

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Norbert Senninger -

**MicroRNA-Analyse von Laser-
mikrodissektiertem Gewebe zur Differenzierung
zwischen Pankreaskarzinom, Pankreatitis und
gesundem Pankreas**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von

Steinfurth, Fabian

aus Demmin

2014

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Sören Torge Mees
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jörg Haier

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Norbert Senninger
- Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Sören Torge Mees
- Koreferent: Prof. Dr. med. Jörg Haier
ZUSAMMENFASSUNG

MicroRNA-Analyse von Laser-mikrodissektiertem Gewebe zur Differenzierung zwischen Pankreaskarzinom, Pankreatitis und gesundem Pankreas

Steinfurth, Fabian

Fragestellung: Das Pankreaskarzinom besitzt von allen gastrointestinalen Tumoren die schlechteste Prognose. Dies ist unter anderem den limitierten diagnostischen Möglichkeiten geschuldet, mit denen eine Früherkennung derzeit nicht zuverlässig gelingt. Ziel dieser Arbeit ist es, die MicroRNA-Expression des Pankreaskarzinoms, der chronischen Pankreatitis und des gesunden Pankreas ausgehend von FFPE-Geweben vergleichend gegenüberzustellen. Es soll gezeigt werden, dass zwischen den dukталen Zellen von gesundem Pankreas und chronischer Pankreatitis einerseits sowie den Tumorzellen des Pankreaskarzinoms andererseits Expressionsunterschiede bestehen, die zu diagnostischen und prognostischen Zwecken genutzt werden können.

Methodik: Unterteilt nach dem dukталen Adenokarzinom des Pankreas ($n = 9$), der chronischen Pankreatitis ($n = 7$) und histologisch unauffälligem Pankreasparenchym ($n = 3$), erfolgte bei 19 humanen FFPE-Geweben des Pankreas eine Isolierung von dukталen Zellen und Tumorzellen mittels Laser-Mikrodissektion. Mithilfe der Real-Time-PCR wurde die jeweiligen Zellen auf die Expression ausgewählter onkogener und tumorsupprimierender MicroRNAs (miR-21*, miR-155, miR-196a, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429) hin untersucht.

Ergebnisse: Für miR-196a konnte eine signifikante Überexpression im Pankreaskarzinom – verglichen mit der chronischen Pankreatitis und dem gesunden Pankreas – nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich hinsichtlich des Pankreaskarzinomnachweises in FFPE-Geweben ein diagnostischer Nutzen von miR-196a sowie von miR-21*. Letztere stellt eine subdominante Form der MicroRNA-21 dar und bildete bislang den Gegenstand nur weniger Studien.

Schlussfolgerung: Eine zellspezifische MicroRNA-Analyse ausgehend von FFPE-Geweben des Pankreas ist möglich, jedoch nicht für den klinischen Einsatz zu empfehlen. Die MicroRNA miR-196a stellt dabei einen potentiellen Biomarker des Pankreaskarzinoms dar, dessen diagnostische Tauglichkeit weiterführend zu untersuchen ist.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2014

Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

„MicroRNA-Analyse von Laser-mikrodissektiertem Gewebe zur Differenzierung zwischen Pankreaskarzinom, Pankreatitis und gesundem Pankreas“

in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Münster

unter der Anleitung von *Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sören Torge Mees*

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter der Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen habe,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung in einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Bielefeld, den 24.02.2014

Fabian Steinfurth

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

Isaac Newton (1643 – 1727), engl. Physiker, Mathematiker und Astronom

Inhalt

I	Abkürzungsverzeichnis.....	1
II	Verzeichnis der Abbildungen.....	11
III	Verzeichnis der Tabellen	13
1	Einleitung	15
2	Das Pankreaskarzinom	21
2.1	Epidemiologie des Pankreaskarzinoms.....	21
2.2	Ätiologie und Pathogenese	22
2.3	Topographie und Tumorlokalisierung.....	28
2.4	Histologische Einteilung des Pankreaskarzinoms	28
2.5	Klinische Symptomatik.....	29
2.6	Diagnostik	30
2.7	UICC-Klassifikation und Grading	33
2.8	Therapie	35
2.9	Prognose.....	38
3	MicroRNAs	39
3.1	miRNAs: Definition, Biosynthese, Modifikation und Funktion.....	39
3.2	Die Rolle von MicroRNAs in Tumoren	43
3.3	MicroRNA-Deregulation im duktalem Adenokarzinom des Pankreas	47
3.4	Diagnostische Wertigkeit von MicroRNAs beim Pankreaskarzinom	53
3.5	Therapeutische Bedeutung von MicroRNAs beim Pankreaskarzinom	55
3.6	Prognostische Bedeutung von MicroRNAs in Pankreaskarzinomen.....	58
3.7	Anwendung von MicroRNAs in Diagnostik und Therapie	59
4	Material und Methoden	60
4.1	Studiendesign.....	60

4.2	Auswahl der Formalin-fixierten Paraffingewebe (FFPE).....	62
4.2.1	Pankreaskarzinom-Präparate	62
4.2.2	Präparate der chronischen Pankreatitis.....	64
4.2.3	Präparate des gesunden Pankreas	65
4.3	Anfertigung und Färbung der FFPE-Schnittpräparate.....	66
4.3.1	Erstellung der Schnittpräparate gemäß der „Sandwich“-Schnitttechnik..	66
4.3.2	Färbung der Schnittpräparate	69
4.4	Histopathologische Reevaluation der Schnittpräparate	70
4.4.1	Histopathologische Diagnosesicherung.....	70
4.4.2	Festlegung der Dissektionsareale	70
4.5	Die Laser-Mikrodissektion	72
4.5.1	Prinzip der Laser-Mikrodissektion	72
4.5.2	PALM® MicroBeam.....	74
4.5.3	Vorbereitung der Laser-Mikrodissektion	76
4.5.4	Durchführung der Laser-Mikrodissektion.....	76
4.6	RNA-Extraktion der Mikrodissektate	79
4.6.1	Durchführung der RNA-Extraktion unter Nutzung des Qiagen miRNeasy FFPE-Kits.....	79
4.6.2	Photometrische Kontrolle von RNA- Konzentration und -Reinheit	82
4.6.3	Kryokonservierung der Proben.....	84
4.7	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	84
4.7.1	Prinzip der quantitativen Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion.....	84
4.7.2	Auswahl der Primer und des Housekeeping-Gens	86
4.7.3	Reverse Transkription der RNA in cDNA	89
4.7.4	Durchführung der qRT-PCR	90
4.8	Erfassung patientenbezogener Daten.....	95

4.9	Statistische Methoden	96
4.9.1	Hilfsmittel zur statistischen Auswertung.....	96
4.9.2	Untersuchung der klinischen Daten.....	96
4.9.3	Untersuchung der MicroRNA-Expression in Bezug auf die Pankreasproben	96
4.9.4	Untersuchung von Korrelationen bezüglich der MicroRNA-Expression.	97
4.9.5	Untersuchung der rezidivfreien Zeit.....	97
4.9.6	Untersuchung der Überlebenszeit.....	98
5	Ergebnisse	99
5.1	Epidemiologische und klinische Aspekte der Patientengruppen	99
5.1.1	Klinische und pathologische Charakteristika der PDAC-Patientengruppe 99	
5.1.2	Klinische und pathologische Charakteristika der Pankreatitis-Gruppe..	102
5.1.3	Charakteristika der Kontrollgruppe	103
5.2	Die MicroRNA-Expression	104
5.2.1	Expression der untersuchten MicroRNAs in Relation zum Haushaltsgen 104	
5.2.2	Die Expression der MicroRNAs miR-21*, miR-155 und miR-196a	105
5.2.3	Die Expression der MicroRNA-200-Familie	109
5.2.4	Zusammenhänge der MicroRNA-Expression	111
5.3	Das diagnostische Potential der untersuchten MicroRNAs	112
5.3.1	Diagnostisches Potential von miR-21*, miR-155 und miR-196a	112
5.3.2	Diagnostisches Potential der MicroRNA-200-Familie	115
5.4	Das prognostische Potential der untersuchten MicroRNAs.....	117
5.4.1	Einfluss der MicroRNA-Expression auf die Rezidivfreiheit.....	117
5.4.2	Einfluss der MicroRNA-Expression auf die Überlebenszeit.....	118
6	Diskussion	124

6.1	Diskussion der Methode	127
6.1.1	Formalinfixierte Paraffingewebe des Pankreas	128
6.1.2	Festlegung der Untersuchungsgruppen und Auswahl der Proben.....	130
6.1.3	Die Laser-Mikrodissektion duktaler Zellen.....	133
6.1.4	Die MicroRNA-Extraktion	136
6.1.5	Die Reinheitskontrolle bei MicroRNA-haltigen Lösungen.....	137
6.1.6	Die MicroRNA-Detektion mittels qRT-PCR	138
6.1.7	Die Primerauswahl	140
6.1.8	Das Haushaltsgen RNU6-2.....	146
6.1.9	Kritische Betrachtung der statistischen Auswertung.....	148
6.2	Bewertung des Patientenkollektivs	151
6.2.1	Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC)	152
6.2.2	Patienten mit chronischer Pankreatitis	155
6.2.3	Die Kontrollgruppe der gesunden Pankreata.....	158
6.3	Diskussion der Ergebnisse	159
6.3.1	Allgemeine Betrachtung der MicroRNA-Expression	160
6.3.2	Die Rolle von miR-21* im duktalem Adenokarzinom des Pankreas.....	163
6.3.3	miR-155 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas	170
6.3.4	miR-196a: Ein potentieller Biomarker des Pankreaskarzinoms.....	178
6.3.5	Die MicroRNA-200-Familie	185
6.3.6	Die azinäre MicroRNA-Expression	198
6.4	Konklusion.....	200
6.5	Ausblick.....	207
7	Zusammenfassung.....	210
8	Danksagung	213
9	Curriculum vitae	216

10	Quellenverzeichnis	218
11	Appendix	237
11.1	Vortrag im Rahmen der 16. Chirurgischen Forschungstage in Regensburg .	237
11.2	Erstellung der Dissertationsschrift.....	237

I Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-1-Fetoprotein
ADCY6	Gen der Adenylatcyclase 6 (12q12 – q13)
AGTR1	Gen des Angiotensin II Rezeptors, Typ 1 (3q24)
AntagomiR	MicroRNA-antagonisierendes Oligonukleotid (<i>siehe auch</i> antimiR <i>und</i> ASO), das mit funktionellen Gruppen konjugiert ist und hierüber eigenständig in die Zelle gelangen kann.
antimiR	Synthetisches Oligonukleotid (<i>siehe auch</i> ASO), das irreversibel an komplementäre MicroRNAs bindet und diese hierüber funktionsunfähig macht bzw. den Abbau selbiger induziert
ARHGEF6	Gen des X-Chromosoms (Xq26.3), welches als RAC1 Guanin Nukleotid-Austausch-Faktor fungiert
ARPC5	Gen des Aktin-verwandten Protein 2/3-Komplexes, Untereinheit 5 (1q25.3)
ASO	Antisense-Oligonukleotid; Kurzer DNA-Einzelstrang, der sich mit komplementärer mRNA oder MicroRNA verbindet und die durch RNasen vermittelte Degradation triggert
ASS	Acetylsalicylsäure
AUC	Fläche unter der Kurve (engl. <i>Area under the curve</i>); Maßeinheit der ROC-Kurve
BAP1	Gen des BRCA1-assoziierten Proteins 1 (3p21.31– p21.2)
BCL2	Gen des B-Zell-Lymphomproteins 2 (18q21.3)
betaTRC	Gen, das für eine Ligase kodiert (engl. <i>beta-transducin repeat-containing gene</i>) (10q24.32)

BIC	B-Zell-Integrations-Cluster; Gen, das für miR-155 kodiert; Synonym: MIR155HG (engl. <i>miR-155 Host Gene / B-cell integration cluster</i>) (21q21.3)
BMI	Body-Mass-Index (kg/m ²)
BOP	N-nitrosorbis(2-oxopropyl)amin; Karzinogen
BRCA	Breast-Cancer-Gen, unterteilt in BRCA1- (17q21) und BRCA2-Gen (13q12.3)
CA 15-3	Carbohydrate-Antigen 15-3
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CA 242	Carbohydrate-Antigen 242
CAMTA1	Gen des Calmodulin-bindenden Transkriptionsaktivators 1 (1p36.31 – p36.23)
Capan	Humane Pankreas Adenokarzinom- Zelllinie
CCND1	Cyclin-D1-Gen (11q13)
CDF	Difluoriniertes Curcumin; Curcumin-Analogon, das eine stärkere antioxidative Wirkung als Curcumin aufweisen und hierüber eine antikanzerogene Wirkung entfalten soll
CDK6	Cyclin-abhängige Kinase 6 (engl. <i>Cyclin dependent kinase 6</i>)
CDKN1B/C	Gen des Cyclin-abhängigen Kinaseninhibitors 1B / 1C (12p13.1 – p12)
cDNA	Komplementäre DNS (engl. <i>complementary DNA</i>)
CDON	Gen des Zelladhäsionsassoziierten, onkogen regulierten Proteins (11q24.2)
CEA	Carcinoembryonales Antigen
c-Myc	Transkriptionsfaktor, für den das Myc-Gen kodiert
CNOT6	Gen des Carbon-Katabolit-Repressionsproteins 4 (5q35.3)
CP	Chronische Pankreatitis

Cre	Tyrosin-Rekombinase; Enzym, das die Spaltung und Neuverknüpfung von Nukleinsäuren katalysiert (engl. <i>causes recombination</i>)
CT	Computertomographie
C _t	<i>Cycle Threshold</i> ; PCR-Zyklus, bei der das Fluoreszenzsignal das unspezifische Hintergrundsignal übersteigt. Je niedriger der C _t -Wert, desto höher ist die Nukleinsäuremenge im Ausgangsmaterial.
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat (= Inaktivator von RNasen)
DGCh	Deutsche Gesellschaft für Chirurgie
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DIM	Diindolmethan; natürlicherweise in Gemüse vorkommende Verbindung, der eine antikanzerogene Wirkung nachgesagt wird
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonuclein Acid</i>)
DPC4	Gen der Signal-Transduktionsproteine, Synonym zu SMAD4 (engl. <i>Deleted in Pancreatic Carcinoma Locus 4</i>) (18q21.1)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DU-PAN2	Antigen, das mit dem Pankreaskarzinom assoziiert ist und mittels monoklonaler Antikörper detektiert werden kann
EFNB1	Gen des Ephrin-B1-Proteins (Xq12)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
E2F7	Gen des E2F-Transkriptionsfaktors 7 (12q21.2)

EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
ERBB2	Gen des HER2/neu-Proteins, EGFR zugehörig (17q12)
Ets-1	Gen des Ets-1-Proteins (11q23.3)
EUS	Endoskopischer Ultraschall / Endosonographie
FAMMM	Familiäres atypisches Muttermal und Melanom-Syndrom (Synonym: Dysplastisches Nävus-Syndrom)
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis (Synonym: Polyposis coli)
FAP-1	Gen des Fimbria-assoziierten Proteins 1
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ; Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der USA
(¹⁸ F-) FDG-PET	Positronen-Emissions-Tomographie mit ¹⁸ F-Fluordesoxyglucose
FFPE	Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe (engl. <i>Formalin-fixed, Paraffin embedded Tissue</i>)
FNP	Feinnadelpunktion
FOG2	Gen des Zink-Finger-Proteins 89 B (8q23)
FOLFIRINOX	Polychemotherapie bestehend aus den Zytostatika Fluorouracil, Oxaliplatin, Irinotecan und Leucovorin
FOXO1	Gen des <i>Forkhead Box Protein O1A</i> (13q14.1)
FOXP3	Gen des <i>Forkhead Box Protein P3</i> (Xp11.23)
FPC	Familiäres Pankreaskarzinomsyndrom (engl. <i>Familial pancreatic cancer</i>)
5-FU	5-Fluorouracil; Zytostatikum
GK	Gesunde Kontrollen; hier: gesundes Pankreas
GTP	Guanosintriphosphat

Ha-ras / HRAS	Protoonkogen, das das für die gleichnamige GTPase Ha-ras (Synonym: HRAS) kodiert (engl. v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) (11p15.5)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin (-Färbung)
HER2/neu	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> ; Wachstumsfaktorrezeptor, zur EGFR-Familie zugehörig
HMGA	Proteinfamilie, <i>High mobility group A proteins</i>
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom (engl. <i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i>)
HOX	Homöobox-Gene (darunter HOXA1, HOXA7, HOXB8, HOXC8)
HR	<i>Hazard Ratio</i> ; Verhältnis an Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten eines bestimmten Ereignisses (z. B. Tod, Rezidiv etc.) in einem festgelegten Zeitraum
HSP70	Hitzeschockprotein 70 (engl. <i>Heat shock protein 70</i>)
HuD	Gen des HuD- bzw. ELAV-Like 4-Proteins; Synonym ELAVL4-Gen (1p34)
IFG	Integrierte Funktionelle Genetik; Technologieplattform und Serviceeinheit des interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (engl. <i>Insulin like growth factor 1</i>)
IKZF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung; institutioneller Forschungsverbund innerhalb der Medizinischen Fakultät der Universität Münster
IPMN	Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie des Pankreas
JAK-2	Janus-Kinase 2; im Dienste von Wachstumsfaktoren stehende Tyrosinkinase

JARID-2	Gen des <i>Jumonji-Like Protein</i> (6p24 – p23)
K-ras / KRAS	Protoonkogen, das für die gleichnamige GTPase K-ras kodiert (engl. <i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>) (12p12.1)
LCM	Laser-Mikrodissektion (häufig unter Einsatz thermoplastischer Membranen) (engl. <i>Laser Capture Microdissection</i>)
LMPC	Laser-Mikrodissektion, bei der die Dissektate gegen die Schwerkraft in ein Reaktionsgefäß katapultiert werden (engl. <i>Laser Microdissection and Pressure Catapulting</i>)
LATS2	Gen, das für die Serin / Threonin-Kinase LATS2 kodiert (engl. <i>Large Tumor Suppressor, Homolog 2</i>) (13q11 – q12)
MAPK1	Gen der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase 1(22q11.21)
MAPK4K19	Gen der Mitogen-aktivierten Proteinkinase 4, Homolog 19
MAP3K7	Gen der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase Kinase 7 (engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7</i>) (6q15)
MAP3K7IP2	Gen des Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase Kinase 7-interagierenden Proteins 2 (engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2</i>) (6q25.1)
MCN	Muzinöse zystische Neoplasie des Pankreas (engl. <i>mucinous cystic neoplasm</i>)
MDF-1	Gen, das für das MDF-1-Protein kodiert, welches wiederum zur Genstabilisierung in der Mitose beiträgt (engl. <i>yeast mitosis arrest deficient</i>) (4q27)
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition; gegenläufig zur EMT
MGpppG	Am 5'-Ende von mRNA und miRNA aufsitzende Kappe, die eine Proteinbindungsstelle darstellt. Die Kappe setzt sich aus methylierten Guanosin-Molekülen zusammen.
MIAPaCa	Humane Pankreas Adenokarzinom-Zelllinie

MicroRNA / miRNA / miR	Mikro-Ribonukleinsäuren; kleine, ca. 17 -25 Nukleotide umfassende, Ribonukleinsäuren, die nicht für Proteine kodieren
MRT	Magnetresonanztomographie
Myc	Protoonkogen, das für c-Myc kodiert (8q24.1)
NCPB	Neurolytische Plexus coeliacus Blockade
NFκB	Transkriptionsfaktor, der u. a. an der Regulation von Immunantwort, Zellproliferation und Zelltod beteiligt ist (engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>)
NTC	PCR-Leerkontrolle; cDNA-freie Probe, die als Leerkontrolle dem Ausschluss einer DNA-Kontamination dient (engl. <i>No template control</i>)
OncomiR	MicroRNA mit mutmaßlich onkogener Wirkung
p16	Gen, das für den <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i> (CDKN2A = p16) kodiert (9p21)
p27 ^(kip1)	Gen, das für den <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1 B</i> (CDKN1B = p27) kodiert (12p13.1 – p12)
p53	Protein, das den Zellzyklus reguliert und die Apoptose induzieren kann. Für p53 kodiert das TP53-Gen.
PALM	Photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie
P.A.L.M.	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried; Tochterunternehmen von Carl Zeiss Microimaging GmbH
PANC	Humane Pankreas Adenokarzinom-Zelllinie
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas (engl. <i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i>)
PDCD4	Gen, das für das <i>Programmed Cell Death 4 Protein</i> kodiert (10q24)

PEN	Polyethylenphthalat; thermoplastischer Kunststoff
PIK3R3	Gen, das für die Phosphoinositid-Kinase 3, regulatorische Untereinheit 3, kodiert (1p34.1)
PHF19	Gen, das für das PHD Finger Protein 19 kodiert (9q33.2)
POLE3	Gen, das für die Polymerase POLE3 kodiert (9q33)
PPAR α	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha; Transkriptionsfaktor; Wirkung auf Lipidhaushalt
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma; Transkriptionsfaktor; Wirkung auf Glucosestoffwechsel
PPP2R2A	Gen, das für die Protein-Phosphatase 2 kodiert (8p21.2)
PPPD	Pylorus-erhaltende (partielle) Pankreatoduodenektomie (engl. <i>Pylorus-Preserving Pancreaticoduodenectomy</i>)
PRSS1	Gen, das für das Trypsinogen PRSS1 kodiert (7q34)
Pre-miRNA	MicroRNA-Vorstufe, die nach Abspaltung mehrerer Nukleotide aus der Pri-miRNA hervorgeht
Pri-miRNA	MicroRNA-Primärtranskript
PTEN	Gen, das für das Phosphatase- und Tensin-Homolog kodiert (10q23.3)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (engl. <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>)
RAC1	Gen, das für die GTPase RAC1 (der RAS-Familie zugehörig) kodiert (7p22)
RAF1	Gen, das für das RAF1-Onkogen kodiert (3p25)
RAS	Protoonkogen, das für die GTPase RAS kodiert; zentrales Element verschiedener Signaltransduktionswege; Namensgeber für eine GTPase-Proteinfamilie (KRAS, HRAS etc.); (engl. <i>Rat Sarcoma</i>)
RBC	Lysier- und Pufferlösung (engl. <i>Red Blood Cell Lysis Buffer</i>)

RECK	Gen des RECK-Proteins (engl. <i>Reversion-inducing-cysteine-rich Protein with Kazal Motifs</i>) (9p13.3)
RIN	RNA-Integritätsnummer; Maß für die Reinheit einer RNA-haltigen Lösung (engl. <i>RNA Integrity Number</i>)
RISC	RNA- und Proteinkomplex (engl. <i>RNA-induced Silencing Complex</i>)
RNase	Ribonuklease; Enzyme, die die hydrolytische Spaltung von Ribonukleinsäuren katalysieren
RNU6-2 / RNU6B	Kleine Ribonukleinsäure, die Bestandteil von Spleißosomen ist; RNU6-2 wird häufig als Haushaltsgen in PCRs eingesetzt (10p13)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RUNX ₁ T ₁	Gen, das für den Transkriptionsfaktor RUNX ₁ T ₁ kodiert (engl. <i>Run-related Transcription Factor 1, Translocated to, 1</i>) (8q22)
Sec23a	Protein des endoplasmatischen Retikulums und ER-assoziiierter Vesikel, dem eine Beteiligung am Metastasierungsprozess nachgesagt wird; Kodierung durch das Sec23a-Gen (14q21.1)
SEM	Standardfehler; Wert, der die theoretische Streubreite der Gruppenmittelwerte angibt (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SHIP1	Gen, das für die Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase kodiert (2q37.1)
SIP1	Gen, das für das <i>SMAD-Interactin Protein 1</i> kodiert; Synonym zu ZEB2 (<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2</i>) (2q22.3)
SMAD2	Gen, das für das <i>Sma- and Mad-Related Protein 2</i> kodiert (18q21.1)
snRNA	Kleine Ribonukleinsäure, die im Zellkern lokalisiert ist und etwa 100- 300 Basenpaare umfasst (engl. <i>small nuclear ribonucleic acid</i>)

STAT3	Gen, das für den Transkriptionsfaktor STAT3 kodiert (engl. <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>) (17q21)
STK11	Gen, das für die Serin-/Threonin-Kinase 11 kodiert (19p13.3)
SYBR	Abkürzung für <i>Synergy Brands</i> , einem amerikan. Unternehmen, das u. a. den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green herstellt. Letzterer wird wiederum zum Nachweis von Nukleinsäuren verwendet.
TP53	Gen das für den Tumorsuppressor p53 kodiert (engl. <i>Tumor Protein 53-Gene</i>) (17p13.1)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl. <i>United States of America</i>)
USPSTF	<i>United States Preventive Services Task-Force</i> ; unabhängiges Expertengremium, das Vorschläge für die medizinische Prävention in den Vereinigten Staaten von Amerika erarbeitet
UV	Ultraviolettstrahlung; Licht der Wellenlänge 100 nm bis 380 nm
ZEB1	Gen, das für das Zink-Finger-E-Box-bindendes Homeobox-Protein 1 kodiert (10p11.2); ZEB-1 ist als Transkriptionsfaktor wesentlich an der Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) beteiligt
ZEB2	Synonym mit SIP1 (siehe dort)
ZNF415	Gen, das für das Zink-Finger Protein 415 kodiert (19q13.42)

