.
- Sunamura M, Duda DG, Ghattas MH, Lozonschi L, Motoi F, Yamauchi J, Matsuno S, Shibahara S, Abraham NG (2003) Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis* 6(1):15-24.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61(2):748-755.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R (1969) Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 244(23):6388-6394.
- Tsuji MH, Yanagawa T, Iwasa S, Tabuchi K, Onizawa K, Bannai S, Toyooka H, Yoshida H (1999) Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett* 138(1-2):53-59.
- Tulis DA, Durante W, Peyton KJ, Evans AJ, Schafer AI (2001) Heme oxygenase-1 attenuates vascular remodeling following balloon injury in rat carotid arteries. *Atherosclerosis* 155(1):113-122.
- Tworek JA, Appelman HD, Singleton TP, Greenson JK (1997) Stromal tumors of the jejunum and ileum. *Mod Pathol* 10(3):200-209.
- Tworek JA, Goldblum JR, Weiss SW, Greenson JK, Appelman HD (1999a) Stromal tumors of the abdominal colon: a clinicopathologic study of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 23(8):937-945.
- Tworek JA, Goldblum JR, Weiss SW, Greenson JK, Appelman HD (1999b) Stromal tumors of the anorectum: a clinicopathologic study of 22 cases. *Am J Surg Pathol* 23(8):946-954.
- Ujiki MB, Talamonti MS (2007) Guidelines for the surgical management of pancreatic adenocarcinoma. *Semin Oncol* 34(4):311-320.
- Verbeke CS (2008) Resection margins and R1 rates in pancreatic cancer--are we there yet? *Histopathology* 52(7):787-796.
- Verbeke CS, Leitch D, Menon KV, McMahon MJ, Guillou PJ, Anthoney A (2006) Redefining the R1 resection in pancreatic cancer. *Br J Surg* 93(10):1232-1237.
- Verbeke CS, Menon KV (2008) Variability in reporting resection margin status in pancreatic cancer. *Ann Surg* 247(4):716-717.

Wolff RA, Varadhachary GR, Evans DB (2008) Adjuvant therapy for adenocarcinoma of the pancreas: analysis of reported trials and recommendations for future progress. *Ann Surg Oncol* 15(10):2773-2786.

Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, Sasaki H (2000) Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 66(1):187-195.

Zhang L, Smyrk TC, Oliveira AM, Lohse CM, Zhang S, Johnson MR, Lloyd RV (2009) KIT is an independent prognostic marker for pancreatic endocrine tumors: a finding derived from analysis of islet cell differentiation markers. *Am J Surg Pathol* 33(10):1562-1569.

## **9. Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Emre Yekebaş, geschäftsführender Oberarzt an der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, für die Überlassung des Themas, der Patientenmaterialien und Patientendaten.

Außerdem danke ich dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. med. Y. Vashist aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf für seine ständige Unterstützung und Beratung sowie Herrn Prof. V.N. Kalinin für seine Hilfe bei den gentechnischen Verfahren.

## **10. Lebenslauf**

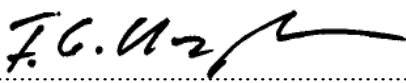
Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.



## 11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, im November 2010

Unterschrift:  .....