II Verzeichnis der Abbildungen

<i>Abbildung 1:</i>	Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms.....	27
<i>Abbildung 2:</i>	Histologische Einteilung der Pankreastumoren im Verhältnis zu ihrer Häufigkeit.....	29
<i>Abbildung 3:</i>	Biosynthese und posttranslationale Modifizierung von MicroRNAs	42
<i>Abbildung 4:</i>	Wechselwirkung zwischen p53 und MicroRNAs in Bezug auf DNA-Schäden	43
<i>Abbildung 5:</i>	Zusammenhang zwischen <i>let-7</i> und der Entstehung von Malignomen	45
<i>Abbildung 6:</i>	Wirkung der Oncomirs.....	46
<i>Abbildung 7:</i>	Der Einfluss der MicroRNA-200-Familie auf EMT und MET	49
<i>Abbildung 8:</i>	Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte der vorliegenden Untersuchung	61
<i>Abbildung 9:</i>	Histologisches Erscheinungsbild des Pankreaskarzinoms	63
<i>Abbildung 10:</i>	Histologie der chronischen Pankreatitis.....	65
<i>Abbildung 11:</i>	Histologie des gesunden Pankreas	66
<i>Abbildung 12:</i>	Aufbereitung der FFPE-Pankreasgewebe	68
<i>Abbildung 13:</i>	Funktionsweise des Laser-Microdissection and Pressure Catapulting (LMPC)-Systems.....	75
<i>Abbildung 14:</i>	Laser-Mikrodissektion des Pankreasgewebes.....	78
<i>Abbildung 15:</i>	Primer der Real-Time-PCR.....	88
<i>Abbildung 16:</i>	Kaplan-Meier-Kurven der Überlebenszeiten	102
<i>Abbildung 17:</i>	Expression aller untersuchten MicroRNAs.....	104
<i>Abbildung 18:</i>	Die miR-21*-Expression bezogen auf die jeweiligen Untersuchungsgruppen.....	106
<i>Abbildung 19:</i>	miR-155-Expression bezogen auf die jeweiligen Untersuchungsgruppen.....	107
<i>Abbildung 20:</i>	Expression von miR-196a untergliedert nach den jeweiligen Untersuchungsgruppen.....	108
<i>Abbildung 21:</i>	Überblick über die Expression der MicroRNA-200-Familie.....	110
<i>Abbildung 22:</i>	ROC-Kurven der MicroRNAs miR-21*, miR-155 und miR-196a..	114

<i>Abbildung 23:</i>	ROC-Kurven der MicroRNA-200 Familie	116
<i>Abbildung 24:</i>	Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der miR-21*-Expression	120
<i>Abbildung 25:</i>	Kaplan-Meier-Kurven der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der miR-155-Expression	122
<i>Abbildung 26:</i>	Kaplan-Meier-Kurven der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der miR-196a-Expression.....	123
<i>Abbildung 27:</i>	Die methodische Struktur der vorliegenden Studie	127
<i>Abbildung 28:</i>	Zusammensetzung des jeweiligen Pankreasparenchyms - Gesundes Pankreas, chronische Pankreatitis und Pankreaskarzinom im Vergleich	132
<i>Abbildung 29:</i>	Entstehung und Wirkung von miR-21 und miR-21*	142
<i>Abbildung 30:</i>	Unterschiede zwischen den drei Untersuchungsgruppen dieser Studie.	151
<i>Abbildung 31:</i>	Mögliche Mutationen im Biosyntheseapparat von MicroRNAs und ihre Auswirkungen auf die Expression	162
<i>Abbildung 32:</i>	Hypothetisches Modell einer miR-21 / miR-21* vermittelten Tumor- Stroma-Interaktion	168
<i>Abbildung 33:</i>	Hypothese einer miR-155 vermittelten Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Pankreaskarzinoms	174
<i>Abbildung 34:</i>	miR-196a und das duktales Adenokarzinom des Pankreas	185
<i>Abbildung 35:</i>	Lokalisation, Sequenzierung, Expressionsverhalten und Wirkung der MicroRNA-200-Familie.....	188
<i>Abbildung 36:</i>	Die Rolle von EMT, MET und der MicroRNA-200-Familie im Metastasierungsprozess.....	192
<i>Abbildung 37:</i>	Zukunftsvision einer MicroRNA-basierten PDAC-Diagnostik und - Therapie.....	209

III Verzeichnis der Tabellen

<i>Tabelle 1:</i>	Risiko- und protektive Faktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms	25
<i>Tabelle 2:</i>	UICC-Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms	35
<i>Tabelle 3:</i>	Grading des Pankreaskarzinoms	35
<i>Tabelle 4:</i>	Bedeutende MicroRNAs, die in Pankreaskarzinomen dereguliert vorliegen	51
<i>Tabelle 5:</i>	Potentielle MicroRNAs für den präoperativen diagnostischen Einsatz..	55
<i>Tabelle 6:</i>	MicroRNAs mit nachgewiesenem tumorreduktiven Effekt bei Intervention	57
<i>Tabelle 7:</i>	MicroRNAs mit nachgewiesener prognostischer Wertigkeit hinsichtlich des Überlebens beim Pankreaskarzinom	58
<i>Tabelle 8:</i>	Deparaffinisierung und Färbung der Schnittpräparate.....	70
<i>Tabelle 9:</i>	Arbeitsschritte der RNA-Extraktion (Qiagen miRNeasy® FFPE-Kit) ..	81
<i>Tabelle 10:</i>	Pipettierschema der qRT-PCR.....	92
<i>Tabelle 11:</i>	Pipettierschema der PCR-Leerkontrolle	92
<i>Tabelle 12:</i>	Inkubationsschema qRT-PCR.....	93
<i>Tabelle 13:</i>	Charakteristika der PDAC-Untersuchungsgruppe.....	100
<i>Tabelle 14:</i>	Charakteristika der Pankreatitis-Gruppe.....	103
<i>Tabelle 15:</i>	Charakteristika der Kontrollgruppe	103
<i>Tabelle 16:</i>	Expression aller MicroRNAs in Abhängigkeit vom zugrundeliegenden Gewebe	105
<i>Tabelle 17:</i>	Gewebsspezifische Unterschiede in der MicroRNA-Expression des Pankreas	109
<i>Tabelle 18:</i>	Zusammenhänge zwischen miR-21, miR-155 und miR-196a.....	111
<i>Tabelle 19:</i>	Korrelationen der MicroRNA-200-Expression.....	112
<i>Tabelle 20:</i>	Cox-Regressionsanalyse von miR-21*, miR-155 und miR-196a in Bezug auf die Rezidivfreiheit.....	118
<i>Tabelle 21:</i>	Cox-Regressionsanalyse der MicroRNA-200-Familie in Bezug auf die Rezidivfreiheit.....	118

<i>Tabelle 22:</i>	Cox-Regressionsanalyse von miR-21*, miR-155 und miR-196a in Bezug auf die Überlebenszeit.....	119
<i>Tabelle 23:</i>	Cox-Regressionsanalyse der MicroRNA-200-Familie in Bezug auf die Überlebenszeit.....	119
<i>Tabelle 24:</i>	Vergleich der vorliegenden Arbeit mit anderen Studien	202
<i>Tabelle 25:</i>	Ergebnisvergleich der vorliegenden Untersuchung mit anderen Studien... ..	206

1 Einleitung

„In the long train of diseases to which human nature is subject, no one is attended with more hopeless misery than that which is denominated cancer, whatever part of the body may be seat of it.“ [235] Diese Aussage Dr. Thomas Denmans (1733 – 1815), dem Mitbegründer einer der ersten Krebsgesellschaften der Welt (*The Institution for Investigating the Nature and Cure of Cancer*), hat trotz der mehr als 200 Jahre, die zwischen diesem Satz und der Gegenwart liegen, auch heute kaum etwas von ihrer Aktualität eingebüßt. Sicherlich konnte die Medizin seit dem Jahr 1802, dem Jahr der eingangs genannten Formulierung, gewaltige Fortschritte verzeichnen, dennoch steht auch die moderne Medizin mit all ihren diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten den zahlreichen Tumorerkrankungen oftmals hilflos gegenüber. So erliegen jährlich über 200.000 Menschen in Deutschland einem Krebsleiden, entsprechend einem Anteil von 26 % an allen Todesursachen [33]. Dem kontinuierlichen Anstieg von Tumorerkrankungen Rechnung tragend, erwartet die WHO für das Jahr 2030 weltweit mehr als 13,1 Millionen Krebstote [180].

Als Inbegriff von Unglück und Hoffnungslosigkeit – wie es Dr. Denman im 19. Jahrhundert beschrieb – gilt eine Tumorerkrankung insbesondere dann, wenn die Perspektive einer potentiellen Heilung fehlt – sei es bei bereits sehr fortgeschrittenem Tumorleiden oder bei äußerst therapieresistenten, prognostisch ungünstigen Malignomen. Als Letzteres lässt sich das Pankreaskarzinom definieren. Mit einer Sterblichkeit von über 99 % und einer mittleren Überlebenszeit von 3 – 5 Monaten nach Diagnosestellung zählt das Pankreaskarzinom zu den Malignomen mit der schlechtesten Prognose [172, 191, 210]. Anders als bei vielen anderen malignen Erkrankungen, die durch neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten in den letzten Jahren eine deutliche Heilungssteigerung erfahren haben, ist die Prognose des Pankreaskarzinoms über die Jahrzehnte hinweg nahezu unverändert schlecht. Dies ist einerseits dem Umstand einer fehlenden Früherkennung, andererseits aber auch dem Mangel an therapeutischen Möglichkeiten bei einem fortgeschrittenen, nicht-resektablen Pankreaskarzinom geschuldet.

Nach wie vor ist das Pankreaskarzinoms nur durch eine radikale Resektion kurabel – ein Tatbestand, der sich seit der ersten dokumentierten Pankreatoduodenektomie durch Alessandro Codivilla (1861 – 1912) nicht geändert hat. Während Codivillas Patient jedoch bereits 18 Tage nach der Operation an Steatorrhoe bedingter Kachexie verstarb, gilt die partielle Pankreatoduodenektomie heute als eine sichere Operationsmethode mit einer vergleichsweise geringen perioperativen Mortalität von ca. 5 %, wobei für Deutschland aktuellen Daten zufolge die Mortalität bei 2-3 % liegt [9, 12, 62, 156]. Dies ist einerseits der ständigen Weiterentwicklung der Pankreaschirurgie zu verdanken, an deren Fortschritt keine Geringeren als William Stewart Halsted (1852 – 1922), Walther Kausch (1867 – 1928) und Allen Oldfather Whipple (1881 – 1961) beteiligt waren, andererseits aber auch auf das verbesserte perioperative Management zurückzuführen [12]. Ergänzt wird die radikale Resektion des Pankreaskarzinoms zumeist durch eine adjuvante Chemotherapie unter Nutzung von 2'-2'-Diflourdesoxycytidin – besser bekannt als Gemcitabin –, einem Antimetabolit, dessen tumorreduktive Wirkung in den 1980er Jahren von Larry Hertel (Eli Lilly and Company) entdeckt wurde [89]. Nach der Zulassung 1995 durch die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) findet Gemcitabin fortan in der in der adjuvanten und palliativen Therapie des Pankreaskarzinoms Anwendung [175, 210]. Vereinzelt genutzt werden neuere Therapieregime, in denen Gemcitabin um monoklonale Antikörper sowie Tyrosinkinasehemmer ergänzt oder durch platinhaltige Chemotherapeutika ersetzt wird [86]. Additiv kommt eine Bestrahlung als adjuvante Therapieoption infrage, die insbesondere im angloamerikanischen Raum genutzt wird [113]. Doch auch angesichts dieses multimedalen Therapiekonzeptes bleibt die Prognose des Pankreaskarzinoms weiterhin ungünstig. So wird nur in den seltensten Fällen ein Langzeitüberleben von mehr als 5 Jahren beobachtet [219]. Auch 200 Jahre nach dem Wirken Dr. Thomas Denmans, der sich der Erforschung und Heilung von Krebserkrankungen verschrieb, bleibt der Wunsch einer vollständigen Heilung des Pankreaskarzinoms zumeist noch immer unerfüllt.

Aus sozioökonomischer Sicht spielt das Pankreaskarzinom eine ebenfalls nicht unerhebliche Rolle, da infolge des demographischen Wandels mit einem altersgekoppelten Anstieg der Erkrankungsfälle und damit mit einer Steigerung der

Kosten gerechnet werden muss. So belasteten Pankreaskarzinomerkrankungen das deutsche Gesundheitssystem um die Jahrtausendwende mit etwa 353 Millionen Euro [233]. Jedes einzelne Pankreaskarzinom zog hierbei direkte und indirekte Kosten von etwa 31 375 € bei den über 65-Jährigen, bei den unter 65-Jährigen Patienten sogar von 67 966 € nach sich [163]. Aktuell müssen die Kosten für das Pankreaskarzinom jedoch deutlich höher angesiedelt werden, da die eingangs genannten Summen lediglich das Jahr 2002 widerspiegeln. Eine neuere Studie aus Schweden gibt so die durch Produktionsausfall entstandenen Kosten des Pankreaskarzinoms bereits mit 287 420 € an [233]. Diese sozioökonomischen Gegebenheiten werden dabei zunehmend die Therapiestaltung mit beeinflussen: So wird zukünftig der Fokus verstärkt auf eine möglichst lang währende Beschwerdefreiheit des Patienten liegen, um Produktionsausfall- und Hospitalisierungskosten zu minimieren. Neue Diagnose- und Therapieverfahren werden sich gleichsam aber auch vermehrt einer kritischen Betrachtung ausgesetzt sehen, um eine möglichst gute Kosten-Nutzen-Relation zu gewährleisten. Eine derartige Ökonomisierung kann hierbei sowohl als Chance, als auch als Gefahr für neue PDAC-Therapieverfahren aufgefasst werden.

Wie bei allen Krebserkrankungen stellt sich auch beim Pankreaskarzinom die Frage nach Präventionsmöglichkeiten. Unstrittig ist hierbei die präventive Bedeutung der Vermeidung von Risikofaktoren - wie etwa dem übermäßigen Alkoholkonsum oder dem Tabakkonsum [67]. Aber auch der Verzehr von grünem Tee, Curcumin, Vitamin-C-reichen Früchten und Isoflavon-haltigen Nahrungsmitteln wie Soja gilt neben einer körperlich aktiven Lebensführung als wichtige Präventionsfaktoren des Pankreaskarzinoms [201].

Neue Wege in der Prävention, Diagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms zu beschreiten ist die Aufgabe der onkologischen Forschung. Mit der Gründung der *Institution for Investigating the Cure and Nature of Cancer* legte der britische Arzt Thomas Denman 1802 den Grundstein für diese. Bereits als eine der ersten Krebsgesellschaften war die *Institution for Investigating the Cure and Nature of Cancer* ein multidisziplinäres Konstrukt, in der die Chirurgie eine wichtige Säule der

onkologischen Forschung bildete [235]. Herausragenden Persönlichkeiten wie Vinzenz Czerny (1842 – 1915), der als Chirurg das Institut für experimentelle Krebsforschung – dem direkten Vorläufer des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) – begründete, ist es zu verdanken, dass die chirurgische Forschung zu einem integralen Bestandteil der onkologischen Forschung geworden ist [138]. Es sind hierbei nicht nur operationsbezogene Fragestellungen, mit denen sich die chirurgische Forschung befasst. Vielmehr thematisiert diese das gesamte Spektrum der Onkologie und umfasst sowohl Grundlagen-, als auch angewandte Forschung, einschließlich diagnostischer und therapeutischer Aspekte. Angesichts der Komplexität von Tumorentstehung und –progression rücken zunehmend molekularbiologische Fragestellungen in den Mittelpunkt der onkologischen und damit auch der chirurgischen Forschung. Es gilt die genetischen und epigenetischen Hintergründe von Malignomen zu beleuchten, Onkogene und Tumorsuppressorgene zu identifizieren sowie ausgehend von diesen neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten aufzuzeigen.

Von besonderem Interesse in der onkologischen bzw. chirurgischen Forschung sind Moleküle, die als Biomarker bestimmter Malignome diagnostische Verwendung finden können. Eine Vielzahl derartiger Biomarker haben bereits Eingang in die Diagnostik von Malignomen gefunden, wie beispielsweise das prostataspezifische Antigen (PSA) beim Prostatakarzinom, das carcinoembryonale Antigen (CEA) beim Kolonkarzinom, das Alpha-1-Fetoprotein (AFP) beim hepatozellulären Karzinom (HCC) oder das Carbohydrate-Antigen 15-3 (CA 15-3) beim Mammakarzinom. Auch für das Pankreaskarzinom existieren diverse Biomarker, von denen CA 19-9 sicherlich das gebräuchlichste ist [171]. Die hohen Anforderungen an Sensitivität und Spezifität, die für die Primärdiagnostik von entscheidender Bedeutung sind, erfüllen jedoch nur die wenigsten Biomarker. Eine Biomarker-basierte, verlässliche Frühdiagnostik des Pankreaskarzinoms ist so zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich. Sieht man von der Primärdiagnostik ab, so sind Biomarker, die zur besseren Einschätzung der Prognose und damit zur Auswahl geeigneter Therapieverfahren beitragen, von großem Nutzen. Auch diesbezüglich gilt es entsprechende Biomarker für das Pankreaskarzinom zu finden.

Einen Wandel in der Diagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms könnte durch den Einsatz von MicroRNAs hervorgerufen werden. Bei den 1993 entdeckten MicroRNAs handelt es sich hierbei um kleine Ribonukleinsäuren, denen wichtige genregulatorische Funktionen zugeschrieben werden [19]. Mit ihren onkogenen oder tumorsupprimierenden Eigenschaften stellen die MicroRNAs einen wichtigen Gegenstand aktueller onkologischer Forschung dar [57]. So erhofft man sich durch diagnostischen und therapeutischen Einsatz der MicroRNAs die Prognose des Pankreaskarzinoms in Zukunft deutlich zu verbessern. Das Einsatzgebiet der MicroRNAs erscheint hierbei unbegrenzt: Vorstellbar ist eine Nutzung von MicroRNAs als Screeningverfahren, zur Prognoseabschätzung oder in der Therapie des Pankreaskarzinoms. Es bedarf jedoch noch einer umfangreichen wissenschaftlichen Vorarbeit, bis eine klinische Anwendung von MicroRNAs realisierbar ist. Einen kleinen Beitrag hierzu soll die hier vorliegende Untersuchung leisten.

Ziel der Arbeit ist es, archivierte humane Pankreaspräparate – untergliedert in die Gruppen des duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC), der chronischen Pankreatitis (CP) und des gesunden Pankreas (GK) – auf ausgewählte onkogene und tumorsupprimierende MicroRNAs hin zu untersuchen. Die in der Literatur als besonders relevant eingestuft MicroRNAs miR-21, miR-155 und miR-196a sollen hierbei evaluiert werden. Zusätzlich soll eine Analyse der MicroRNA-200-Familie erfolgen. Für diese konnte bereits in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe eine besondere Relevanz im Pankreaskarzinom aufgezeigt werden [157].

Der Fokus dieser Studie soll hierbei auf den, dem gesunden Pankreas und der chronischen Pankreatitis entstammenden, duktales Epithelien des Pankreas sowie auf den Tumorzellen des Pankreaskarzinoms liegen. Eine Besonderheit dieser Studie besteht darin, dass die duktales Zellen und Tumorzellen mittels Laser Microdissection and Pressure Catapulting-Technologie (LMPC) aus dem Zellverband isoliert und damit im Speziellen analysiert werden können. Die duktales Zellen sind hierbei von besonderem Interesse, da aus ihnen – nach vorherrschender Meinung – das duktales

Adenokarzinom des Pankreas hervorgeht und dieses den Großteil (ca. 90 %) aller Pankreaskarzinome ausmacht.

Ein Anliegen dieser Untersuchung ist es zu zeigen, dass auch ausgehend von Formalin-fixierten Paraffingeweben (FFPE), der gängigsten Archivierungsform histopathologischer Präparate, zellspezifische MicroRNA-Analysen möglich sind. Letzteres ist bislang eine Domäne von Zellkulturen. Ein weiteres Anliegen dieser Studie ist die Identifikation aberrant exprimierter MicroRNAs des Pankreaskarzinoms und die Evaluation des diagnostischen und prognostischen Nutzens selbiger. Ausgehend von Laser-mikrodissektierten Ductus- und Tumorzellen sollen MicroRNAs in den jeweiligen Pankreaspräparaten mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) detektiert und mögliche Expressionsunterschiede zwischen dem Pankreaskarzinom, der chronischen Pankreatitis und dem gesunden Pankreas herausgestellt werden.

Im Folgenden sollen die Grundlagen der hier vorgestellten Untersuchung dargestellt, die Ergebnisse präsentiert und jene im Kontext anderer Studien ausführlich diskutiert werden. Hierbei ist zu beachten, dass von den verschiedenen Karzinomformen des Pankreas ausschließlich das duktales Adenokarzinom Gegenstand dieser Untersuchung ist. Somit ist in dieser Arbeit der an vielfacher Stelle genannte Begriff des Pankreaskarzinoms mit dem des duktales Adenokarzinoms des Pankreas gleichzusetzen.

2 Das Pankreaskarzinom

2.1 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom stellt – mit einem Anteil von 2,8 % bei Männern und von 3,5 % bei Frauen an allen Krebserkrankungen – den dritthäufigsten malignen Tumor des Verdauungstraktes dar [99]. Aufgrund der ausgesprochenen Bösartigkeit dieses Malignoms, den unzureichenden diagnostischen Möglichkeiten zur Früherkennung sowie den limitierten Behandlungskonzepten weist das Pankreaskarzinom die schlechteste Überlebensrate aller soliden Malignome auf [103] und bildet mit einem Mortalitäts-Inzidenz-Verhältnis von 0,99 [172, 191] die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland [99].

Es handelt sich hierbei um ein Malignom des fortgeschrittenen Lebensalters – das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei ca. 69, bei Frauen bei ca. 76 Jahren [99], die Lebenszeitprävalenz des Pankreaskarzinoms beträgt 1,4% [148]. Die Inzidenz wird in der Literatur mit 5 bis 10 pro 100.000 und Jahr angegeben [148]. Im Jahr 2006 erkrankten in Deutschland etwa 6980 Frauen und 6380 Männer an einem Pankreaskarzinom [99]. Ausgehend von den epidemiologischen Daten und Trends im Zeitraum von 1980 – 2006 wird zudem weiterhin ein jährlicher Anstieg der Neuerkrankungsrate erwartet [99]. Weltweit erkranken pro Jahr etwa 170.000 Menschen neu an einem Pankreaskarzinom, das global etwa 2,1 % aller Krebsneuerkrankungen ausmacht [67]. Hierbei sind regionale und auf die jeweiligen Ethnien bezogene Unterschiede zu verzeichnen: Während Afroamerikaner, neuseeländische Maoris und indigene Hawaiianer die höchsten Inzidenzen für das Pankreaskarzinom aufweisen, zeigen Menschen im westlichen und mittleren Afrika, in Südamerika sowie in Asien die niedrigste Neuerkrankungsrate [67]. Insgesamt tritt das Pankreaskarzinom in Industrienationen häufiger, als in Schwellen- oder Entwicklungsländern auf; eine Assoziation mit dem sozioökonomischen Status konnten Studien bisher jedoch nicht belegen.

Migrationsstudien legen nahe, dass das Risiko, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln, eine Abhängigkeit von Umweltfaktoren zeigt. So scheinen Migranten die im Einwanderungsland vorherrschende Krebsrate anzunehmen, während die Krebsrate des Herkunftslandes langfristig verlassen wird [247].

2.2 Ätiologie und Pathogenese

Als Ursachen bzw. Faktoren, die zur Entstehung des Pankreaskarzinoms beitragen, werden genetische Dispositionen, Noxen, bestimmte Erkrankungen und Faktoren des Lebensstils diskutiert (*Tabelle 1*).

Eindeutig als Risikofaktor identifiziert wurde der Tabakkonsum, wobei hier in erster Linie Zigaretten das Risiko für Karzinome der Bauchspeicheldrüse erhöhen, seltener auch Kautabak, Zigarren oder passiver Tabakkonsum. Der langjährige Zigarettenkonsum führt zu einer Erhöhung des Karzinomrisikos um das 2-3fache gegenüber der nikotinabstinenten Bevölkerung [195]. Das Ausmaß der Risikoerhöhung korreliert hierbei positiv mit der Anzahl der Zigaretten, die konsumiert werden [67]. Umgekehrt reduziert die Nikotinabstinenz nach langjährigem Tabakkonsum das Risiko auf ein Pankreaskarzinom, jedoch ist auch noch 20 Jahre nach Einstellung des Nikotinkonsums das Risiko gegenüber Nichtrauchern um ca. 30 % erhöht [212]. Schätzungen zufolge sind ca. 25 % aller Pankreaskarzinome auf das Rauchen zurückzuführen [149].

Weitere, den Lebensstil betreffende Faktoren, die als potentielle Ursachen des Pankreaskarzinoms in Betracht gezogen werden müssen, sind Ernährung, Alkoholkonsum und körperliche Aktivität. Eine kalorienreiche Ernährung – insbesondere mit regelmäßigem Fleischverzehr, einem hohen Cholesterinanteil und einem hohen glykämischen Index – scheint hierbei die Entstehung eines Pankreaskarzinoms zu fördern, während antioxidativ wirkende Lebensmittel, wie Obst und Gemüse mit hohem Vitamin C- und Vitamin E- Gehalt, möglicherweise das Risiko senken können [67, 148, 195, 247]. Um den Stellenwert der Ernährung in der Ätiologie

des Pankreaskarzinoms genauer illuminieren zu können, sind allerdings weitere Studien notwendig, da aufgrund der zumeist kleinen Kohorten und der unzureichenden Signifikanz momentan keine abschließende Bewertung hierzu möglich ist. Kontrovers diskutiert wird auch der Einfluss von Alkohol- und Kaffeekonsum. Während ein erhöhter Alkoholkonsum wahrscheinlich – über die Ausbildung einer chronischen Pankreatitis – mit einem gesteigerten Risiko korreliert, müssen frühere Einschätzungen, die den täglichen Konsum von Kaffee als Risikofaktor sahen, nach derzeitiger Datenlage wohl falsifiziert werden [67]. Ferner ist auch die Rolle der körperlichen Aktivität unklar: Vermutet wird ein Zusammenhang zwischen körperlicher Inaktivität sowie Adipositas und einem gesteigerten Risiko für das Pankreaskarzinom [160]. Studien legen nahe, dass ein deutlich erhöhter Body-Mass-Index ($\text{BMI} > 35,0 \text{ kg/m}^2$) sowohl die Entstehung eines Pankreaskarzinoms fördert, als auch die Mortalität der Erkrankung erhöht [37].

Erkrankungen, die zur Entstehung eines Karzinoms der Bauchspeicheldrüse beitragen, lassen sich in exogen und endogen bedingte unterteilen. Karzinomfördernde Erkrankungen exogener Genese sind in diesem Zusammenhang Diabetes mellitus Typ 2 sowie die akute und chronische Pankreatitis. Da der Diabetes mellitus sowohl eine Ursache, als auch, durch das infiltrative Karzinomwachstum mit konsekutiver B-Zell-Destruktion, eine Folge des Pankreaskarzinoms sein kann, ist eine genaue Vorhersage der Risikoerhöhung durch den Diabetes mellitus bisher nicht praktikabel. Als mittlerweile gesichert gilt, dass ein Diabetes mellitus, der Jahrzehnte vor der Diagnose eine Pankreaskarzinoms auftritt, wohl als eine der ätiologischen Faktoren angesehen werden muss und mit einem bis zu 3fach erhöhten Risiko im Vergleich zur normoglykämischen Bevölkerung einhergeht [67, 148, 195, 247]. Mehrere Studien zeigen zudem, dass eine antidiabetische medikamentöse Therapie, insbesondere mit Metformin, Humaninsulin und PPAR- γ -Aktivatoren (Thiazolidindione, Insulin-Sensitizer), zum einen das Risiko senken, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln, zum anderen aber auch das Größenwachstum des Tumors inhibieren können [17].

Chronische oder rezidivierende akute Pankreatitiden sind zumeist Folge eines übermäßigen Alkoholkonsums und stellen einen bedeutenden ätiologischen Faktor in der Genese des Pankreaskarzinoms dar [149]. Analog zu anderen Krebserkrankungen, die im Zusammenhang mit Entzündungsgeschehen stehen, wie z.B. das Magenkarzinom bei Gastritis oder das Kolonkarzinom bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, bedingen auch hier fortwährende inflammatorische Prozesse und ein erhöhter Zellumsatz eine gesteigerte Mutationsrate, an deren Ende die Ausbildung eines Pankreaskarzinoms stehen kann. Schon im Rahmen einer chronischen Pankreatitis können Mikrosatelliteninstabilitäten und K-ras-Mutationen nachgewiesen werden, wodurch der Zusammenhang zwischen Entzündung, Genmutationen und der Entstehung eines Pankreaskarzinoms deutlich wird [31]. Für einen derartigen mehrschrittigen Prozess sprechen auch abnorme MicroRNA-Expressionsmuster bei chronischer Pankreatitis, die zwischen gesundem Pankreas und dem Pankreaskarzinom anzusiedeln sind. Endogene Ursachen des Pankreaskarzinoms sind genetisch determiniert. Ca. 5-10% aller Pankreaskarzinome lassen sich auf vorbestehende genetische Defekte zurückführen [148]. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um relativ seltene Erkrankungen, die mit einem hohen Risiko für das Pankreaskarzinom einhergehen, wie das Peutz-Jeghers-Syndrom – eine autosomal dominant vererbte hamartomartige gastrointestinale Polypose –, welchem eine Mutation des STK11-Gens auf Chromosom 19p13.3 zugrundeliegt und das durch ein erhöhtes Risiko für Krebserkrankungen aller Art, u.a. auch für das Pankreaskarzinom, gekennzeichnet ist [165]. Weitere Erkrankungen, die in diesem Zusammenhang genannt werden müssen, sind familiäre Melanome (FAMMM), familiäre Pankreatitiden (Mutation im PRSS1-Gen), Hippel-Lindau-Syndrom, Fanconi-Anämie, Ataxie-Teleangiektasie-Syndrom und das Li-Fraumeni-Syndrom [67]. Auch in der Gesamtbevölkerung deutlich höher frequentierte Mutationen können zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms beitragen. Ein Beispiel hierfür ist das BRCA2-Gen, welches in erster Linie in der Entwicklung von Mamma- und Ovarialkarzinomen eine wichtige Rolle spielt. Studien belegen jedoch, dass BRCA2-Mutationen auch mit einem erhöhten Risiko für das Pankreaskarzinom einhergehen [149]. Analog hierzu ist auch das hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC, Lynch-Syndrom) mit erhöhten Inzidenzen für das Pankreaskarzinom vergesellschaftet [149].

Tabelle 1: Risiko- und protektive Faktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms

Risikofaktoren:	Protektive Faktoren:
Hereditäre chronische Pankreatitis****	Körperliche Aktivität [#]
Peutz-Jeghers-Syndrom****	BMI < 25 kg/m ² [#]
Hippel-Lindau-Syndrom****	Obst- und gemüsereiche Ernährung [#]
Fanconi-Anämie****	Ballaststoffreiche Ernährung [#]
FAMMM-Syndrom****	Kalorienarme Ernährung [#]
Familiäres Pankreaskarzinom (FPC)****	ASS-Einnahme [#]
Chronische Pankreatitis (alkoholbedingt, idiopathisch)***	Metformin-Einnahme [#]
Tabakkonsum***	PPAR-γ-Aktivatoren-Einnahme [#]
BRCA2-Mutation***	Humaninsulin-s.c.-Applikation [#]
Li-Fraumeni-Syndrom***	Atopie [#]
Ataxie-Teleangiektasie-Syndrom***	
FAP**	
Diabetes mellitus Typ 2**	
Exposition gegenüber Chemikalien (Petroleum, Chlorkohlenwasserstoffe etc.)**	
Exposition gegenüber ionisierender Strahlung**	
HNPCC**	
Tätigkeit im aluminiumverarbeitenden Gewerbe**	
Adipositas (BMI > 25 kg/m²)*	
Alkoholkonsum*	
Blutgruppe AB0 (Risikoerhöhung: B > AB > A > 0)*	
Cholesterinreiche Ernährung*	
Fleischreiche Ernährung*	
Glucose- und Fructose-reiche Ernährung*	
Helicobacter-pylori-Besiedlung*	
Kalorienreiche Ernährung*	
Koffeinkonsum*	
Körperliche Inaktivität*	
Parodontitis*	
Salzreiche Ernährung*	
Verzehr frittierten Nahrungsmittel*	
Verzehr geräucherter/gepökelter Nahrungsmittel*	
Z.n.Cholezystitis*	
Z.n.Cholezysto-/Choledocholithiasis*	
Z.n. Cholezystektomie*	
Z.n. Magenoperationen*	

**** = Faktoren, die sehr stark mit Pankreaskarzinomen assoziiert sind und mit einem Lebenszeitrisiko von ca. 15 - 40 % einhergehen

*** = Faktoren, die stark mit Pankreaskarzinomen assoziiert sind und mit einem Lebenszeitrisiko von ca. 5 – 15 % einhergehen

** = Faktoren, die statistisch signifikant mit Pankreaskarzinomen assoziiert sind und mit einem leicht erhöhten Lebenszeitrisiko einhergehen

* = Faktoren die statistische nicht signifikant mit Pankreaskarzinomen assoziiert sind und möglicherweise das Risiko auf ein Pankreaskarzinom erhöhen

= Faktoren mit möglicherweise protektivem Einfluss auf die Entstehung von Pankreaskarzinomen; über alle Studien hinweg nicht statistisch signifikant

Die Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und wurde auf Grundlage nachfolgend aufgeführter Artikel erstellt: [11, 67, 154, 165, 195, 249]

Bei positiver Familienanamnese für das Pankreaskarzinom erhöht sich das Risiko für jenes – im Vergleich zur Normalbevölkerung – ca. um den Faktor 3 [165]. Dies zeigt, dass den genetischen Faktoren durchaus eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms zukommt.

Die genaue Pathogenese des Pankreaskarzinoms ist nach wie vor ungeklärt. Postuliert wird jedoch eine Dysplasie-Karzinom-Sequenz, die analog zum kolorektalen Karzinom stufenweise zu einer Progression vom normalen duktalem Epithel hin zum infiltrativen Pankreaskarzinom führt [94]. Belege hierfür liefern zahlreiche Untersuchungen, die Punktmutationen in morphologisch atypischen duktalem Pankreasepithelien nachweisen konnten. Diese sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) stellen die häufigsten Präkanzerosen des Pankreaskarzinoms dar, wobei sich den Schweregraden der intraepithelialen Neoplasien (PanIN 1-3) spezifische Mutationen zuordnen lassen, die mit Fortschreiten der Atypien akkumulieren (*Abbildung 1*). Frühzeitige Mutationen, die den Anfang der Dysplasie-Karzinom-Sequenz begründen, betreffen das K-ras-Onkogen sowie HER-2/neu [94]. Beide Mutationen finden sich in leichtgradigen intraepithelialen Neoplasien (PanIN 1A und PanIN 1B), welche morphologisch durch basalständige runde Nuclei und einen übermäßigen Gehalt an supranukleären Mucinen gekennzeichnet sind [95]. Hinzukommen Mutationen im p16-Tumorsuppressorgen ab PanIN-2, welche durch nukleäre Atypien definiert ist, sowie Mutationen der Tumorsuppressorgene p53, DPC4 und BRCA2 ab PanIN-3 [94]. Letztere stellt mit ihrer papillären, cribiformen Morphologie, den Mitosefiguren sowie den luminalen Nekrosen einen direkten Vorläufer des Pankreaskarzinoms dar [95]. Seltenerer Präkanzerosen des Pankreaskarzinoms sind die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinöse zystische Neoplasie (MCN). Beide werden hierbei – ähnlich der pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN) – ebenfalls in Verbindung mit den oben genannten Mutationen gebracht [5, 83].

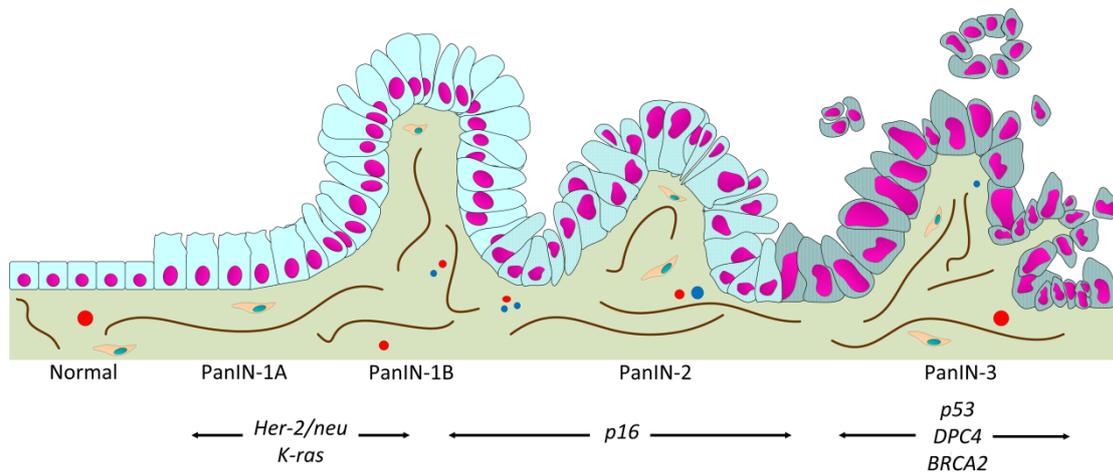


Abbildung 1: Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms

Der zunehmenden Entdifferenzierung liegt eine Akkumulation verschiedener, zeitlich versetzt auftretender Mutationen zugrunde. *Grafik modifiziert nach Jennifer Parsons-Brumbaugh [94]*

Die Ursachen der oben aufgeführten dysplastischen Veränderungen und der zugrundeliegenden Mutationen sind wahrlich vielfältig und ihrer Entwicklung noch unverstanden: So sollen inflammatorische Prozesse im Rahmen von Pankreatitiden über die Bildung freier Radikale einen erhöhten Zellumsatz und daraus resultierend eine höhere Mutationsrate bedingen [148]. Auch für Diabetes mellitus Typ II und Übergewicht als prädisponierende Faktoren existieren molekularbiologische Hypothesen hinsichtlich der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms: Sowohl Insulin, als auch IGF-1 sollen im Rahmen von Typ II-Diabetes und Adipositas vermehrt freigesetzt werden und die Zellproliferation durch Stimulierung anaboler Prozesse und Inhibierung der Apoptose fördern [17]. Zudem könne hormonell aktives Fettgewebe eine chronische, systemische Entzündung initiieren und die Angiogenese stimulieren [17]. All diese Mechanismen würden schließlich die Entstehung eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas begünstigen. Weitere Entstehungsmodelle sehen in der Akkumulation von Nitrosaminen eine Ursache des Pankreaskarzinoms. Möglicherweise ist die Entstehung des Pankreaskarzinoms auch auf eine Besiedlung des Magens durch *Helicobacter pylori* bzw. auf eine Hyperazidität des Magens zurückzuführen [195].

2.3 Topographie und Tumorlokalisation

Das Pankreas ist ein retroperitoneal gelegenes Organ mit sowohl exokriner, als auch endokriner Funktion und erstreckt sich vom Duodenum bis zur Milzpforte. Es gliedert sich hierbei in Caput, Corpus und Cauda pancreatis. Bei einer durchschnittlichen Länge von 13 -18 cm, einer Breite von 3- 4 cm sowie einer Dicke von 1-2 cm wiegt das Pankreas im Durchschnitt 70 – 90 g. Die arterielle Versorgung des Pankreas erfolgt aus Ästen der Arteria mesenterica superior sowie der Arteria splenica; äquivalent hierzu wird das venöse Blut über die Vena mesenterica superior und Vena splenica in die Pfortader abgeleitet. Zudem ist das Pankreas von zahlreichen Lymphknoten am Drüsenober- und -unterrand umgeben [58].

Tumoren des Pankreas sind bevorzugt im Pankreaskopf lokalisiert (60 - 70 % der Fälle) [28]. Deutlich seltener tritt das Pankreaskarzinom hingegen im Corpus pancreatis (10 - 20%) oder in der Cauda pancreatis (5 - 10%) auf [146]. In 25% der Fälle liegt eine diffuse Karzinom-Infiltration des Pankreas vor [198].

2.4 Histologische Einteilung des Pankreaskarzinoms

Tumoren des Pankreas können sowohl von den exokrinen Anteilen, als auch von den endokrinen Anteilen desselben ausgehen. Maligne Tumoren, wie das Pankreaskarzinom, bilden hierbei die absolute Mehrheit (99%), während benigne Tumoren relativ selten sind (1%) [28].

Das Pankreaskarzinom als Gegenstand der vorliegenden Arbeit geht von den exokrinen Anteilen des Pankreas aus und nimmt, nach gängiger wissenschaftlicher Meinung, seinen Ursprung zumeist vom Epithel der kleinen bis mittleren Pankreasgänge. Histopathologisch lässt sich das Pankreaskarzinom somit in etwa 92% der Fälle als Adenokarzinom vom duktalem Typ definieren (*Abbildung 2*). Darunter fallen auch zahlreiche Varianten, wie beispielsweise das adenosquamöse Karzinom, das muzinös-nichtzystische Karzinom sowie das anaplastische Karzinom. Weitere, dem duktalem Adenokarzinom nicht zugehörige Malignome des Pankreas sind das intraduktales

papillär-muzinöse Karzinom, das muzinöse Zystadenokarzinom sowie das Azinuszellkarzinom. Allen gemeinsam ist die frühzeitige lymphogene, perineurale und hämatogene Metastasierung, resultierend aus dem Umstand einer fehlenden Organkapsel. Auf lymphogenem Wege bilden sich somit die ersten Metastasen in den regionären Lymphknoten, derweil über den Pfortaderkreislauf Tumorzellen in die Leber geschwemmt werden und dort erste Metastasen ausbilden können [28].

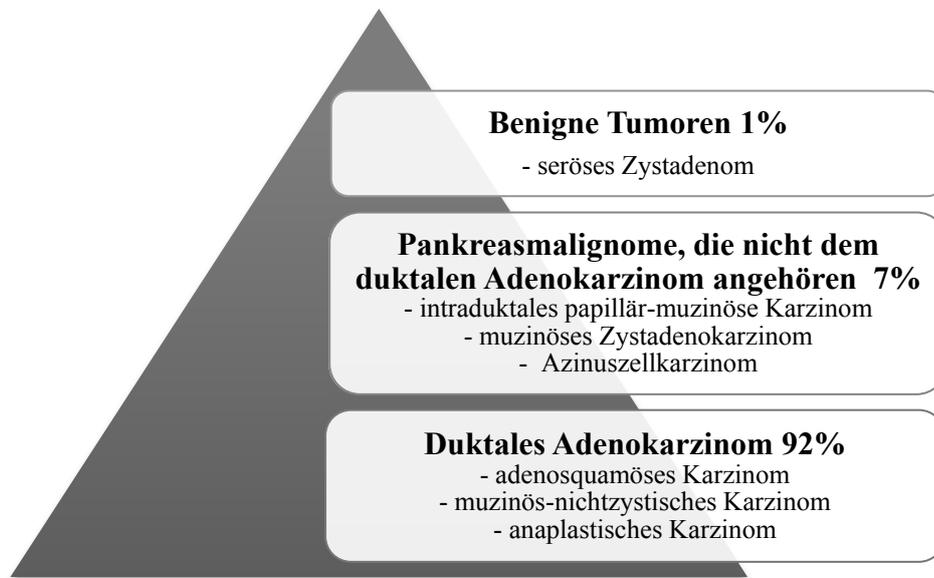


Abbildung 2: Histologische Einteilung der Pankreastumoren im Verhältnis zu ihrer Häufigkeit

Modifiziert nach: Böcker W., Denk H., Heitz P. U. (2004): Pathologie, 3. Auflage, München 2004, Elsevier GmbH/ Urban & Fischer-Verlag, p. 816, Tab. 34-1 [28]

2.5 Klinische Symptomatik

Die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms ist nicht zuletzt den uncharakteristischen Symptomen geschuldet, mit denen es einhergeht. Die meisten Karzinome des Pankreas werden erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt, da Frühsymptome nur äußerst selten auftreten. Als ein Leitsymptom des Pankreaskarzinoms – vorausgesetzt dieses ist im Caput pancreatis lokalisiert und führt zu einer Okklusion des Ductus choledochus – lässt sich der progrediente schmerzlose Ikterus definieren. Ein Frühzeichen stellt jedoch auch dieses Symptom nicht dar. Daneben existieren eine Reihe von unspezifischen Symptomen: Der epigastrisch

lokalisierte, in den Rücken ausstrahlende Schmerz stellt dabei das führende Symptom dar (82 % aller Patienten), gefolgt von Anorexie (64 %), Xerostomie (54 %), sowie Gewichtsverlust (51 %) [121]. Die meisten Symptome gehen dabei auf die Massenzunahme des Tumors sowie auf Metastasen zurück; Symptome durch tumorbedingte Störungen der exokrinen oder endokrinen Funktion des Pankreas werden seltener beobachtet. Jedoch kann auch die Erstmanifestation eines Diabetes mellitus Symptom eines Pankreaskarzinoms sein. Prospektive Studien zeigen, dass mit Zunahme der karzinombedingten Symptome eine Reduktion der Überlebenszeit verbunden ist [121].

2.6 Diagnostik

Da die symptombasierte Diagnose des Pankreaskarzinoms aufgrund der spät auftretenden und uncharakteristischen Symptomatik relativ schwierig ist, kommt der apparativen Diagnostik – insbesondere den bildgebenden Verfahren – eine besondere Rolle zu. Sonographie, Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT), Endosonographie (EUS), endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) sowie ¹⁸Fluorodesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie (¹⁸FDG-PET) sind bildgebende Verfahren, die in diesem Zusammenhang genannt werden müssen [161]. Den Anfang der bildgebenden Diagnostik markiert in der Regel die Sonographie des Abdomens – ein kostengünstiges, noninvasives und überall verfügbares Verfahren, das ein Standarddiagnostikum bei abdominellen Beschwerden darstellt. Das Vorliegen von echoarmen Pankreasherden, einer Dilatation des Ductus pancreaticus Wirsungi sowie einer Dilatation des Ductus choledochus stellen hierbei sonomorphologische Hinweise auf ein Pankreaskarzinom dar. Der Stellenwert der Sonographie in der Diagnostik des Pankreaskarzinoms ist jedoch relativ gering – lediglich 50 - 70% aller Pankreaskarzinome können mit dieser Methode erkannt werden [161]. Eine weitaus höhere Sensitivität und Spezifität hat hingegen die Computertomographie des Abdomens zu bieten: Je nach Studienlage werden dem CT eine Sensitivität von 89 - 97 % in der Erkennung des Pankreaskarzinoms zugeschrieben [161]. So ist es nicht verwunderlich, dass die in Deutschland geltende S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“ ebenfalls die Durchführung einer CT-Untersuchung zur Detektion eines Pankreaskarzinoms bei

selbigem Verdacht empfiehlt [4]. Mit der MRT wird zudem ein gleichwertiges Verfahren als strahlungsarme Alternative zur CT-Untersuchung benannt, wobei einige Studien sogar einen diagnostischen Vorteil der MRT gegenüber der CT sehen [161]. Ergänzend wird die Endosonographie (EUS) empfohlen, da diese in der Erkennung kleiner Tumoren, regionärer Lymphknotenmetastasen sowie der Gefäßinfiltration dem MRT und CT überlegen ist. Zudem steht mit der EUS-gesteuerten Feinnadelbiopsie mit nachfolgender histopathologischer Begutachtung ein Verfahren der endgültigen Abklärung zur Verfügung [161]. Da jedoch – sofern die Operabilität gegeben ist – auch Raumforderungen unklarer Dignität operiert werden sollten, ist die Feinnadelbiopsie entbehrlich, zumal sie mit einer hohen Anzahl an falsch-negativen Ergebnissen behaftet ist [4, 161]. Eine bioptische Sicherung der Diagnose ist, den Empfehlungen der S3-Leitlinie folgend, bei potentiell resektablen Befund somit nicht erforderlich [4]. Kontrovers wird auch die ERCP diskutiert: Sie kann in Einzelfällen als zusätzliches Diagnostikum zu einer Verbesserung der Spezifität bei vorher unklaren Befunden beitragen, kommt jedoch flächendeckend nicht zum Einsatz [4, 161]. Auch die PET stellt – angesichts der Unfähigkeit zur Unterscheidung zwischen Pankreatitis und Pankreaskarzinom – kein Standarddiagnostikum in der Detektion von Pankreaskarzinomen dar und findet nur bei bestimmten Fragestellungen Anwendung [161].

Eine untergeordnete Rolle in der Primärdiagnostik des Pankreaskarzinoms spielen bislang Serum-Tumormarker. Ihnen kommt jedoch eine große Bedeutung in der Verlaufskontrolle des Pankreaskarzinoms sowie zur Abschätzung der Prognose zu. Als klassische Serum-Tumormarker des Pankreaskarzinoms werden hierbei CEA, CA 19-9 und CA 242 postuliert. *X.G. Ni et al.* [171] stellten hierbei CA 19-9 als sensitivsten Marker des Pankreaskarzinoms heraus, wobei jedoch auch CEA und CA 242 ihre Berechtigung in der Diagnostik und Prognostik des Pankreaskarzinoms haben, da sie – in Kombination miteinander eingesetzt – eine höhere Spezifität als CA19-9 aufweisen. Angelehnt an die S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“ kommt im klinischen Alltag hauptsächlich CA 19-9 als Biomarker zum Einsatz. Die Expression desselben ist jedoch an die Anwesenheit von Lewis-Blutgruppenantigenen gebunden [230]. Ein Fehlen der Lewis-Blutgruppenantigene führt somit unweigerlich zu falsch-negativen

Resultaten; ca. 5 - 10 % der Patienten entgehen auf diesem Wege dem CA 19-9-Screening, so dass die Etablierung neuer Biomarker für das Pankreaskarzinom erforderlich scheint. Hinsichtlich der prognostischen Wertigkeit gilt, dass eine initial hohe Serum-Aktivität von CA 19-9, CEA und CA 242 mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert ist [171].

Ein neues Verfahren in der Primärdiagnostik des Pankreaskarzinoms könnte in der Detektion pankreaskarzinomtypischer miRNAs bestehen [25]. Hierbei ist sowohl an ein Screening von im Serum befindlicher miRNAs, als auch eine Untersuchung der miRNAs aus Biopsaten (Feinnadelbiopsie etc.) denkbar [227, 245].

2.7 UICC-Klassifikation und Grading

Gemäß der von der internationalen Vereinigung gegen Krebs (*UICC: Union for International Cancer Control, vormals: Union internationale contre le cancer*) herausgegebenen Klassifikation erfolgt die Charakterisierung des Pankreaskarzinoms hinsichtlich der Kriterien „Ausdehnung des Primärtumors [T]“, „regionärer Lymphknotenbefall [N]“ und „Fernmetastasierung [M]“. Die nachfolgende Aufstellung erlaubt einen genauen Überblick über diese Einteilung:

T = Tumorstatus; Beurteilung des Primärtumors

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ; PanIN III
T1	Tumor ist auf das Pankreas begrenzt; Größe ≤ 2 cm
T2	Tumor auf das Pankreas begrenzt; Größe > 2 cm
T3	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (peripankreatisches Fett, Duodenum, Ductus choledochus)
T4	Infiltration eines angrenzenden großen Gefäßes (Truncus coeliacus, A./V. mesenterica superior)

N = Regionärer Lymphknotenbefall

Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen nachweisbar
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
	- Befall pylorischer Lymphknoten bei Pankreaskopf-Ca
	- Befall zöliakaler Lymphknoten bei Pankreaskopf-Ca
	- Befall lienaler Lymphknoten bei Tumorlokalisation im Pankreasschwanz

M	=	Fernmetastasen
Mx		Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0		Keine Fernmetastasen nachweisbar
M1		Fernmetastasen nachweisbar
L	=	Status der Lymphgefäße
L0		Keine Infiltration der Lymphgefäße
L1		Tumorinvasion in Lymphgefäße
V	=	Tumorinvasion in Venen
V0		Keine Infiltration von Venen
V1		Mikroskopische Infiltration von Venen
V2		Makroskopische Infiltration von Venen
Pn	=	Perineurale Invasion
P0		Keine Infiltration von Nerven(scheiden)
P1		Tumorinfiltration von Nerven(scheiden)

Modifiziert nach: *TNM: Classification of Malignant Tumours, 7th Edition, 2009 [216]*

Im Rahmen des Staging wird der, von der UICC fest definierte, TNM-Status des Pankreaskarzinoms ermittelt und in Tumorstadien zusammengefasst (*Tabelle 2*). Die Tumorstadien wiederum bilden die Grundlage für das weitere therapeutische Vorgehen, das nun in kurativer oder palliativer Absicht geschehen kann:

Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms

UICC-Stadium:	T-Status:	N-Status	M-Status
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1-3	N1	M0
III	T4	Jedes N	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

Modifiziert nach: *TNM: Classification of Malignant Tumours, 7th Edition, 2009 [216]*

Neben der Zuordnung des Tumors zu einem entsprechenden Stadium (Staging), spielt auch die histopathologische Untersuchung (Grading) des Differenzierungsgrades eine wichtige Rolle für die Auswahl einer geeigneten Therapie sowie in der Abschätzung der Prognose. Anhand morphologischer Kriterien und unter Einbeziehung der Mitosezahl erfolgt histologisch eine Einteilung des Tumors zu seinem jeweiligen Differenzierungsgrad (*Tabelle 3*). Die Differenzierung korreliert hierbei mit der Prognose: Je undifferenzierter ein Pankreaskarzinom ist, desto ungünstiger ist die Prognose.

Tabelle 3: Grading des Pankreaskarzinoms

Differenzierungsgrad:	Beschreibung:	Mitosen/Gesichtsfeld:
G1	Gut differenziert	< 5 Mitosen
G2	Mäßig differenziert	6 – 10 Mitosen
G3	Gering differenziert	> 10 Mitosen

2.8 Therapie

Die Therapie des Pankreaskarzinoms ist bis zum heutigen Zeitpunkt eine Domäne der Chirurgie, da die radikale Resektion des Tumorherdes die bislang einzige Möglichkeit einer Kuration darstellt [251]. Einen potentiell kurativ resektablen Tumor weisen jedoch nur etwa 15 - 20 % der Patienten auf, wodurch den palliativen Therapiekonzepten interdisziplinärer Art ebenfalls einen hohen Stellenwert in der Therapie des Pankreaskarzinoms zukommt [251].

Chirurgischer Standard hinsichtlich des Pankreaskopfkarcinoms ist heutzutage die von Walter Kausch 1912 erstmalig durchgeführte und von Allen O. Whipple modifizierte partielle Pankreatoduodenektomie. Hierbei erfolgt die Resektion des Pankreaskopfes, des Duodenums, einschließlich des Gallenganges und der Gallenblase, sowie der regionären Lymphknoten und des Magenantrums. Letztere Entfernung dient v.a. zur Verhinderung eines Ulcus pepticum jejuni. Als Alternative hierzu wird zunehmend die pyloruserhaltende Pankreatoduodenektomie (PPPD) nach Traverso-Longmire praktiziert. Beide Techniken bieten hierbei vergleichbare Langzeitergebnisse [251]. Die Wiederherstellung der Magen-Darm-Passage umfasst bei den gebräuchlichen Rekonstruktionsweisen mit Pankreatikojejun-, Hepatikojejun- und Duodenojejunostomie (PPPD) bzw. Gastrojejunostomie (Whipple) gleich mehrere Anastomosen, so dass mit der Anastomoseninsuffizienz als eine der möglichen Komplikationen die perioperative Mortalitätsrate im Allgemeinen bei etwa 2 - 5 % anzusiedeln ist [9, 62, 156]. Einige bauchchirurgische Zentren mit Fokus auf Pankreasoperationen geben hingegen Mortalitätsraten von sogar unter 2% an [251]. Angepasst an individuellen Gegebenheiten, wie beispielsweise Gefäßinfiltrationen, können die oben genannten Operationsverfahren zudem um eine erweiterte Lymphadenektomie sowie eine Resektion der oberen Mesenterialvene oder der Pfortader ergänzt werden. Um die postoperative Überlebenszeit, die im Mittel etwa 13 - 15 Monate beträgt, zu verlängern, werden zunehmend adjuvante Therapiekonzepte eingesetzt. Diese werden jedoch kontrovers diskutiert: Während in den USA die adjuvante Radiochemotherapie als Goldstandard der Pankreaskarzinomtherapie gilt, wird in den europäischen Staaten die alleinige Chemotherapie mit 5-Fluoruracil oder Gemcitabin präferiert. Für letztere ist eine Steigerung der Überlebenszeit von ca. 15 Monaten auf ca. 20 Monaten postoperativ zumindest klar belegt [170]. Trotzdem postulieren immer mehr Studien auch eine Berechtigung der Radiatio in der Therapie des Pankreaskarzinoms, welche vor allem bei R1-reserzierten Tumoren in Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie wirkungsvoll sei [113]. Bei Lokalisation des Tumors im Corpus- oder Schwanzbereich wird eine Pankreaslinksresektion mit Splenektomie und regionärer Lymphadenektomie durchgeführt. Eine adjuvante Therapie sollte sich auch dieser Operation anschließen.

Einem Großteil der am Pankreaskarzinom erkrankten Patienten bleibt die Möglichkeit einer kurativen Therapie aufgrund der Irresektabilität des Tumors jedoch verwehrt. Hier rücken nun palliative Therapiekonzepte in den Vordergrund: Die systemische Chemotherapie mit Gemcitabin, welches aufgrund der besseren Wirksamkeit das früher verwendete 5-Fluorouracil (5-FU) abgelöst hat, steht in der Regel im Mittelpunkt der palliativen Therapie. Eine Verlängerung der Überlebenszeit ist hierbei für beide Substanzen dokumentiert [210]. Allerdings ist die Wirkung von Gemcitabin häufig durch Chemoresistenzen, die im Pankreaskarzinom durch Multidrug-resistance-Proteine vermittelt werden, limitiert, so dass die Entwicklung neuerer Chemotherapien mit optimierter Wirkung erforderlich scheint [11]. So könnte beispielsweise Polychemotherapien nach dem Schema FOLFIRINOX (Flourouracil, Oxaliplatin, Irinotecan, Leukovorin) die bisherigen Gemcitabin-basierten Chemotherapien ersetzen, da erstere – neueren Studien zufolge – dem Gemcitabin hinsichtlich der Überlebenszeit deutlich überlegen sind (FOLFIRINOX 11,1 Monate vs. Gemcitabin 6,8 Monate mediane Überlebenszeit in der palliativen Therapie) [11]. Weitere Substanzen, von denen sich eine weitere Optimierung der Behandlung des Pankreaskarzinoms erhofft wird, sind Tyrosinkinaseinhibitoren und monoklonale Antikörper, die im Wesentlichen gegen den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) gerichtet sind [253]. Erste Studienergebnisse hierzu zeichnen ein vielversprechendes Bild.

Des Weiteren umfasst die palliative Therapie symptomorientierte Behandlungsoptionen, die sowohl konservative, als auch operative Maßnahmen umfassen können. Auf operativer Seite sind hierbei die Anlage einer biliodigestiven Anastomose bei ikterischen Beschwerden oder einer Gastrojejunostomie bei Magenausgangsstenose zu nennen. Konservative und interventionelle Palliativmaßnahmen schließen wiederum die endoskopische Stenteinlage zum Offenhalten des Ductus choledochus, das Einbringen eines Duodenalstents bei Magenausgangsstenose, die Substitution von Pankreasenzymen bei tumorbedingter Pankreasinsuffizienz sowie eine suffiziente Schmerztherapie mit ein. Letztere kann sich wiederum aus einer medikamentösen Behandlung nach dem WHO-Stufenschema, aus einer interventionellen Therapie in Form einer neurolytischen Blockade des Plexus coeliacus (NCPB) oder aus psychosozialen Maßnahmen zusammensetzen [174].

2.9 Prognose

Trotz massiver Fortschritte in der Diagnostik und Therapie bleibt die Prognose des Pankreaskarzinoms nahezu unverändert schlecht: Gemittelt über alle Stadien beträgt die mittlere Überlebenszeit 3 - 5 Monate bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von 0,4 - 3% [210]. Eine adjuvante Chemotherapie vermag die Überlebenszeit zusätzlich zu steigern, so dass bestenfalls eine mittlere Überlebenszeit von ca. 20 Monaten erzielt werden kann [170]. Durch neue diagnostische Methoden, wie die hochauflösende Bildgebung und in Entwicklung befindliche Serummarker, und der Verwendung neuer adjuvanter Therapieschemata ist in Zukunft mit einem weiteren Anstieg der Überlebenszeit zu rechnen. Allem Optimismus und Fortschrittsdenken zum Trotz wird das Pankreaskarzinom voraussichtlich auch weiterhin einen hohen Rang bei den Krebstodesursachen bekleiden.

3 MicroRNAs

3.1 miRNAs: Definition, Biosynthese, Modifikation und Funktion

MicroRNAs (miRNAs) bilden den Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit. Von Victor Ambros, Rosalind Lee und Rhonda Feinbau 1993 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt, stellen miRNAs kleine, durchschnittlich 22 Nukleotide umfassende RNA-Moleküle dar, die nicht für Proteine kodieren [19]. Mit ihrem Vorkommen in Menschen, Tieren, Pflanzen und Viren bilden MicroRNAs eine der größten Genfamilien [131]. Ungeachtet ihrer geringen Größe kommt den miRNAs wichtige Aufgaben in diversen biologischen Prozessen zu: Schätzungen besagen, dass über 50% der menschlichen Gene mittels MicroRNAs reguliert werden [184]. MicroRNAs dienen hierbei der Genregulation und greifen in Überleben, Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen ein [57]. All diese Funktionen lassen unschwer erahnen, warum den miRNAs in der Entstehung und Entwicklung von Tumoren eine zentrale Bedeutung zukommt.

Ihren Ursprung nehmen die MicroRNAs von miRNA-Genen, welche sowohl in den Introns und Exons proteinkodierender Gene, als auch in nicht-kodierenden DNA-Abschnitten lokalisiert sein können (*Abbildung 3*). Die Transkription der primären miRNA-Moleküle wird hierbei im Nucleus von der RNA-Polymerase II vorgenommen [131]. Hieraus geht ein Primärtranskript, die sogenannte pri-miRNA, hervor, die in Analogie zur mRNA (messenger RNA) eine 7'MGpppG-Kappe und einen 5'-Poly-A-Schwanz besitzt. Von der nukleären RNase-III „Drosha“ mitsamt des Cofaktors „Pasha“ aufgenommen, wird die pri-miRNA von selbigem Enzymkomplex in die pre-miRNA umgewandelt. Diese wird in einem nächsten Schritt wieder von dem Enzymkomplex freigegeben und kann nun über einen GTP-abhängigen „Exportin 5“-Transporter aus dem Nucleus heraus in das Zytoplasma gelangen. Die zytoplasmatische RNase III „Dicer“ generiert zuletzt durch Abspaltung mehrerer Nukleotide die fertige, aus ca. 22 Nukleotiden zusammengesetzte, MicroRNA [57]. Hierzu wird die pre-miRNA von der Endoribonuklease „Dicer“ in zwei reife MicroRNA-Stränge gespalten – eine 3p-MicroRNA, die sich von dem 3'-Arm der Haarnadelstruktur (= intramolekulare

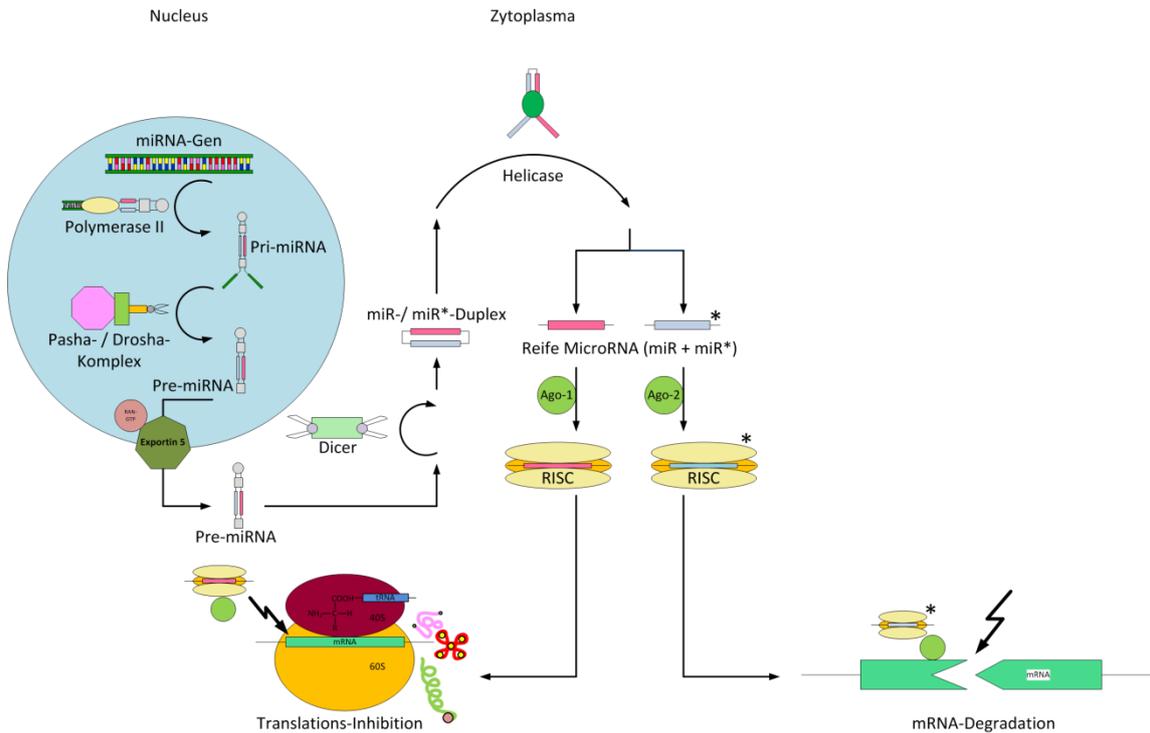
Basenpaarung, engl. *hairpin*) der pre-miRNA ableitet, sowie eine 5p-MicroRNA, die ihren Ursprung vom 5'-Arm der Haarnadelstruktur nimmt. Beide MicroRNAs unterscheiden sich hierbei sowohl in ihrer Sequenz, als auch in ihrer Stabilität. So wird eine dieser zwei MicroRNAs verstärkt abgebaut, während die andere vom Abbau weitgehend verschont wird und letztlich deutlich höher konzentriert vorliegt [178]. Die in höherer Konzentration vorliegende, dementsprechend als dominant angesehene MicroRNA „miR“ stellt die „Major“-Form dar, der bislang die hauptsächliche biologische Wirkung zugesprochen wurde. Die in niedrigerer Konzentration vorliegende MicroRNA „miR*“ galt lange Zeit als inaktive „Minor“-Form ohne wesentlichen Einfluss auf die Genregulation. Neueren Erkenntnissen zufolge spielt die „Minor“-Form miR* aber ebenfalls eine wichtige Rolle in der posttranskriptionellen Regulation von Genen [80, 178, 254]. In einigen MicroRNA-Familien sind die Konzentrationen an „Major“- und „Minor“-Form annähernd gleich, so dass in diesem Fall von einer gleichberechtigten Funktion beider MicroRNA-Unterformen auszugehen ist [178]. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass unter bestimmten Gegebenheiten ein Wechsel der Dominanz erfolgen kann, d.h. die „Minor“- zur „Major“-Form mutiert und andersherum [80]. Je nach Familie und Gegebenheiten stellt entweder die 3p- oder die 5p-MicroRNA die dominante „Major“-Form (miR) dar. „Major“-Form (miR) und „Minor“-Form (miR*) weisen hierbei unterschiedliche Zielgene auf, wirken aber jeweils über den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) auf diese.

Der sogenannte RNA-induzierte Silencing-Komplex (RISC) ermöglicht den MicroRNAs die Ausübung wichtiger genregulatorischer Funktionen. Der RNA-induzierte Silencing-Komplex (RISC) setzt sich hierbei aus reifen MicroRNAs zusammen, die sich zu einer doppelsträngigen RNA (miRNA/miRNA-Duplex) verbinden und mit einem Argonaute-Protein fusionieren. In einem finalen Schritt bindet der RNA-induzierte Silencing-Komplex (RISC) an die Ziel-messenger-RNA und kann – in Abhängigkeit vom Grad der komplementären Bindung – entweder einen Abbau derselben induzieren oder aber die Translation inhibieren [184]. Eine wichtige Rolle scheinen hierbei auch die Argonaute-Proteine zu spielen: So vermittelt das Ago1-Protein vornehmlich die Translationsinhibition, während das Ago2-Protein bevorzugt eine Degradation der Ziel-mRNA initiiert. Dieses wird möglicherweise durch die

MicroRNA-Unterformen miR/miR* gesteuert, da die „Major“-Form miR zumeist mit dem Ago1-Protein fusioniert, während die „Minor“-Form miR* oftmals eine Verbindung mit dem Ago2-Protein eingeht [80].

Über diesen komplexen Mechanismus regulieren MicroRNAs negativ die Translation der jeweiligen Ziel-mRNA und unterbinden damit gezielt die Synthese eines bestimmten Genproduktes. Bereits produzierte Proteine werden hingegen nicht durch MicroRNAs beeinflusst [24]. Jede MicroRNA ist dabei in der Lage, eine Vielzahl an Genen zu regulieren. Die regulatorische Wirkung der MicroRNAs muss hierbei nicht zwingend auf die jeweilige Zelle beschränkt sein: So wiesen *Valadi et al.* [239] MicroRNAs auch in Exosomen nach und stellten – ausgehend von dieser Beobachtung – die Hypothese auf, dass MicroRNAs über Exosomen auch an benachbarte Zellen weitergegeben werden, wo sie erneut einen wichtigen Beitrag zur Steuerung zellulärer Funktionen leisten. Neben der zellüberschreitenden Vermittlung von Angiogenese, Hämatopoese, Exozytose sowie der Zellzyklussteuerung ist auch ein onkogener Einfluss von MicroRNAs über die Zellgrenze hinweg denkbar.

Abbildung 3: Biosynthese und posttranslationale Modifizierung von MicroRNAs



Viele biologische Prozesse werden von MicroRNAs beeinflusst. So wird den MicroRNAs unter anderem eine wichtige Rolle in Tumoren [57], Diabetes mellitus [82], kardiovaskulären Erkrankungen [179] und Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises [151] zugeschrieben. Der kausale Hintergrund dafür, dass eine veränderte MicroRNA-Expression mit zahlreichen Pathologien verknüpft ist, könnte darin bestehen, dass eine differente MicroRNA-Expression eine Antwort auf DNA-Schäden darstellt. Dies jedenfalls stellten *Wan et al.*[244] heraus und mutmaßten, dass biologische Prozesse, die als Antwort auf einen DNA-Schaden ablaufen, maßgeblich von MicroRNAs reguliert werden. Ein Beispiel hierfür liefert die Apoptose bei DNA-Schädigung (*Abbildung 4*): Damit die durch p53-vermittelte Apoptose nicht bei jedem DNA-Schaden initiiert und so den Reparaturmechanismen die Möglichkeit zur Wiederherstellung der DNA genommen wird, ist die Anwesenheit von miR-504 und miR-125b nötig, um p53 herunter zu regulieren [244]. Während dies ein physiologischer Prozess ist, kann eine übermäßige Expression der eingangs genannten MicroRNAs jedoch auch zu einer dauerhaften und totalen Inhibition von p53 führen und damit der malignen Entartung einer Zelle Vorschub leisten.

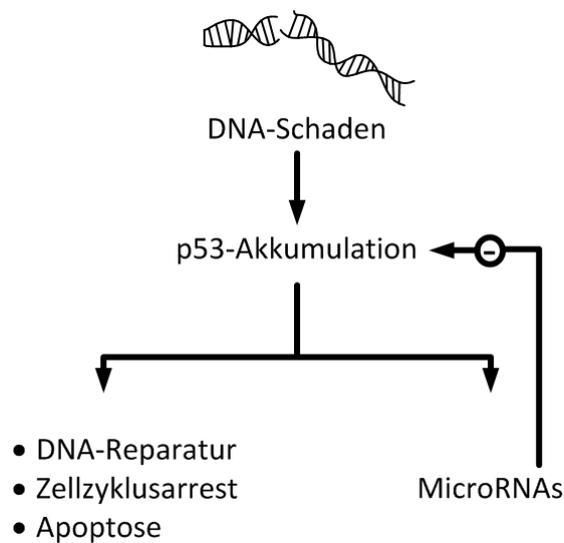


Abbildung 4: Wechselwirkung zwischen p53 und MicroRNAs in Bezug auf DNA-Schäden

Ein DNA-Schaden führt zu einer Akkumulation des p53-Proteins, welches wiederum DNA-Reparaturenzyme aktiviert und den Zellzyklus unterbricht, um eine Reparatur der geschädigten DNA zu ermöglichen. Bei ausgeprägten Schäden kommt es durch weitere Akkumulation von p53 zur Apoptose. MicroRNAs regulieren hierbei p53 auf translationaler Ebene, um eine weitere Anhäufung von p53 mit der daraus resultierenden automatischen Apoptose zu verhindern. Abbildung modifiziert nach *Billeter et. al., MicroRNAs: New helpers for surgeons*, in *Surgery*, Januar 2012, Band 151, Ausgabe 1, Seite 3 unter Berücksichtigung folgender Quellen: [24, 244]

3.2 Die Rolle von MicroRNAs in Tumoren

Ein Zusammenhang zwischen MicroRNAs und Malignomen konnte 2002 erstmalig am Beispiel der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), bei der sich eine Minderexpression von miR-143 und miR-145 zeigte, hergestellt werden [25]. Dies stellte den Startschuss für nachfolgende Studien dar, die nun die MicroRNA-Expression weiterer Tumoren beleuchteten und ebenfalls Deregulationen derselben nachweisen konnten. So sind heute aberrante MicroRNA-Expressionsmuster bei nahezu jeder Tumorart bekannt: Der Bogen spannt sich hierbei von hämatopoetischen Erkrankungen wie den Leukämien bis hin zu den soliden Tumoren in ihren verschiedenen Formen: Blastome, Karzinome und Sarkome. Der Umstand, dass MicroRNAs sowohl als

Onkogene, als auch als Tumorsuppressoren wirken können, macht sie zu einem zentralen Faktor in der onkologischen Forschung.

Um zu verstehen, warum den MicroRNAs eine zentrale Rolle in der Entstehung und Progression maligner Tumoren zukommt und welche Chancen sich hieraus ableiten, muss man sich noch einmal genauer die Wirkweise der MicroRNAs anschauen: MicroRNAs regulieren vornehmlich die Synthese solcher Proteine, die in zentralen Signalwegen der Zelle eingebunden oder aber für die zelluläre Homöostase, einschließlich des Zellzyklus zuständig sind [24]. Die Regulation erfolgt hierbei auf translationaler Ebene und ist umso stärker, je größer der Umsatz des entsprechenden Genproduktes ist. Es findet ausschließlich eine negative Regulation statt. Hat nun eine bestimmte MicroRNA ein Protoonkogen, also ein Gen, das für Zellwachstum, -teilung und -differenzierung zuständig ist, als Zielstruktur und reguliert diese negativ, so führt eine Minderexpression der MicroRNA zu einer vermehrten Bildung dieses Protoonkogens. Wird dieses nun übermäßig und unkontrolliert freigesetzt, so kann es – nun in der Funktion eines Onkogens – zu einer Entartung der Zelle beitragen. Als Beispiel hierfür lässt sich das Ras-Protoonkogen anführen, welches von der MicroRNA *let-7* reguliert wird (*Abbildung 5*). Die MicroRNA *let-7* fungiert als Tumorsuppressor [25]. Eine verminderte Expression von *let-7* findet sich in zahlreichen Tumoren – wie z.B. in duktalem Adenokarzinomen des Pankreas, in Bronchialkarzinomen sowie in kolorektalen Karzinomen [104]. Infolge dieser verminderten Synthese von *let-7* ist dieses nicht in der Lage, eine ausreichende supprimierende Wirkung auf das Ras-Protoonkogen auszuüben, woraus letztlich eine übermäßige Freisetzung des GTP-bindenden Proteins Ras resultiert. Dieses ist Bestandteil zahlreicher Rezeptor-Tyrosinkinasen und darüber indirekt an der Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren beteiligt. Am Ende dieses mehrstufigen Prozesses steht das ungebremste Zellwachstum, welches ein Charakteristikum von Malignomen darstellt.

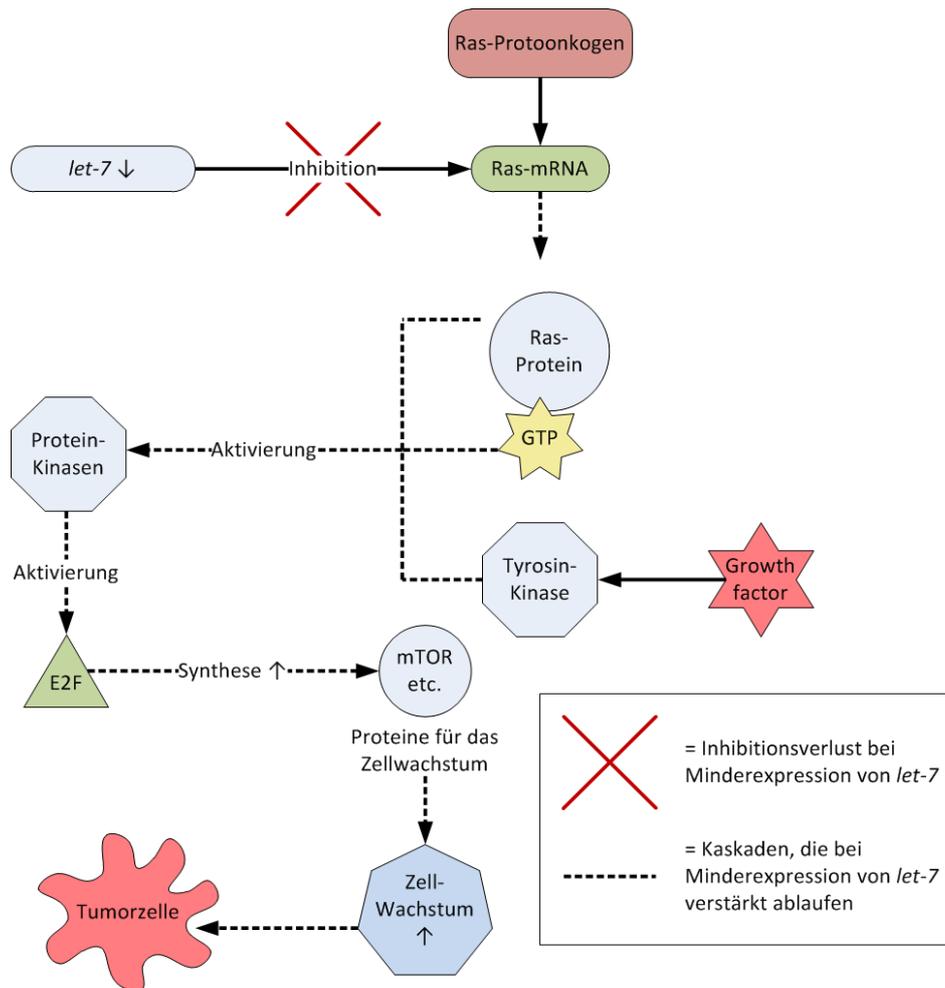


Abbildung 5: Zusammenhang zwischen *let-7* und der Entstehung von Malignomen

Die MicroRNA *let-7* wirkt im Sinne eines Tumorsuppressors. Eine Minderexpression von *let-7* resultiert hierbei in einer gesteigerten Biosynthese des Ras-Proteins. Dieses ist über die Aktivierung von Protein-kinasen und Transkriptionsfaktoren direkt mit dem Zellwachstum gekoppelt. Somit kann eine verminderte Expression von *let-7* über mehrere Stufen zu einer Entartung der Zelle führen.

Neben der Minderexpression bestimmter MicroRNAs lassen sich in Tumoren aber auch hochregulierte MicroRNAs nachweisen. Hierzu gehören beispielsweise miR-21, welches einen antiapoptotischen Faktor darstellt sowie das miR-17/92 Cluster, das mit c-Myc assoziiert ist und die Tumorentwicklung fördert [243]. Derartige MicroRNAs wirken somit als Onkogene. Die Zielgene derartiger MicroRNAs haben hierbei antiproliferative Aufgaben, d.h. sie unterdrücken u.a. die Angiogenese, hemmen das Zellwachstum, vermindern die Zellmigration, führen zum Zellzyklusarrest oder lösen die Apoptose aus. Im Falle einer Überexpression der regulatorischen MicroRNAs, wie

sie sich in Tumoren findet, überwiegt die Suppression der antiproliferativen Genprodukte, so dass die hiervon betroffenen Zellen entarten und einen malignen Charakter entwickeln (*Abbildung 6*). Einige dieser als Onkogen wirkenden MicroRNAs, die auch als sogenannte „Oncomirs“ [57] bezeichnet werden, kommen tumorübergreifend vor, während andere MicroRNAs spezifisch für das jeweilige Malignom sind. MicroRNAs, die in nahezu allen soliden Malignomen als überexprimiert identifiziert wurden, sind miR-21 und miR-17-p.

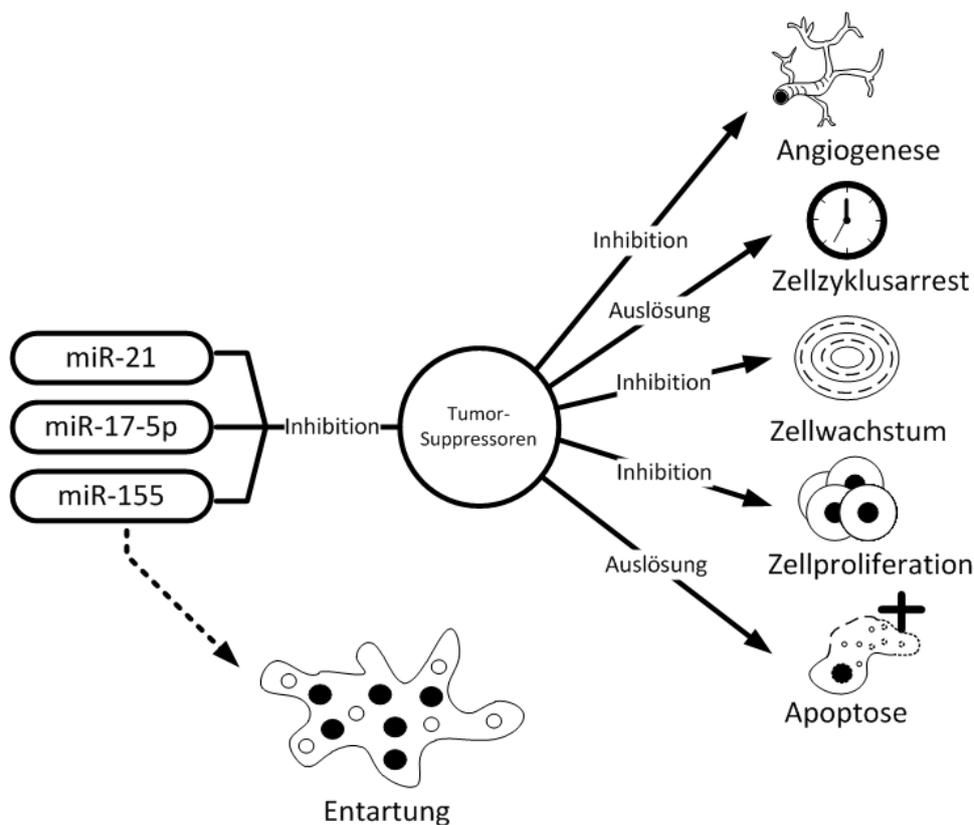


Abbildung 6: Wirkung der Oncomirs

miR-21, miR-155 und miR-17-5p sind MicroRNAs, die als Onkogene wirken und in vielen Tumoren überexprimiert sind. Über eine negative Regulation von Tumorsuppressoren stimulieren sie indirekt Angiogenese, Proliferation und Zellwachstum und verhindern zudem, dass der Zellzyklus unterbrochen und die Zelle apoptotisch wird. Damit tragen sie maßgeblich zur Entartung von Zellen bei.

Angesichts der Tatsache, dass Malignome oftmals mit einer ganzen Reihe von deregulierten MicroRNAs vergesellschaftet sind, ist es möglich, dass diesen Expressionsalterationen Veränderungen in grundlegenden Mechanismen der Biosynthese von MicroRNAs zugrundeliegen [25]. Gestützt wird diese Hypothese durch Studien, die nachweisen konnten, dass in der Tat einige Malignome – darunter das Prostatakarzinom, das Burkitt-Lymphom und das Bronchialkarzinom, aber auch das duktales Adenokarzinom des Pankreas – mit erhöhten oder erniedrigten Dicer (= RNase III)-Werten einhergehen [25, 246].

All diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass MicroRNAs mit zu den bedeutendsten Faktoren in der Entstehung sowie Progression von Malignomen gehören und damit zu einem zentralen Angriffspunkt in der Diagnostik und Therapie maligner Tumoren avancieren. Dies gilt für einen Großteil aller Malignome – wenn nicht gar für alle malignen Tumoren – einschließlich dem Pankreaskarzinom.

3.3 MicroRNA-Deregulation im duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) bildet auch im Hinblick auf eine deregulierte MicroRNA-Expression gegenüber anderen Malignomen keine Ausnahme. Als einer der Ersten zeigten *Lee et al.* 2007 [129], dass eine Vielzahl an MicroRNAs im Pankreaskarzinom dereguliert vorliegt. Die Arbeitsgruppe postulierte eine Überexpression der bereits in anderen Malignomen nachgewiesenen MicroRNAs miR-21, miR-155 und miR-221/miR-222 sowie eine verminderte Expression für miR-375. Von den 201 untersuchten MicroRNAs stellten sich, verglichen mit gesunden Pankreata, 100 als aberrant dar. Im gleichen Jahr gelang es der Arbeitsgruppe um *Szafrańska et al.* [226] die MicroRNAs miR-216 und miR-217 als spezifisch für das Pankreaskarzinom zu identifizieren. Gleichzeitig konnten sie herausstellen, dass anhand des Expressionsmusters weniger MicroRNAs – in diesem Fall miR-217 und miR-196a – eine Unterscheidung zwischen gesundem Pankreas, chronischer Pankreatitis und dem Pankreaskarzinom möglich ist. *Bloomston et al.* [26] unterstrichen dies mit ihrer Studie, in der sie 21 MicroRNAs – darunter miR-21, miR-221, miR-222, miR-181a, miR-181b, miR-181d und miR-155 – herausarbeiteten, mit denen eine Differenzierung zwischen

Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas zu gelingen scheint. Zudem wiesen sie der MicroRNA miR-196a die Rolle eines prognostischen Biomarkers zu, da die deutliche Überexpression derselben mit einer deutlich verringerten Überlebenszeit (14,3 Monate vs. 26,5 Monate mediane Überlebenszeit) assoziiert ist. Eine ähnliche Bedeutung kommt auch der MicroRNA miR-21 zu: 2008 konnten *Dillhoff et al.* [48] aufzeigen, dass miR-21 in Pankreaskarzinomen deutlich überexprimiert ist sowie bei nodal nicht-metastasierten Patienten ein Prädiktor des Überlebens darstellt. Analog zu miR-196a gilt somit auch für miR-21, dass eine übermäßige Expression selbiger mit einem verminderten medianen Überleben verbunden ist (15,2 Monate vs. 27,7 Monate mediane Überlebenszeit). *Zhang et al.* [261] evaluierten schließlich 95 MicroRNAs in Pankreazelllinien und -resektaten unter der Annahme, dass Pankreaskarzinome ein einzigartiges MicroRNA-Profil aufweisen, das wiederum zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken aufgegriffen werden kann. Als Resultat dieser Evaluation konnten acht MicroRNAs ermittelt werden, die in Pankreaskarzinomen überexprimiert vorliegen. So zeigten sich im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe bei Karzinomen 3 - 2018 fach erhöhte Werte für miR-196a, miR-190, miR-186, miR-221, miR-222, miR-200b, miR-15b und miR-95.

Eine große Bedeutung scheint zudem auch der MicroRNA-200-Familie zuzukommen. Seit den Untersuchungen von *Gregory et al.* [75] ist bekannt, dass Mitglieder der miR-200-Familie Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) nehmen. Die epithelial-mesenchymale Transition ist ein der Embryogenese entstammendes Prinzip, das es den Zellen erlaubt, Zellverbände aufzulösen und so die Zellmobilität zu steigern. Dieser in der Embryogenese physiologische Mechanismus wird von Tumoren kopiert und befähigt diese zur Invasion und Metastasierung. Die MicroRNA-200-Familie übt hierbei einen inhibierenden Einfluss auf die auslösenden Faktoren der epithelial-mesenchymalen Transition – ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) und ZEB2 (zinc finger E-box binding homeobox 2 = SIP1) – aus und induziert hierüber eine epitheliale Differenzierung, u.a. mittels einer vermehrten Synthese des Adhäsionsproteins E-Cadherin [34, 133]. Studien zufolge weist die Mehrheit der Pankreaskarzinome eine übermäßige Expression der MicroRNAs miR200a, miR-200b

und miR-200c auf, welche zudem positiv mit der E-Cadherin-Expression korrelieren [133, 258]. Der epitheliale Phänotyp der Zellen wird somit durch die MicroRNA-200-Familie stabilisiert (Abbildung 7). Dies wiederum scheint das invasive und metastatische Potential des Pankreaskarzinoms herabzusetzen, aufgrund dessen der MicroRNA-200-Familie in zahlreichen Untersuchungen einen tumorsupprimierenden Charakter zugeschrieben wird. Diese These stützend, wiesen *Yu et al.* [258] für Patienten, deren Pankreaskarzinome hohe Expressionswerte für miR-200c zeigten, höhere Überlebensraten nach, als bei solchen mit niedrigen miR-200c-Expressionswerten.

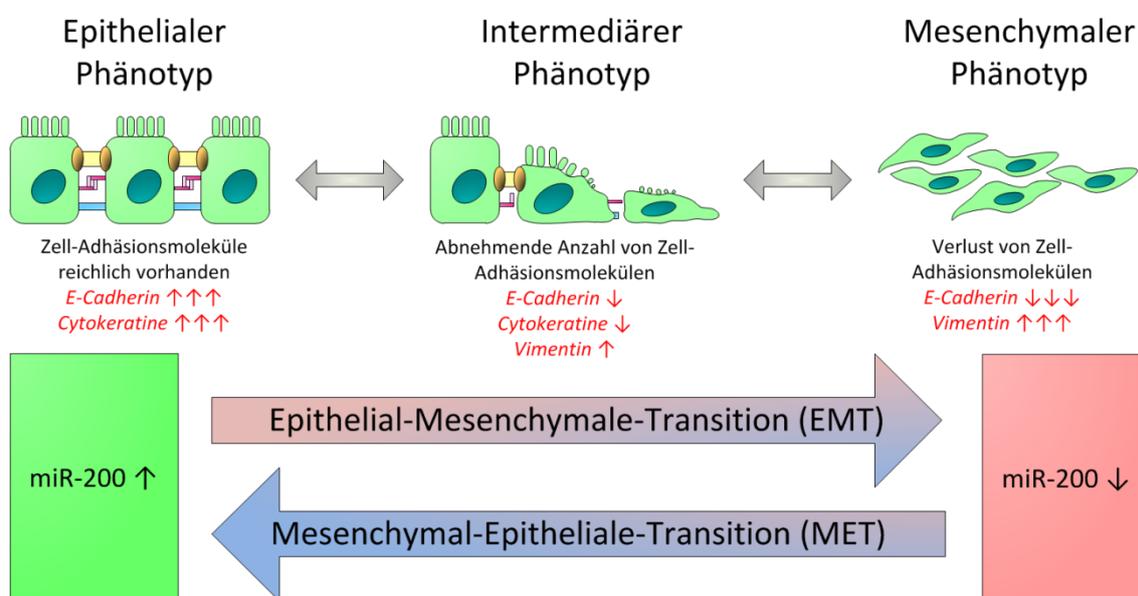


Abbildung 7: Der Einfluss der MicroRNA-200-Familie auf EMT und MET

Eine hohe Expression der MicroRNA-200-Familie stabilisiert den epithelalen Phänotyp von Zellen. Mit sinkender miR-200-Expression nimmt die Zelle jedoch eine mesenchymale Gestalt an – sie durchläuft eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Dieser Vorgang ist jedoch prinzipiell reversibel: Steigt die miR-200-Expression wieder an, so kann die Zelle in die epitheliale Ausgangskonfiguration zurückkehren. Dies wird als mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bezeichnet. Die EMT gilt im Allgemeinen als tumorfördernder Mechanismus, während umgekehrt die MET eher als tumorsupprimierend angesehen wird. Diese Sichtweise ist jedoch nicht unumstritten. Abbildung modifiziert nach *Kalluri et Weinberg: The basics of epithelial-mesenchymal-Transition*, in *Journal of Clinical Investigation*, Mai 2010, Band 119, Ausgabe 6, Seite 1420 – 1428 [108].

Obgleich die Mehrheit der Studien die tumorsupprimierenden Eigenschaften der MicroRNA-200-Familie in den Vordergrund stellt, ist die Einstufung der MicroRNA-200-Familie als Tumorsuppressor nicht unumstritten. So konnte beispielweise für das Mamma-Karzinom eine verstärkte Metastasierungsneigung bei Überexpression der MicroRNA-200-Familie beobachtet werden [53]. Auch *Yu et al.* [258], die der MicroRNA miR-200c für das Pankreaskarzinom zwar eine überwiegend tumorsupprimierende Wirkung attestierten, mussten eingestehen, dass mit zunehmender miR-200c-Expression auch die Zellproliferationsrate ansteigt. Resümierend kann festgestellt werden, dass die Rolle der MicroRNA-200-Familie bislang nicht eindeutig geklärt ist. So bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Funktion der MicroRNA-200-Familie eindeutig zu definieren.

Einen Einfluss auf die Fähigkeit zur Invasion pankreatischer Karzinomzellen wird auch den MicroRNAs miR-10a und miR-10b zugeschrieben. Untersuchungen hierzu zeigten, dass beide MicroRNAs im Pankreaskarzinom übermäßig exprimiert werden. Diese Überexpression steht, Transfektionsanalysen zufolge, in kausalem Zusammenhang mit einer stärkeren Zellinvasion, die wiederum mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist [168, 177]. Einen umgekehrten Effekt scheint die MicroRNA miR-31 auszuüben: Die MicroRNA miR-31 reduziert nach Angaben einer Studie aus Finnland die Zellmigration und -invasion des Pankreaskarzinoms. Bemerkenswert hierbei ist, dass dieser Effekt sowohl bei verminderter Expression, als auch bei verstärkter Expression auftritt. Beide Expressionsmuster konnten in Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden [127]. Dies unterstreicht die Komplexität der MicroRNA-Wirkung und legt die Vermutung nahe, dass durchaus auch eine individuelle Komponente der MicroRNA-Deregulation in Tumoren denkbar ist. Der Umfang der MicroRNA-Wirkung in Pankreaskarzinomen wird anhand der MicroRNA miR-548d deutlich: *Heyn et al.* [90] identifizierten diese als einen übergeordneten Regulator in Pankreaskarzinomzellen und wiesen eine Beteiligung an zahlreichen zellulären Signalwegen mit mehr als 14 Zielgenen nach. Fasst man die Signalwege, die von miR-548 maßgeblich beeinflusst werden, zusammen, so ergibt sich ein tumorsuppressiver Effekt, der mit der Höhe der miR-548-Expression korreliert.

Abnorme MicroRNA-Expressionsmuster finden sich zum Teil schon in Vorstufen des Pankreaskarzinoms. Hervorzuheben ist hierbei die MicroRNA miR-155, welche frühzeitig sowohl in pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), als auch in intraduktalen papillären muzinösen Neoplasien (IPMN) aufzufinden ist. Dieses Charakteristikum könnte für einen Einsatz von miR-155 als diagnostischen Biomarker des Pankreaskarzinoms sprechen [83, 199].

Zusammenfassend zeigt sich, dass zahlreiche MicroRNAs in Pankreaskarzinomen dereguliert vorliegen und maßgeblich Einfluss auf Tumorentstehung, Tumorstadium und Tumorentstehung nehmen (*Tabelle 4*). Im Vergleich zu anderen Malignomen, bei denen die Deregulation der MicroRNAs zumeist in Form einer Minderexpression derselben zum Ausdruck kommt, liegt ein Großteil der deregulierten MicroRNAs in Pankreaskarzinomen übermäßig exprimiert vor [127]. Somit übt die Mehrheit der deregulierten MicroRNAs in Pankreaskarzinomen eine Funktion als Onkogen aus, während tumorsuppressive und damit herunterregulierte MicroRNAs im Pankreaskarzinom eine eher untergeordnete Rolle spielen [127, 222].

Tabelle 4: Bedeutende MicroRNAs, die in Pankreaskarzinomen dereguliert vorliegen

MicroRNA:	Expression in PDAC:	Funktionsweise:	Zielgene:	Funktion:	Autoren:
miR-10a	Überexpression	Onkogen	HOXA1, MAP3K7, betaTRC, E2F7, uvm.	Stimulation der Zellinvasion ohne Beeinflussung der Zellproliferation	Ohuchida et al. [177]
miR-10b	Überexpression	Onkogen	HOXD10, PPAR α , uvm.	Stimulation der Zellinvasion	Nakata et al. [168]
miR-21	Überexpression	Onkogen	PDCD4, PTEN, RECK, PPAR α , TIMP3, CDK6, RUNX1 T_1 , VEGF, EGFR, BCL-2 uvm.	Stimulation von Zellproliferation- und -invasion und Vermittlung von Chemoresistenz	Lee et al. [129] Bloomston et al. [26] Dillhoff et al. [48] Hwang et al. [100]

MicroRNA:	Expression in PDAC:	Funktionsweise:	Zielgene:	Funktion:	Autoren:
miR-155	Überexpression	Onkogen	AGTR1, SMAD2, TP53INP1, MAP3K7IP2, SHIP1, Ets-1, POLE3, JARID2	Entartung sowie Stimulation der Zellproliferation	Habbe et al. [83] Lee et al. [129] Bloomston et al. [26] Ryu et al. [199]
miR-196a	Überexpression	Onkogen	HOXB8, HOXC8, HOXA7, MAPK4K19, PDCD4 uvm.	Tumorentwicklung	Szafranska et al. [226] Bloomston et al. [26] Zhang et al. [261]
miR-200a/b	Überexpression	unklar*	ZEB1, SIP1, CTNNB1, BAP1, FOG2, ERBB2IP	Wahrscheinlich Hemmung der Zellinvasion	Li et al. [133] Zhang et al. [261]
miR-200c	Überexpression	unklar*	ZEB1, BAP1, FAP-1, FOG2, ERBB2IP	Hemmung von Zellinvasion und Stimulation der Zellproliferation	Yu et al. [258]
miR-221/222	Überexpression	Onkogen	CDKN1B, KIT, CDKN1C, PPP2R2A	Stimulation der Zellproliferation	Lee et al. [129] Zhang et al. [261]
miR-548d	Überexpression	Tumor-suppressor	ERBB2, PIK3R3, RAF1, MAPK1, ARHGEF6, RAC1, NFκB1, BCL2L1, VEGFA, E2F3, CDK6, CCND1, STAT3, uvm.	Übergeordneter Regulator zahlreicher Signalkaskaden mit überwiegend tumor-suppressiven Effekten	Heyn et al. [90]
miR-31	Über- und Minderexpression	Tumor-suppressor	RHOA, FOXP3, LATS2, ARPC5, PPP2R2A, uvm.	Hemmung von Zellmigration und -invasion	Laurila et al. [127]
miR-96	Minderexpression	Tumor-suppressor	KRAS, ADCY6, FOXO1, EFN1, CAMTA1, CNOT6, PHF19, CDON, uvm.	Einleitung der Apoptose sowie Hemmung von Proliferation und Invasion	Szafranska et al. [226]

* Bisherige Untersuchungen postulieren für das Pankreaskarzinom (PDAC) eine vorwiegend tumorsupprimierende Rolle der miR-200-Familie [129, 258, 261]. Für andere Tumoren sind jedoch auch onkogene Einflüsse seitens der miR-200-Familie beschrieben worden. So soll die miR-200-Familie zur Steigerung des Metastasierungspotentials beitragen [53, 119, 187]. Für das Pankreaskarzinom liegen jedoch diesbezüglich keine endgültigen Ergebnisse vor, so dass die Funktionsweise der MicroRNAs miR-200 a/b/c in der o.g. Tabelle als „unklar“ geführt wird.

MicroRNA:	Expression in PDAC:	Funktionsweise:	Zielgene:	Funktion:	Autoren:
miR-375	Minder-expression	Tumor-suppressor	JAK2, HuD, YWHAZ, USP1	Einleitung der Apoptose	Szafarska et al. [226] Bloomston et al. [26]
let-7	Minder-expression	Tumor-suppressor	RAS, KRAS, Myc, c-Myc, caspase-3, p27, BCL2 uvm.	Hemmung der Zellproliferation	Torrisani et al. [234]

Tabelle modifiziert nach *Steele et al., Clinical potential of microRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma, Pancreas, Volume 40, p. 1167 [222]* sowie *Zhang et al., Roles and mechanisms of microRNAs in pancreatic cancer, World journal of surgery, Volume 35, p. 1727 [260]* unter Nutzung der miRNA-Datenbanken miRBase (<http://www.mirbase.org/>) [2, 78, 79, 120], miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) [3, 96] und DIANA LAB- DNA Intelligent Analysis (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/>) [1, 155] sowie der aufgeführten Quellen

3.4. Diagnostische Wertigkeit von MicroRNAs beim Pankreaskarzinom

Frühe Stadien des Pankreaskarzinoms können bislang mit den gebräuchlichen bildgebenden Verfahren – Sonographie, CT und MRT – zumeist nicht erkannt werden. Erschwerend tritt hinzu, dass häufig die Einteilung bildgebend auffälliger Pankreasbefunde in „benigne“ und „maligne“ Läsionen nicht eindeutig möglich ist. Dementsprechend ist es nicht selten, dass ein eigentlich benigner Pankreasprozess aufgrund unzureichender diagnostischer Möglichkeiten eine onkologische Resektion erfährt [227]. Zur Vermeidung derartiger Fälle und um eine bessere Zuordnung auffälliger Befunde zu ermöglichen, sind somit weitere Untersuchungstechniken gefragt. Eine aktuell praktizierte hiervon ist die Feinnadelbiopsie (FNP): Mit dieser lassen sich benigne Läsionen des Pankreas, wie sie beispielsweise bei der chronischen Pankreatitis vorkommen, von Malignomen, wie z.B. dem duktalem Adenokarzinom, abgrenzen. Allerdings sind diesem Verfahren Grenzen gesetzt, die gegen einen routinemäßigen Einsatz sprechen. Nachteilig wirkt sich zum einen der invasive Charakter und zum anderen auch die hohe Rate an falsch negativen Ergebnissen aus, die durch Fehler bei der Punktion der Läsion resultieren [161]. Diese diagnostische Lücke ließe sich in Zukunft eventuell durch ein MicroRNA-Screening schließen.

Die Anwendung einer MicroRNA-basierten Diagnostik kann prinzipiell auf mehrere Arten erfolgen: Einerseits wäre es möglich, mittels MicroRNA-Analyse Sensitivität und Spezifität der Feinnadelpunktion zu erhöhen. Andererseits ist auch ein Serum-Screening von MicroRNAs zum Nachweis eines Pankreaskarzinoms denkbar. Ein dritter Ansatz ist die Untersuchung von MicroRNAs aus pankreatischen Verdauungssäften. *Szafarska et al.* [227] legten dar, dass über die MicroRNAs miR-196a und miR-217 eine Anhebung der diagnostischen Zuverlässigkeit von Feinnadelbiopsien in Bezug auf die Diskriminierung „Pankreas-Ca vs. Chronische Pankreatitis vs. gesundes Pankreas“ erreicht werden kann. Mit dem Nachweis von 4 MicroRNAs – miR-21, miR-210, miR-155 und miR-196a –, die gegenüber gesunden Vergleichsproben bei Pankreaskarzinomen im Serum signifikant erhöht vorliegen, stellten *Wang et al.* [245] dem eine weniger invasive Methode zu Diagnostik des Pankreaskarzinoms gegenüber. Die Möglichkeit, MicroRNAs als serologische Tumormarker des Pankreaskarzinoms einzusetzen, unterstrichen zuletzt auch *Liu et al.* [144]. Sie identifizierten hierbei 7 MicroRNAs – miR20a, miR-21, miR-24, miR-25, miR-99a, miR-185 und miR-191 –, die bei Pankreaskarzinompatienten im Serum verstärkt nachweisbar sind und damit potentiell als Biomarker des Pankreaskarzinoms verwendet werden können. Zusätzlich postulierten sie eine Überlegenheit dieser Screeningmethode (diagnostische Genauigkeit 83,6%) gegenüber den etablierten Tumormarkern CA 19-9 (diagnostische Genauigkeit 56,4%) und CEA (diagnostische Genauigkeit 36,4%). Einen Nutzen der Untersuchung pankreatischer Verdauungssäfte, die im Rahmen einer ERCP oder eine EUS gewonnen werden können, stellte *Habbe et al.* [83] in Aussicht. Durch ein Screening derartiger Proben auf die MicroRNA miR-155 sei es möglich, Vorstufen (PanIN) und frühe Stadien des Pankreaskarzinoms zu erkennen (*Tabelle 5*).

Tabelle 5: Potentielle MicroRNAs für den präoperativen diagnostischen Einsatz

MicroRNA:	Probenart:	Diagnostische Aussage:	Autoren:
miR-196a, miR-217	Feinnadelbiopsate	Differenzierung zwischen PDAC, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas bei FNP-Proben möglich	Szafranska et al. [227]
let-7c, let-7f, miR-200c, miR-486-5p, miR-451	Feinnadelbiopsate	Differenzierung zwischen PDAC und benignen Pankreasläsionen	Ali et al. [8]
miR-21, miR-196a, miR-221	Feinnadelbiopsate	Differenzierung zwischen PDAC und benignen Pankreasläsionen	Panarelli [181]
miR-21, miR-210, miR-155, miR-196a	Blutplasma	Differenzierung zwischen PDAC und gesundem Pankreas möglich	Wang et al. [245]
miR-20a, miR-21, miR-24, miR-25, miR-99a, miR-185, miR-191	Serum	Differenzierung zwischen PDAC, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas im Serum möglich	Liu et al. [144]

3.5. Therapeutische Bedeutung von MicroRNAs beim Pankreaskarzinom

Die Funktion von MicroRNAs als Onkogene oder Tumorsuppressoren impliziert die Möglichkeit einer therapeutischen Einflussnahme. Potentielle Angriffspunkte stellen MicroRNAs mit dereguliertem Expressionsprofil im duktalem Adenokarzinom des Pankreas dar. Hierbei lassen sich generell zwei Interventionsmöglichkeiten unterscheiden: Die Inaktivierung überexprimierter MicroRNA-Onkogene und die Restauration verloren gegangener MicroRNA-Tumorsuppressoren [260]. Auf Seiten der Onkogene rücken insbesondere die MicroRNAs miR-21, miR-155 und miR-196a in den Fokus, da für diese eine deutliche tumorfördernde Wirkung gelten gemacht wird [26, 199, 226]. Eine Inaktivierung dieser onkogenen MicroRNAs ist durch synthetische Oligonukleotide, die mit einem komplementären Aufbau zur Ziel-MicroRNA designt werden, möglich (= *Antisense oligonucleotides*; *ASO*). Diese sogenannten „anti-miRs“ sind in der Lage, irreversibel an die jeweilige MicroRNA zu binden und sie damit ihrer Funktion zu berauben [122]. Konjugiert mit beispielsweise Ribose, Phosphat- und Cholesterolgruppen ist es den „anti-miRs“ hierbei möglich, eigenständig in die Zellen

vorzudringen und dort ihre jeweilige Wirkung zu entfalten. Oligonukleotidkomplexe mit einer derartigen Fähigkeit werden als „AntagomiRs“ bezeichnet [32].

Park et al. [183] gelang es, den Mechanismus einer „anti-miR“-vermittelten MicroRNA-Inhibition auf die MicroRNAs miR-21 und miR-221 anzuwenden. Durch Transfektion von anti-miR-21- und anti-miR-22-Inhibitoren in PDAC-Zelllinien konnte das weitere Tumorwachstum gehemmt und die Zellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Gemcitabin sensibilisiert werden. Tumorsuppressive MicroRNAs, die häufig im Pankreaskarzinom minder exprimiert vorliegen, stellen eine weitere Möglichkeit zur Intervention dar. Ziel hierbei ist es, durch Einschleusung tumorsuppressiver MicroRNAs normale Expressionslevel im Pankreaskarzinom zu schaffen und hierüber eine tumorreduktive Wirkung zu erzielen. Kandidaten für ein solches Vorgehen sind insbesondere die MicroRNAs let-7, miR-34 und die miR-200-Familie [222]. Für let-7 [234], miR-200c [258] und miR-31 [127] wurde ein derartiger tumorreduktiver Effekt nach Transfektion in PDAC-Zelllinien bereits nachgewiesen (*Tabelle 6*). Der Umstand, dass eine MicroRNA hierbei mehrere mRNAs beeinflusst und somit die Synthese zahlreicher onkogener oder tumorsuppressiver Proteine beeinflussen kann, birgt ein hohes therapeutisches Potential. Der Einführung einer solchen MicroRNA-basierten Tumorthherapie stehen allerdings zwei grundsätzliche Probleme gegenüber: Zum einen die Instabilität der MicroRNAs im Körperkreislauf nach Injektion [116], wodurch das Einbringen großer MicroRNA-Mengen erforderlich ist, und zum anderen das Unvermögen, MicroRNAs gezielt in Tumorzellen einzubringen ohne das eine Manipulation gesunder Zellen stattfindet [24]. Durch die Wahl geeigneter Transportmechanismen, wie virale Vektoren, Nanopartikel oder Lipid- und Polymer-Komplexen, stehen Lösungen für diese Probleme jedoch in Aussicht [257].

Einen großen Stellenwert könnten MicroRNAs zusätzlich auch in der Therapieplanung einnehmen. Aktuell ist es nicht möglich, im Vornherein das chemotherapeutische Ansprechen bei Patienten mit PDAC objektiv abzuschätzen. Dies könnte sich durch MicroRNA-Analysen jedoch ändern. *Hwang et al.* [100] identifizierten die MicroRNA

miR-21 als einen Biomarker für Chemoresistenzen in Pankreaskarzinomen. In ihren Untersuchungen stellten sie heraus, dass Patienten mit niedrigem miR-21-Expressionslevel von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren, während dies bei einem hohen miR-21-Niveau nicht oder nur eingeschränkt der Fall ist. Ausgehend von diesen Ergebnissen ist es denkbar, zukünftig dem Patienten anhand eines MicroRNA-Screenings eine individuelle Therapie zukommen zu lassen, von dem dieser bestmöglich und unter Einbeziehung aller Risiken und Chancen profitiert.

Tabelle 6: MicroRNAs mit nachgewiesenem tumorreduktiven Effekt bei Intervention

MicroRNA:	Funktion:	Art der Beeinflussung:	Ergebnis:	Autoren:
let-7	Tumorsuppressor	Restauration	Hemmung der Zellproliferation nach let-7-Transfektion in vitro, jedoch nicht in vivo	Torrisani et al. [234]
miR-200c	Tumorsuppressor	Restauration	Hemmung der Zellinvasion nach miR-200c-Transfektion	Yu et al. [258]
miR-200 und let-7	Tumorsuppressor	Restauration (durch natürliche Agenzien)	Umkehr der epithelial-mesenchymalen Transition	Li et al. [137]
miR-31	Tumorsuppressor	Restauration und Antagonisierung mit anti-miR-31-Inhibitoren	Hemmung von Zellwachstum, -migration und -invasion	Laurila et al. [127]
miR-21	Onkogen	Antagonisierung mit miR-21-Inhibitor	Hemmung der Zellproliferation, Steigerung der Apoptose	Bhatti et al. [23]
miR-21 und miR-221	Onkogen	Antagonisierung mit anti-miR-21- und -miR-221-Inhibitoren	Einleitung von Zellzyklusarrest und Apoptose, Sensibilisierung gegenüber Gemcitabin	Park et al. [183]

3.6. Prognostische Bedeutung von MicroRNAs in Pankreaskarzinomen

Für zahlreiche MicroRNAs ist ein Zusammenhang zwischen der Expression und dem klinischen Outcome beim Pankreaskarzinom belegt. Während bei den als Onkogen fungierenden MicroRNAs miR-21, miR-155 und miR-196a das Überleben negativ mit der Höhe der Expression assoziiert ist [26, 48, 77, 100, 182], korreliert die Expression der mehrheitlich als tumorsupprimierend eingestuften MicroRNA miR-200c positiv mit der Überlebensrate [258] (*Tabelle 7*).

Tabelle 7: MicroRNAs mit nachgewiesener prognostischer Wertigkeit hinsichtlich des Überlebens beim Pankreaskarzinom

MicroRNA:	Überleben bei Überexpression	Überleben bei Minderexpression	Autoren:
miR-21	↓	↑	Dillhoff et al. [48] Hwang et al. [100] Papaconstantinou [182]
miR-155	↓	↑	Greither et al. [77] Papaconstantinou [182]
miR-196a	↓	↑	Bloomston et al. [26]
miR-200c	↑	↓	Yu et al. [258]
miR-203	↓	↑	Greither et al. [77]
miR-210	↓	↑	Greither et al. [77]
miR-222	↓	↑	Greither et al. [77]
miR-10b	↓	↑	Nakata et al. [168]

3.7. Anwendung von MicroRNAs in Diagnostik und Therapie

Sowohl beim Pankreaskarzinom, als auch bei allen anderen Malignomen, die mit einer veränderten MicroRNA-Expression einhergehen, sind bisher keine auf Micro-RNA basierenden diagnostischen und therapeutischen Verfahren für den klinischen Alltag verfügbar. Nichtsdestoweniger ist die Forschung bemüht, derartige Verfahren zu entwickeln und für den Einsatz bei Patienten mit PDAC serienreif zu machen. Für Hepatitis C wurde eine MicroRNA-basierte Therapie mit anti-miR-122 bereits erfolgreich getestet [116]. Ein solcher Erfolg mit MicroRNA-basierter Diagnostik und Therapie steht beim Pankreaskarzinom zu diesem Zeitpunkt jedoch noch aus.

4 Material und Methoden

4.1 Studiendesign

Die hier vorliegende Untersuchung setzt sich mit folgenden Fragestellungen auseinander:

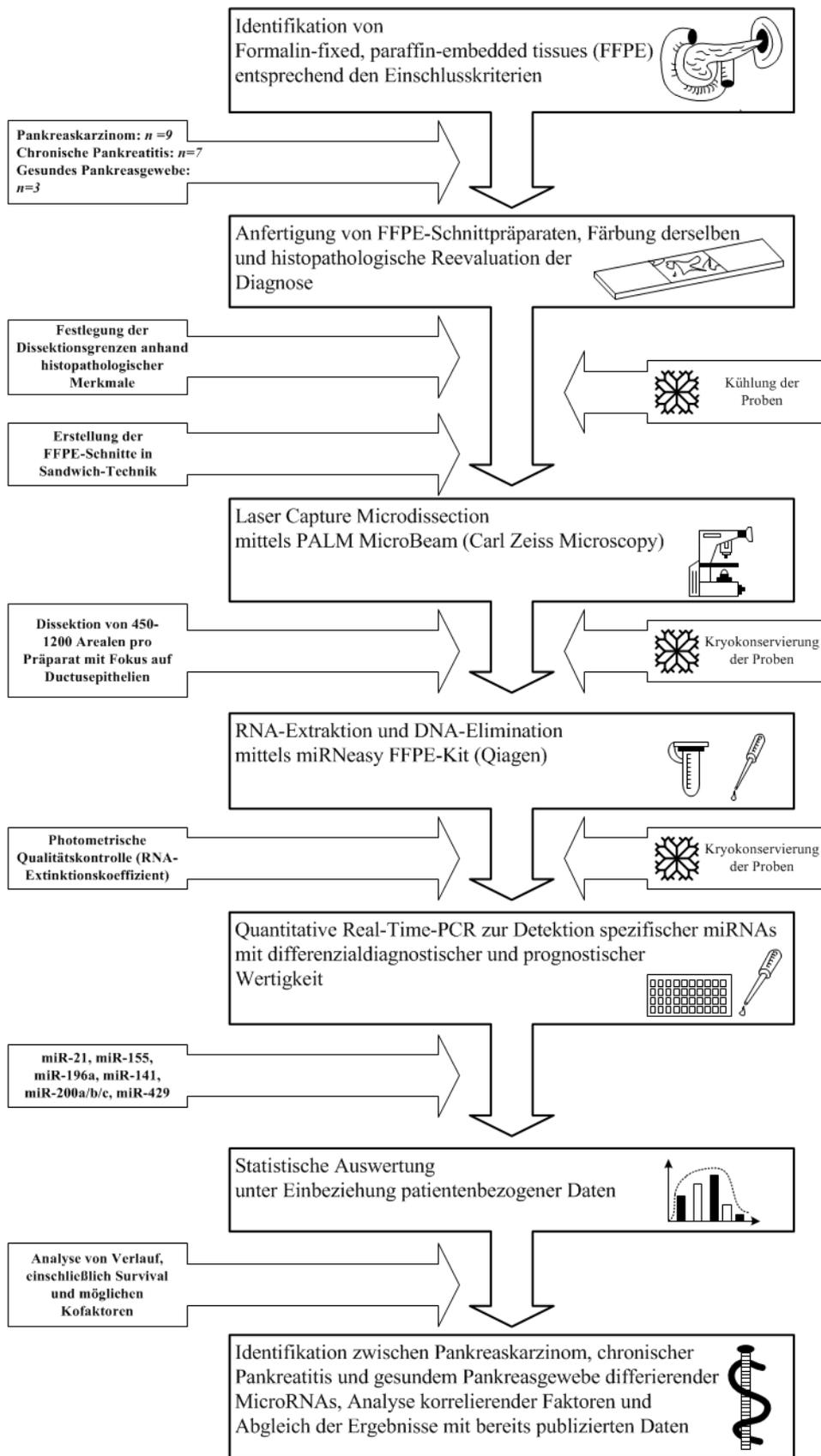
1. Stellt die Laser-Mikrodissektion mit nachfolgender RNA-Extraktion und MicroRNA-Validierung ein geeignetes Verfahren zur Detektion von MicroRNAs in pankreatischen Duktusepithelien dar?
2. Ist anhand der in Duktusepithelien detektierten MicroRNAs eine Differenzierung der jeweiligen Gewebetypen (Pankreaskarzinom, chronische Pankreatitis, gesundes Pankreasgewebe) möglich?
3. Wie ist der klinische Stellenwert der Expressionsergebnisse und der eingesetzten Technik unter Einbeziehung klinischer, patientenbezogener Daten einzuschätzen?

Zur Klärung dieser Fragen wurde ein Studienprotokoll konzipiert, das sich in folgende Arbeitsschritte gliedert (*Abbildung 8*):

- a.) Auswahl geeigneter Formalin-fixierter, in Paraffin eingebetteter Pankreasgewebeprobe gemäß den Einschlusskriterien.
- b.) Anfertigung von für die Laser-Mikrodissektion geeigneten Schnittpräparaten und Identifikation der zu dissezierenden Bereiche anhand histopathologischer Merkmale.
- c.) Durchführung der Laser-Mikrodissektion von duktalem Epithelien der verschiedenen Pankreasgewebeformen.
- d.) Extraktion von RNA und Evaluierung der Extraktionsergebnisse.
- e.) MicroRNA-Validierung mittels quantitativer Real-Time-PCR.
- f.) Statistische Auswertung der Ergebnisse und Diskussion derselben unter Einbeziehung patientenbezogener Daten.

Im Folgenden werden die hierbei eingesetzten Methoden und Materialien nähergehend erläutert.

Abbildung 8: Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte der vorliegenden Untersuchung



4.2 Auswahl der Formalin-fixierten Paraffingewebe (FFPE)

Es wurden vorab 3 Untersuchungsgruppen definiert: Die Gruppe der duktaalen Adenokarzinome des Pankreas (PDAC), die Gruppe der chronischen Pankreatitiden (CP) und die des gesunden Pankreas (GK).

4.2.1 Pankreaskarzinom-Präparate

Für die PDAC-Gruppe wurden als Einschlusskriterien ein zum Diagnosezeitpunkt fortgeschrittenes, nicht metastasiertes, duktales Adenokarzinom des Pankreas im Stadium UICC II (IIA: T3, N0, M0; IIB: T1-3, N1, M0) sowie ein histologischer Differenzierungsgrad G2 (mäßig differenziert) oder G3 (schlecht differenziert) festgelegt. Der Ausschluss des Differenzierungsgrades G1 erfolgte mit der Überlegung, eine größtmöglich sichere mikroskopische Abgrenzung der Tumorzellen von gesunden Duktusepithelien nur anhand deutlich entdifferenzierter Karzinome mit einem Grading von G2 oder G3 gewährleisten zu können. Neben dem Nicht-Erfüllen der Einschlusskriterien führte auch der Mangel an Karzinomanteilen bei gleichzeitigem Überwiegen desmoplastischer Anteile, das Vorliegen multipler, zahlenmäßig relevanter PanINs, eine Kontamination des Gewebes mit Erythrozyten bei Einblutung sowie eine nur unsichere Diskriminierung karzinomatöser Anteile vom restlichen Gewebe zum Ausschluss aus dieser Studie. 17 FFPE-Präparate von Patienten mit histologisch gesichertem duktalem Adenokarzinom des Pankreas konnten unter Berücksichtigung von Ein- und Ausschlusskriterien im Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Münster identifiziert und in die Studie aufgenommen werden. 8 Präparate mussten jedoch im weiteren Verlauf der Untersuchung von dieser Studie aufgrund methodischer Schwächen, die der Laser-Mikrodissektion (LCM) sowie der RNA-Extraktion geschuldet waren, wieder exkludiert werden. Nach Modifikation des Dissektions- und RNA-Extraktionsprotokolls fand ein weiterer Ausschluss jedoch nicht statt, so dass 9 Pankreaskarzinom-Präparate in der Studie verblieben ($n = 9$).

Die 9 Pankreaskarzinom-Präparate als Gegenstand dieser Untersuchung entstammten reseziertem Pankreasgewebe, welches im Rahmen von Pankreasoperationen mit kurativer Zielsetzung gewonnen wurde. In der Mehrzahl der Fälle handelte es sich um

Traverso-Longmire-Resektate (partielle Pankreatoduodenektomie-Präparate ohne Pylorus; $n = 6$), gefolgt von einem Whipple-Resektat (partielle Pankreatoduodenektomie-Präparate mit Pylorus; $n = 1$), einem totalen Pankreatektomie-Resektat ($n = 1$) sowie einem Pankreaslinksresektions-Präparat ($n = 1$). 8 Präparate konnten bei Laparotomien in der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Münster gewonnen werden, während ein Präparat aus einer externen Klinik in Münster in die Untersuchungsgruppe aufgenommen wurde. Alle resezierten Pankreasgewebe wurden nachfolgend makro- und mikroskopisch von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Tilmann Spieker am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Münster begutachtet. Im Zuge dessen erfolgte bei jedem dieser Präparate eine mehrfache Probenentnahme zum Zwecke der histopathologischen Diagnosesicherung. Die dabei gewonnenen Proben wurden – um eine dauerhafte Konservierung zu erzielen – einer Formalin-Fixierung unterzogen und in Paraffin eingebettet (*Abbildung 9*).

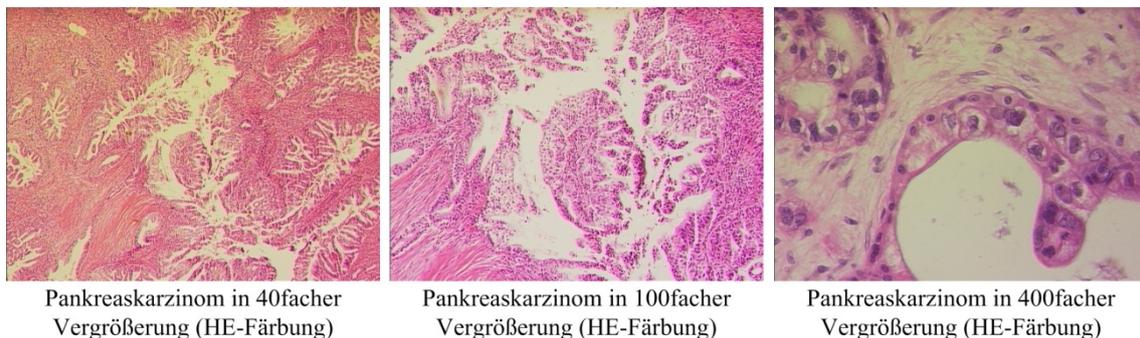


Abbildung 9: Histologisches Erscheinungsbild des Pankreaskarzinoms

Duktales Adenokarzinom des Pankreas in verschiedenen Vergrößerungen: Deutlich sind die typischen histologischen Kennzeichen des Pankreaskarzinoms – u.a. Desmoplasie, infiltratives Wachstum, Verschiebung der Kern-Plasma-Relation, Nucleolenprominenz, Kernpolymorphie, Mucinbildung und Zellpolymorphie – ersichtlich.

4.2.2 Präparate der chronischen Pankreatitis

Als Einschlusskriterium für die Gruppe der chronischen Pankreatitiden wurde der eindeutige histopathologische Nachweis einer chronischen Pankreatitis bei gleichzeitigem Ausschluss maligner Veränderungen des Pankreas definiert. Neben den hauptsächlich morphologischen Charakteristika der chronischen Pankreatitis, wie Fibrosierung, azinäre Atrophie und Lymphozytenaggregationen, wurden solche Präparate ausgewählt, die zusätzlich pankreatitische Veränderungen der Pankreasgänge zeigten. Zu den Auswirkungen der chronischen Pankreatitis auf die Pankreasgänge zählen die Dilatation des Ganglumens, die Ulzeration des Epithels und die angrenzende leukozytäre Infiltration. Mit der Auswahl derartiger Präparate sollte sichergestellt werden, dass auch die Mehrzahl der duktaalen Epithelien von der chronischen Pankreatitis betroffen ist, dementsprechende Veränderungen zeigt und so sich als Untersuchungsgruppe von der Gruppe der gesunden duktaalen Pankreasepithelien abgrenzt. 9 Präparate, die die Einschlusskriterien erfüllten, konnten im Archiv des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Münster identifiziert werden. Hiervon mussten 2 Präparate von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen werden, da sie neben den histologischen Kennzeichen der chronischen Pankreatitis weitere Auffälligkeiten (Infiltration von eosinophilen Granulozyten u.a.) zeigten. In die Studie aufgenommen wurden letztendlich Präparate von 7 Patienten mit chronischer Pankreatitis ($n = 7$).

Auch die FFPE-Präparate der chronischen Pankreatitiden sind Resektaten des Pankreas entnommen (*Abbildung 10*). Analog zu der Gruppe der Pankreaskarzinome handelte es sich hier größtenteils um Traverso-Longmire-Resektate (partiell Pankreatoduodenektomie-Präparat ohne Pylorus; $n = 4$), gefolgt von einem Whipple-Resektat (partiell Pankreatoduodenektomie-Präparat mit Pylorus; $n = 1$), einem Pseudozystenresektat mit Pankreasgewebe ($n = 1$) sowie einem Resektat bei Partington-Rochelle-Operation ($n = 1$). 4 der 7 Pankreatitis-Resektate wurden im Rahmen von Operationen gewonnen, deren Ausführung unter der Verdachtsdiagnose eines Pankreaskarzinoms erfolgte. Histologisch konnte dieses jedoch nachfolgend ausgeschlossen und die Diagnose „chronische Pankreatitis“ gesichert werden.



Abbildung 10: Histologie der chronischen Pankreatitis

FFPE-Präparat der chronischen Pankreatitis in verschiedenen Vergrößerungen. Es imponieren die histologischen Kennzeichen der chronischen Pankreatitis: Atrophie der Acini, Fibrose, Hämorrhagien, Hyperplasie der duktaalen Epithelien.

4.2.3 *Präparate des gesunden Pankreas*

Die dritte Untersuchungsgruppe umfasste Präparate mit nachweislich gesundem Pankreas. Im Zeitraum 2000 bis 2010 konnten 3 Patienten identifiziert werden, von denen gesundes Pankreasgewebe in Form von FFPE-Präparaten im Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Münster vorlagen. Alle 3 Präparate erfüllten hierbei die Einschlusskriterien eines histopathologisch unauffälligen Pankreas in Kombination mit der Malignomfreiheit der zugrundeliegenden Patienten zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme.

2 der 3 FFPE-Präparate des gesunden Pankreas entstammten hierbei Splenektomie-Operationen, bei denen auch ein Teil des Pankreasschwanzes mit entfernt wurde. Die Indikationen für die durchgeführten Splenektomien waren hierbei unterschiedlicher Art: Während in einem Fall die Splenektomie aufgrund einer symptomatischen solitären Milzzyste durchgeführt wurde, erfolgte in dem anderen Fall die Splenektomie aufgrund einer unklaren zystischen Raumforderung der Milz, die sich postoperativ im Rahmen der histopathologisch Begutachtung als benigne erwies. Das dritte FFPE-Präparat resultierte aus einer akzidentellen Verletzung des Pankreas im Rahmen einer Adrenalektomie. Für alle Präparate wurde von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Tillmann

Spieker in seiner Eigenschaft als Facharzt der Pathologie ein, sowohl makro-, als auch mikroskopisch, unauffälliges Pankreasparenchym ohne Hinweis auf entzündliche oder maligne Veränderungen dokumentiert (*Abbildung 11*).



Abbildung 11: Histologie des gesunden Pankreas

FFPE-Präparat des gesunden Pankreas in verschiedenen Vergrößerungen. Das gesunde Pankreas wird histologisch von Acini dominiert, während – anders als beim Pankreaskarzinom – duktale Strukturen nur vereinzelt vorkommen. Die duktales Epithelien stellen sich hierbei unauffällig dar.

4.3 Anfertigung und Färbung der FFPE-Schnittpräparate

4.3.1 Erstellung der Schnittpräparate gemäß der „Sandwich“-Schnitttechnik

Reagenzien, Lösungen und Hilfsmittel für die Erstellung der Schnittpräparate:

- Rotationsmikrotom Microm HM 310 (Microm International GmbH, Walldorf / Deutschland)
- beheizbares Wasserbad
- destilliertes Wasser (Aqua dest.)
- 70% Ethanol
- Objektträger 76 x 21 x 1 mm mit Mattrand
- MembraneSlides 1.0 PEN (D) (Carl Zeiss Microscopy, Jena / Deutschland)
- Inkubator

Das Schneiden der in Paraffin eingebetteten Pankreasgewebe erfolgte mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms. Nach vorheriger Säuberung des Mikrotoms und des beheizbaren Wasserbades mit einer 70%igen Ethanol-Lösung wurden die Paraffinblöcke in die dafür vorgesehene Halterung des Mikrotoms eingespannt. Das Wasserbad wurde mit destilliertem Wasser befüllt und auf 45°C aufgeheizt. Mithilfe von 20µm-Schnitten erfolgte die Abtrennung des überschüssigen Paraffins, bis erste gewebehaltige Schnittpräparate gewonnen werden konnten. Diese wurden daraufhin verworfen. Im Anschluss hieran konnte das Präparat gemäß dem hierfür entwickelten „Sandwich“-Schnittprotokoll geschnitten werden (*Abbildung 12*). Das Protokoll sah die Erstellung eines 3µm-Schnittpräparates, gefolgt von 2 x 14µm-Schnittpräparate vor. Die 3µm-Schnittpräparate waren hierbei zur Kontrolle vorgesehen, während die 14µm-Schnittpräparate die eigentlichen Proben für die Laser-Mikrodissektion (LCM) darstellen sollten. Ausgangspunkt für dieses Schneideprotokoll war der Umstand, dass die 14µm-Schnittpräparate aufgrund ihres großen Querschnittes zwar ausreichend Material bereithielten, jedoch nach Färbung infolge von Zellüberlagerungen ungenauer die pathologischen Areale aufzeigten. Durch die Nutzung von 3µm-Schnittpräparaten als Kontrolle, mit denen eine zuverlässige Differenzierung zwischen tumorösem, entzündlichem und gesundem Pankreasgewebe möglich war, konnte diese Ungenauigkeit behoben werden. Da in einigen Mikrometern Tiefe gewöhnlich eine morphologische Veränderung des Ductus und des umliegenden Gewebes beobachtet werden konnte, wurden Kontrollen alle 28µm (= 2 x 14µm-Schnitte) herangezogen, um Veränderungen des Gewebes mit daraus resultierenden Veränderungen des Dissektionsbereiches lichtmikroskopisch darstellen zu können. Die Abfolge von einem 3µm-Schnittpräparat und zwei 14µm-Schnittpräparaten wurde für jedes Präparat 4-mal wiederholt, so dass sich am Ende 4 x 3µm- und 8 x 14µm-Schnittpräparate ergaben. Für jeden Paraffinblock wurde hierbei eine neue Mikrotom-Einmalklinge genutzt. Nach manueller Schnittführung wurden die Präparate in das mit destilliertem Wasser befüllte Wasserbad befördert, wo sie sich glatt ausbreiten konnten.

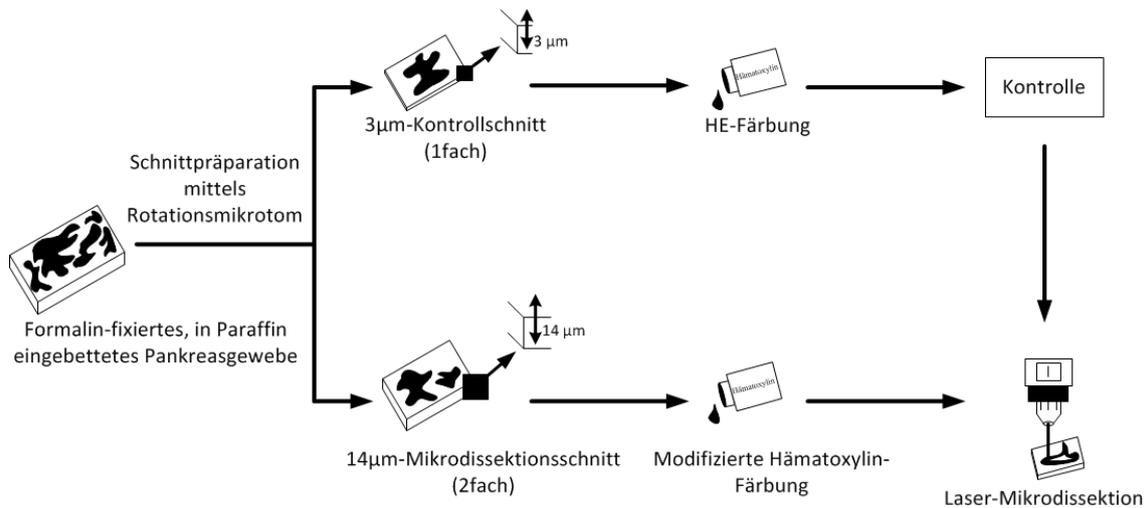


Abbildung 12: Aufbereitung der FFPE-Pankreasgewebe

Ausgehend von in Paraffinblöcken eingeschlossenem Pankreasgewebe erfolgte die Erstellung der Schnittpräparate mithilfe eines Rotationsmikrotoms. Auf diese Weise wurden 3µm-Schnitte angefertigt, welche nachfolgend mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden sowie 14µm-Schnitte, die anschließend einer modifizierten Hämatoxylin-Färbung unterzogen wurden. Die 3µm-Schnittpräparate fanden in der histopathologischen Reevaluation Verwendung und dienten der genauen Auswahl der Dissektionsareale. Die eigentliche Laser-Mikrodissektion wurde hingegen an den 14µm-Schnittpräparaten durchgeführt. Bei jedem Präparat folgten auf einem 3µm-Kontrollschnitt zwei 14µm-Mikrodissektionsschnitte; diese Abfolge wurde für jedes Präparat 4x wiederholt.

Nach Glättung der Schnittpräparate im Wasserbad, konnten diese durch fettfreie, unter sie geschobene Objektträger aufgefangen werden. Während für die 3µm-Schnitte herkömmliche Objektträger genutzt wurden, wurden die 14µm-Schnitte auf PALM MembraneSlides 1.0 aufgetragen. Hierbei handelt es sich um spezielle, von der Firma Carl Zeiss Microscopy (Jena, Deutschland) für die Laser-Capture-Microdissection entwickelte, Objektträger, die mit einer Polyethylenaphthalat (PEN) - Membran bespannt sind, um die Gewebeintegrität während und nach Durchführung der Laser-Mikrodissektion zu erhalten. Die auf den Objektträgern befindlichen Schnittpräparate wurden in einem abschließenden Schritt über Nacht bei einer Temperatur von 37°C im Inkubator getrocknet.

4.3.2 Färbung der Schnittpräparate

Die Färbung der Schnittpräparate erfolgte getrennt nach den 3µm- und 14µm-Schnitten. Während die 3µm-Schnittpräparate einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung unterzogen wurden, erfolgte die Färbung der für die Laser-Mikrodissektion vorgesehenen 14µm-Schnittpräparate mittels Hämatoxylin. Die Hämatoxylin-Färbung erwies sich in Bezug auf die Darstellung der Dissektionsareale und auf das Schneideverhalten bei der Laser-Mikrodissektion als beste Färbemethode und wurde hier in einer modifizierten Variante angewandt.

Voraussetzung für die Färbung von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Schnittpräparaten ist die Deparaffinisierung selbiger. Diese wurde in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 5 Min. Xylol, 2 x 5 Min. 99% Ethanol, 2 x 5 Min. 96% Ethanol, 1 x 5 Min. 70% Ethanol und 1 x 5 Min. 50% Ethanol) mit anschließender Rehydrierung in DEPC-behandeltem, destilliertem Wasser durchgeführt. Im Anschluss hieran konnte die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin auf Seiten der 3µm-Schnittpräparate und mit Hämatoxylin auf Seiten der 14µm-Schnittpräparate durchgeführt werden (*Tabelle 8*).

Nach erfolgter Färbung wurden die Präparate bei Raumtemperatur für 24 Stunden getrocknet. Die für die Mikrodissektion vorgesehenen 14µm-Schnittpräparate wurden im Anschluss hieran bei 8°C im Kühlschrank gelagert. Die Kühlung der Präparate erfolgte unter der Überlegung, dass das Pankreasgewebe reich an Ribonukleasen ist und diese ein Temperaturoptimum von 60°C aufweisen [64]. MicroRNAs gelten jedoch als weitgehend stabil gegenüber Ribonukleasen, so dass die Kühlung der Präparate nur unter dem Gesichtspunkt erfolgte, das Risiko einer RNA-Degradation für die Präparate auf ein Minimum zu reduzieren.

Tabelle 8: Deparaffinisierung und Färbung der Schnittpräparate

Deparaffinisierung:	
2 x 5 Minuten Xylol 2 x 5 Minuten 99% Ethanol 2 x 5 Minuten 96% Ethanol 1 x 5 Minuten 70% Ethanol 1 x 5 Minuten 50% Ethanol 1 x 5 Minuten DEPC Aqua dest.	
HE-Färbung der Kontrollpräparate:	LCM-Färbung der Dissektionspräparate:
Deparaffinisierung wie oben beschrieben. 1 x 4 Minuten Hämatoxylin (DEPC, unfiltriert) 1 x 15 Minuten Bläuen in DEPC Aqua dest. 1 x 4 Minuten Eosin 1 x 1 Minute 50% Ethanol 1 x 1 Minute 70% Ethanol 1 x 1 Minute 96% Ethanol 1 x 1 Minute 99% Ethanol 1 x 1 Minute Xylol Trocknung	Deparaffinisierung wie oben beschrieben. 1 x 4 Minuten Hämatoxylin (DEPC, unfiltriert) 1 x 15 Minuten Bläuen in DEPC Aqua dest. 24 h Trocknung bei Raumtemperatur Im Anschluss: Lagerung bei 8°C im Kühlschrank

4.4 Histopathologische Reevaluation der Schnittpräparate

4.4.1 Histopathologische Diagnosesicherung

In Zusammenarbeit mit dem Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Münster wurden die in die Studie eingeschlossenen Präparate ausgehend von den zuvor angefertigten und HE-gefärbten 3µm-Kontrollschnitten erneut einer histopathologischen Begutachtung unterzogen. Hierbei wurden die für jedes Präparat in 4 Ebenen vorliegenden 3µm-Kontrollschnitte von einem Facharzt für Pathologie beurteilt. Auf diese Weise konnte die Diagnose aller 9 Pankreaskarzinom-Präparate, der 7 chronischen Pankreatitiden sowie der 3 gesunden Kontrollen bestätigt werden.

4.4.2 Festlegung der Dissektionsareale

Die 3µm-Kontrollschnitte wurden in einem nächsten Schritt auf für die Mikrodissektion geeignete Areale hin untersucht. Ausgewählt wurden hierbei ausschließlich Areale, die

eindeutig die zugrundeliegende Pathologie widerspiegeln. Im Falle der Pankreaskarzinomgruppe wurden somit ausschließlich Areale miteinbezogen, die sich ausnahmslos aus entdifferenzierten Ductusepithelien zusammensetzten. Von Erosionen und Ulzerationen durchsetzte sowie von lymphozytären Infiltraten umgebene, teilweise hyperplastisch veränderte Ductusepithelien bildeten hingegen den Kern der Pankreatitis-Gruppe. Für die gesunden Pankreaskontrollen wurden Areale erwählt, die keine von der Norm abweichenden, morphologischen Veränderungen zeigten. Nach Auswahl der Areale erfolgte die Markierung selbiger auf dem Objektträger. Bereiche, die nur schlecht von Umgebungsstrukturen, wie z.B. Duodenal- und Gefäßanschnitten sowie Stroma, abgegrenzt werden konnten oder von zweifelhafter Dignität waren, wurden nicht in die Auswahl aufgenommen. Nach Festlegung der Dissektionsareale auf den 3µm-Kontrollschnitten erfolgte eine Hinzuziehung der korrespondierenden 14µm-Schnittpräparate. Diese wurden nun dahingehend überprüft, ob die in den 3µm-Präparaten ausgewählten Dissektionsareale ebenfalls im 14µm-Schnitt auffindig gemacht werden können. Erst nachdem dies bestätigt werden konnte, wurde das markierte Areal für die Laser-Mikrodissektion freigegeben.

Um aufzuzeigen, dass ausschließlich duktale Epithelien Ziel der Mikrodissektion sind und dass diese sich hinsichtlich ihrer MicroRNA-Expression von azinären Epithelien unterscheiden, wurden in 2 Präparaten der chronischen Pankreatitis sowie in einem Pankreaskarzinompräparat Pankreasacini markiert, um diese – isoliert von den dukталen Epithelien – ebenfalls zu dissektieren und einer nachfolgenden Analyse zu unterziehen. Dieser Schritt sollte zur Qualitätssicherung dienen und die Hypothese, dass duktale und azinäre Epithelien ein unterschiedliches MicroRNA-Expressionsmuster aufweisen, stützen. Mit den Untersuchungsgruppen der Pankreaskarzinome ($n = 9$), chronische Pankreatitiden ($n = 7$) und der gesunden dukталen Epithelien ($n = 3$) ergaben sich unter Hinzuziehung azinärer Kontrollen ($n = 3$) insgesamt 22 Proben von 19 Präparaten.

4.5 Die Laser-Mikrodissektion

4.5.1 Prinzip der Laser-Mikrodissektion

Die Laser-Mikrodissektion, welche auch als Laser Capture Microdissection (LCM) bezeichnet wird, stellt ein kontaktloses Verfahren zur Dissektion von Zellen und Geweben dar. Von der Arbeitsgruppe um Michael R. Emmert-Buck (National Institutes of Health, USA) entwickelt und 1996 erstmalig vorgestellt, dient die Laser Capture Microdissection dem automatisierten Herauslösen von einzelnen Zellen oder Zellverbänden in heterogenen Geweben [56].

Kern der Laser-Mikrodissektion ist hierbei ein in ein Mikroskop integrierter, niedrigerenergetischer UV-Laser (Leistung < 50 mW), welcher gezielt einzelne Zellen oder Gewebeareale aus Zellkulturen oder Gewebeblöcken heraustrennen kann. Der lasergestützte Schneidevorgang erfolgt hierbei automatisch, d.h. nach Auswahl des zu dissezierenden Areals unter mikroskopischer Kontrolle und anschließender Programmierung des Lasers, fährt dieser die markierten Grenzen des gewünschten Bereiches ab und löst damit das Gewebe heraus. Die für das Schneiden notwendigen Laserimpulse sind hierbei von so kurzer Dauer (Milli- bis Nanosekundenbereich), dass trotz der entstehenden hohen Temperaturen von über 90°C herausgetrennte Zellen nicht beschädigt und in ihrer Zusammensetzung nicht verändert werden. Die Abkühlung der Dissektate erfolgt in weniger als 200ms [56]. Um die Gewebeintegrität zu erhalten und ein sauberes Herauslösen der Zellen aus dem Gewebe zu ermöglichen, finden in den meisten Systemen thermoplastische Membranen, welche über oder unter den Geweben platziert werden, Verwendung. Unter dem Einfluss eines höher energetischen Infrarot- oder UV-Lasers, welcher nach dem eigentlichen Schneidevorgang des niedrigerenergetischen UV-Lasers zur Anwendung kommt, wird hierbei die thermoplastische Membran mit dem Dissektat verschmolzen, um ein Zerfall desselben entgegenzuwirken. In wässrigen Lösungen dissoziiert die thermoplastische Membran rasch in ihre molekularen Bestandteile, so dass eine, aus der Membran resultierende, Beeinflussung nachfolgender molekulargenetischer Untersuchungen ausgeschlossen ist [213]. Die Aufnahme der Dissektate kann je nach Art des verwendeten Systems auf verschiedene Weisen erfolgen: Einige Systeme nutzen die Schwerkraft und lassen die

Dissektate nach dem Schneidevorgang in ein Auffangbehältnis fallen, während andere Systeme adhäsive Membranen verwenden, auf denen die Dissektate gesammelt werden. Eine besondere Methode stellt das sogenannte Laser-Microdissection Pressure-Catapulting (LMPC) dar: Hierbei werden die Dissektate durch Lichtimpulse in ein Sammelgefäß katapultiert, das wiederum von einer adhäsiven Membran ausgekleidet ist und so die Dissektate dauerhaft aufnehmen kann (*Abbildung 13*). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sowohl der Schneidevorgang, als auch die Aufnahme der Dissektate kontaktlos durchgeführt wird und somit Kontaminationen jeglicher Art vermieden werden [242].

Im Vergleich zur herkömmlichen Mikrodissektion, bei der manuell oder mikromanipulativ mithilfe einer Nadel oder eines Skalpells in direktem Kontakt zur Gewebeprobe Zellareale herausgetrennt werden, weist die Laser-Mikrodissektion zahlreiche Vorteile auf: Während die herkömmliche Mikrodissektion Erfahrung und Geschicklichkeit im Umgang mit der Dissektion von Geweben voraussetzt, stellt die Laser-Mikrodissektion mit ihrem automatisiertem, computergesteuertem Schneideprozess eine Untersucher-unabhängige, präzise und reproduzierbare Methode dar. Durch die standardisierten, repetitiven Schneidevorgänge der Laser-Mikrodissektion ist es zudem möglich, mehrere hundert Gewebearale in einer einzigen Sitzung zu sammeln [56, 213, 242]. Eine weitere Stärke der Laser-Mikrodissektion ist die Kontaktfreiheit. Der Verzicht auf den direkten Kontakt zur Gewebeprobe reduziert das Kontaminationsrisiko und umgeht weitgehend die Gefahr einer mechanischen Destruktion. Mögliche Schwachpunkte der Laser-Mikrodissektion sind hingegen die thermischen Begleiterscheinungen des laservermittelten Schneideprozesses sowie die beim Katapultieren der Probe wirkenden Scherkräfte. Prinzipiell ist bei beidem eine Beeinträchtigung der Probenqualität denkbar, die – wenn überhaupt gegeben – von jedoch so geringem Ausmaß ist, dass eine Auswirkung auf nachfolgende genomische und proteomische Untersuchungen nicht zu befürchten ist [242]. Zahlreiche Untersuchungen von *Emmert-Buck et al.* [56] und *Goldsworthy et al.* [72] belegen die Tauglichkeit der Laser-Mikrodissektion für nachfolgende molekularanalytische DNA-, RNA- und Protein-Untersuchungen. In Bezug auf fixierte Gewebeproben kann sowohl

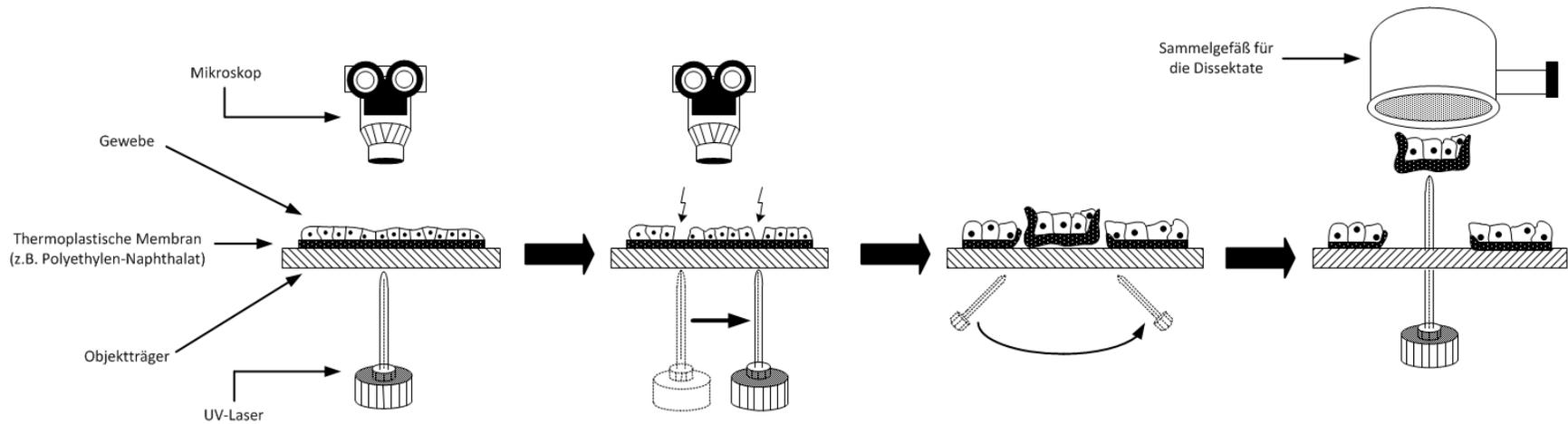
den gefrorenen, als auch den Formalin-fixierten, in Paraffin gebetteten Geweben (FFPE) eine Eignung zur Laser-Mikrodissektion attestiert werden [72].

4.5.2 *PALM® MicroBeam*

In dieser Untersuchung wurde eine PALM® MicroBeam-Arbeitsstation der Firma Carl Zeiss Microscopy genutzt, welche von der Serviceeinheit „Integrierte Funktionelle Genomik“ (IFG) des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IKZF) der Universität Münster zur Verfügung gestellt wurde.

Bei der hier verwendeten PALM® MicroBeam-Arbeitsstation handelt es sich um ein Laser-Microdissection and Pressure Catapulting-System (LMPC), das sich aus einer Laser-Einheit der Firma P.A.L.M. Microlaser Technologies AG (Bernried, Deutschland), welche dem Dissektieren und Katapultieren der Zellareale dient, sowie einem inversen Mikroskop (Axiovert 200) der Firma Carl Zeiss Microscopy (Jena, Deutschland) zusammensetzt. Die Nutzung eines inversen Mikroskops schließt hierbei die Möglichkeit des Mikroskopierens von Präparaten mit größerer Dicke ein. Kern der PALM® MicroBeam-Arbeitsstation ist ein Nitrogen-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm und einer Pulsenergie von 270 – 400 μ J bei einer Impulsdauer von 3 nsec. Die Impulsfrequenz wird vom Hersteller mit 1-30 Hz angegeben. Die Steuerung der PALM® MicroBeam-Arbeitsstation erfolgt mittels der herstellereigenen PALM® RoboSoftware, mit der sowohl die mikroskopische Darstellung, als auch die Auswahl der zu dissezierenden Areale und die Steuerung des Lasers möglich sind. Neben der Auswahl des Gewebeareales können auch die Elemente UV-Energie und UV-Fokus des Lasers manuell adjustiert werden. Sowohl der Schneideprozess, als auch das lichtenergetische Katapultieren können hierbei automatisiert oder manuell assistiert ablaufen. Ein computergesteuerter, motorisierter Objektisch – die sogenannte PALM® RoboStage – ermöglicht ein Mikrometer-genaues Bewegen der auf einen Objektträger gespannten Gewebeprobe. Eine darüber angebrachte Halterung dient dem Einbringen eines Sammelgefäßes zur Aufnahme der katapultierten Dissektate. Die in der PALM® MicroBeam-Arbeitsstation integrierte CCD-Kamera bietet zudem die Möglichkeit mikroskopischer Aufnahmen.

Abbildung 13: Funktionsweise des Laser-Microdissection and Pressure Catapulting (LMPC)-Systems



1.) Vorbereitung der Mikrodissektion

Einspannen der Gewebeprobe zwischen dem Objektiv des Mikroskops und dem gepulsten, niedrigenergetischen UV-Laser. Die Gewebeprobe liegt hierbei einer UV-absorbierenden Polymer-Folie auf, welche sowohl während des Schneidvorgangs, als auch während des Katapultierens die Gewebeintegrität sicherstellt.

2.) Schneidprozess

Durch niederfrequente Laserimpulse (1-30Hz) werden die zu untersuchenden Zellen mit maximaler Präzision herausgeschnitten. Eingesetzt wird hierbei ein niedrigenergetischer UVA-Laser mit einer Wellenlänge von 315 – 380nm und einer Leistung < 50mW. Die einzelnen Impulse sind zur Vermeidung thermischer Gewebeschäden sehr kurz gehalten (≈ 3 ns).

3.) Verschmelzen der thermoplastischen Membran

Im Anschluss an den eigentlichen Schneidvorgang lassen hochenergetische Lichtimpulse seitens des UVA-Lasers oder eines zusätzlich vorhandenen Infrarot-Lasers die thermoplastische Membran mit dem Dissektat verschmelzen. Dadurch wird die Gewebeintegrität erhalten und das Dissektat löst sich vom umliegenden Gewebe.

4.) Druck-Katapultierung

In einem finalen Schritt wird das Dissektat mittels gebündelter Lichtenergie in ein Auffangbehältnis katapultiert. Mit einer adhäsiven Oberfläche versehen, vermag dieses das Dissektat aufzunehmen. Obwohl während des Katapultierens hohe Drücke erreicht werden (bis zu 670 Mpa), wird das Gewebe in Form und Zusammensetzung nicht beeinträchtigt.

4.5.3 Vorbereitung der Laser-Mikrodissektion

Reagenzien, Lösungen und Hilfsmittel für die Erstellung der Schnittpräparate:

- PALM® MicroBeam (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried / Deutschland)
- Detergenz Ambion® RNaseZap® (Life Technologies™, Carlsbad / USA)
- AdhesiveCap 500 opaque (D) (Carl Zeiss Microscopy, Jena / Deutschland)

Vor Beginn der Laser-Mikrodissektion wurde jeweils eine Dekontamination des Objektisches mit der Detergenz RNaseZap® der Firma Ambion® durchgeführt, um eine Kontamination der Schnittpräparate mit Ribonukleasen zu vermeiden. Im Anschluss hieran erfolgte der Start und die Kalibrierung der PALM® MicroBeam-Arbeitsstation. Nach Platzierung des Objektträgers unter Verwendung von Einmalhandschuhen wurde der Deckel des für die Dissektate vorgesehenen Transportgefäßes (AdhesiveCap 500 opaque, Carl Zeiss Microscopy) abgetrennt und in die entsprechende Halterung über den Objektisch kopfüber eingebracht. In dieser Position war eine Aufnahme der Mikrodissektate über ein opakes Haftmittel im Zentrum des Deckels nach erfolgtem Schneidevorgang möglich.

4.5.4 Durchführung der Laser-Mikrodissektion

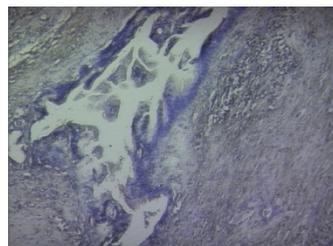
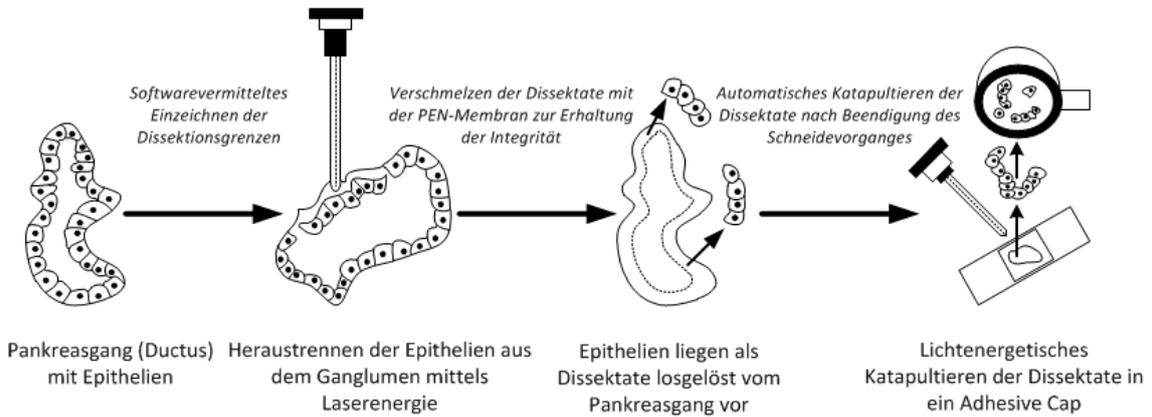
Vor Durchführung der eigentlichen Mikrodissektion erfolgten zunächst die mikroskopische Begutachtung der als Kontrolle eingesetzten 3µm-Schnittpräparate und das Aufsuchen der Dissektionsmarkierungen. Die zur Dissektion vorgesehenen Gewebeareale wurden photographisch mithilfe der Mikroskopkamera abgebildet, um nachfolgend diese mit den für die Dissektion vorgesehenen 14µm-Schnittpräparaten vergleichen zu können. Hierdurch wurde gewährleistet, dass trotz der höheren Schnittdicke und den daraus resultierenden Zellüberlagerungen die gleichen Zellareale bei den 14µm-Schnittpräparaten zur Dissektion freigegeben wurden, wie sie zuvor bei den 3µm-Schnittpräparaten vom Pathologen markiert wurden.

Nach Einspannen der mit den 14µm-Schnittpräparaten versehenen Objektträgern (MembraneSlides 1.0 PEN) und Aufsuchen der zu dissezierenden Areale, erfolgten zunächst lineare Probeschnitte, um UV-Energie und -Fokus des Lasers optimal an das Gewebe anzupassen. Des Weiteren wurde eine mittlere Schnittgeschwindigkeit ausgewählt, um beide Faktoren auch noch während des Schneidevorganges bedarfsweise an die jeweilige Gewebefestigkeit anzupassen. Mithilfe der PALM® RoboSoftware erfolgte die manuelle Einzeichnung der Schnittgrenzen unter Betrachtung des Gewebes in 100 - 400facher Vergrößerung. Besonderes Augenmerk wurde darauf verwendet, nur Tumorzellen bzw. duktale Epithelien zu erfassen und stromale Komponenten, wie auch Drüsenlumina aus der Dissektion herauszuhalten (*Abbildung 14*). Nach Starten des Lasers führte dieser automatisch das Schneiden des Gewebes durch und katapultierte im Anschluss hieran – ebenfalls völlig automatisch – das Dissektat in das Probenbehältnis (AdhesiveCap 500 opaque). Gelegentlich verblieben nach durchgeführter Laser-Dissektion Gewebebrücken, die eine erneute, korrigierende Dissektion notwendig machten. Bei vielen Dissektaten mussten so sowohl der Schneidvorgang, als auch das anschließende Katapultieren unter manueller Steuerung vorgenommen werden.

Um eine ausreichende Menge an Zellmaterial zu erhalten, wurde vorab eine Gesamtfläche von 4 -5 Millionen Quadratmikrometer (entsprechend einem Volumen von 56 - 70 Millionen µm³) Dissektatmaterial als Ziel für jede FFPE-Probe definiert. Dieses konnte in der Mehrzahl der Präparate (19/22) erreicht werden. Zur Gewinnung der oben genannten Gewebefläche waren im Mittel 634 Mikrodissektionen notwendig. Da die Dissektatgröße ausgehend von histopathologischen Merkmalen (Ductusgröße, Umfang der Ductusepithelien, Abgrenzung zum Stroma) stark variierte, waren je nach Präparat 119 (= minimale Anzahl an Dissektaten) bis 1271 (= maximale Anzahl an Dissektaten) Mikrodissektionen notwendig. Jede FFPE-Probe setzte sich im Durchschnitt aus 8 x 14µm-Schnittpräparaten zusammen, so dass von jedem Schnittpräparat etwa 15 - 159 Dissektate gesammelt werden konnten. Diese wurden in einem AdhesiveCap aufgefangen, welches nach Beendigung der Laser-Mikrodissektion einer lichtmikroskopischen Nachkontrolle zum Ausschluss fehlkatapultierter Areale und von Kontaminationen unterzogen wurde. Dissektate, die zu diesem Zeitpunkt aufgrund

von Fehlkatapultationen noch auf dem Schnittpräparat verweilen, wurden manuell laser-gestützt in das Behältnis transportiert.

Abbildung 14: Laser-Mikrodissektion des Pankreasgewebes



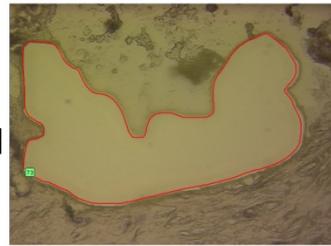
Lichtmikroskopische Identifikation von tumorös veränderten Pankreasgängen



Markierung der Dissektionsgrenzen: Hierbei erfolgt nur eine Erfassung von Tumorzellen, während stromale Komponenten von der Dissektion ausgeschlossen werden.



Nach multiplen Dissektionen sind alle Karzinomzellen aus dem entarteten Pankreasgang herausgetrennt worden.



Zustand nach Dissektion: Die Tumorzellen wurden selektiv aus dem umgebenden Gewebe herausgeschnitten.



Die Dissektate werden vom Laser in ein Sammelgefäß (AdhesiveCap) katapultiert. In diesem ist eine lichtmikroskopische Nachkontrolle möglich.

Fotographisch wurde das Schnittpräparat sowohl vor Beginn der Laser-Mikrodissektion, als auch nach Beendigung derselben festgehalten. Zudem wurden stichprobenartig Aufnahmen einzelner Mikrodissektionen angefertigt, die den Zustand vor und nach der Dissektion dokumentieren. Damit konnten das jeweilige, auf das Präparat bezogene Vorgehen im Sinne einer rückblickenden Qualitätssicherung nachvollzogen werden.

4.5.5 Lagerung der Dissektate

Nach Kollektion der Mikrodissektate im Deckel des AdhesiveCap wurde dieser wieder mit dem dazugehörigen 500µl-Reaktionsgefäß fusioniert und verschlossen. Das die Mikrodissektate beinhaltende Reaktionsgefäß wurde im Anschluss hieran bei einer Temperatur von -20°C im Gefrierschrank gelagert.

4.6 RNA-Extraktion der Mikrodissektate

4.6.1 Durchführung der RNA-Extraktion unter Nutzung des Qiagen miRNeasy FFPE-Kits

Reagenzien, Lösungen und Hilfsmittel für die RNA-Extraktion

- miRNeasy FFPE Kit (Qiagen®, Hilden / Deutschland), darin enthalten:
 - RNeasy MinElute® Spin Columns (2 ml)
 - gDNA Eliminator Mini Spin Columns (2 ml)
 - Collection Tubes (1,5 ml und 2,5 ml)
 - Proteinase K Digestion Buffer (Buffer PKD)
 - Proteinase K
 - Red Blood Cell Lysis Buffer (Buffer RBC)
 - Buffer RPE
 - RNase free Water
- Ethanol 100%
- RNase-freie Pipettenspitzen (Eppendorf®, Hamburg / Deutschland)
- 2ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf®, Hamburg / Deutschland)

- Vortexer IKA® MS-1 (IKA®-Werke, Staufen / Deutschland)
- Tischzentrifuge Eppendorf MiniSpin® (Eppendorf®, Hamburg / Deutschland)
- Eppendorf® Reference & Research-Pipetten (Eppendorf®, Hamburg / Deutschland)

Die RNA-Extraktion erfolgte mithilfe des miRNeasy FFPE Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Das miRNeasy FFPE Kit dient der Aufbereitung von in FFPE-Präparaten enthaltenen Ribonukleinsäuren, einschließlich der MicroRNA, unter gleichzeitigem Ausschluss von DNA. Letzteres wird durch die Nutzung einer speziellen DNA-Eliminationssäule (gDNA-Elimination Column) erreicht. Für die Extraktion der RNA aus den Pankreas-Mikrodissektaten wurde das herstellereigene Protokoll modifiziert (*Tabelle 9*). So wurden die Schritte zur Deparaffinisierung ausgelassen, da die Mikrodissektate bereits in deparaffinierter Form vorlagen.

Ausgangspunkt der RNA-Extraktion bildete die Resuspension der Mikrodissektate. Diese wurden im Deckel der Adhesive Caps (Carl Zeiss, Jena) durch Beträpfeln mit Buffer-PKD-Lösung gelöst und mittels Pipette in ein 2ml-Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zufügen von Proteinase K zur Freisetzung von Nukleinsäuren fand eine Erhitzung der Probe im Reaktionsgefäß für 12 Stunden bei einer Temperatur von 55°C statt. Dieser Schritt gewährleistete optimale Bedingungen für den Abbau von Proteinen durch die Proteinase K. Die Inaktivierung selbiger erfolgte durch ein kurzfristiges Erhitzen der Probe auf 80°C für 15 Minuten nach Ablauf der oben genannten 12 Stunden. Nach Hinzufügen von RBC-Pufferlösung (Buffer RBC), welche die durch die Proteinase K begonnene Zelllyse komplettierte, wurde die Lösung auf das gDNA-Elimination-Column übertragen, um eine Entfernung der DNA zu erzielen. Die so gewonnene RNA-haltige Lösung konnte in einem nächsten Schritt auf eine Elutionssäule (RNeasy MinElute® Spin Column) transferiert werden. Hieran schlossen sich mehrere Waschschrte unter Verwendung von Buffer RPE an. Abschließend erfolgte die Elution des in der Säule angesammelten RNA-Materials mit RNase-freiem Wasser. Als Endprodukt der RNA-Extraktion ergaben sich 18µl einer RNA-haltigen Lösung.

Tabelle 9: Arbeitsschritte der RNA-Extraktion (Qiagen miRNeasy® FFPE-Kit)

Arbeitsschritte:	Ziel:
<ol style="list-style-type: none"> 1) Bereitstellung von 150µl Buffer PKD 2) Benetzen der Mikrodissektate mit 10µl Buffer PKD und anschließendes Transferieren der Dissektate auf ein 2ml-Reaktionsgefäß 3) Wiederholen von Schritt 2) bis zur Resuspension aller Dissektate 4) Auffüllen der Lösung mit Buffer PKD bis zu einem Gesamtvolumen von 150µl 	Resuspension der LCM-Dissektate
<ol style="list-style-type: none"> 5) Hinzufügen von 10µl Proteinase K 6) Zentrifugieren der Probe 7) Erhitzen der Probe bei 55°C für 12 Stunden 8) Inaktivierung der Proteinase K durch kurzzeitiges Erhitzen der Probe auf 80°C für 15 Minuten 9) Hinzufügen von 320µl Buffer RBC 	Proteinabbau und Freisetzung der Nukleinsäuren
<ol style="list-style-type: none"> 10) Übertragen der Lösung auf gDNA-Elimination-Column 11) Hinzufügen von 1120µl Ethanol 100% 12) Übertragen der Lösung auf RNeasy MinElute-Column in 700µl-Schritten 	DNA-Elimination
<ol style="list-style-type: none"> 13) Hinzufügen von 500µl Buffer RPE auf die Membran des MinElute-Columns, anschließendes Zentrifugieren für 15 Sekunden und Verwerfen des Durchflusses 14) Wiederholen von Schritt 13) 15) Wiederholen von Schritt 13) mit jedoch nachfolgender Zentrifugation für 2 Minuten 16) Überführen der Säule auf ein neues 2ml-Collection-Tube 17) Zentrifugieren der Probe für 5 Minuten bei geöffnetem Deckel, um eine Verdunstung der Flüssigkeit zu erzielen 18) Verwerfen des Durchflusses und Überführung der Elutions-Säule auf ein neues Collection-Tube 	Aufreinigung
<ol style="list-style-type: none"> 19) Elution mit 18µl RNase-freiem Wasser 20) 5-maliges Wiederholen der Elution unter Verwendung jeweils neuer Collection-Tubes 	Elution

4.6.2 Photometrische Kontrolle von RNA- Konzentration und -Reinheit

Reagenzien, Lösungen und Hilfsmittel zur Durchführung der photometrischen

Kontrolle:

- Photometrische Messung unter Nutzung des Eppendorf® Biophotometers:
 - Eppendorf® Biophotometer (Eppendorf®, Hamburg / Deutschland)
 - 2ml Küvette (Eppendorf UVette®)
 - destilliertes Wasser (Aqua dest.)
 - Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Lösung
 - Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen

- Photometrische Messung unter Nutzung des Qubit® 2.0 Fluorometers
 - Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies™, Carlsbad / USA)
 - Qubit® RNA Assay Kit (Life Technologies™, Carlsbad / USA),
darin enthalten:
 - Reaktionslösung (Qubit® reagent)
 - Pufferlösung (Qubit® Buffer)
 - 0,5 ml Reaktionsgefäße (Qubit® assay tubes)
 - Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen (Eppendorf®, Hamburg / Deutschland)

Im Anschluss an die RNA-Extraktion erfolgten photometrische Untersuchungen der Lösungen im Hinblick auf RNA-Konzentration und -Reinheit. Grundlage photometrischer Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren ist das Extinktionsmaximum von RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm (Ultraviolettes Licht). In der Lösung enthaltene Proteine, die eine Verunreinigung darstellen, weisen hingegen ein Extinktionsmaximum bei 280 nm auf. Mit dem Extinktionskoeffizienten E_{260}/E_{280} ist damit eine Abschätzung der Reinheit der RNA möglich. Reine RNA weist einen Extinktionskoeffizienten E_{260}/E_{280} von 2,0 auf. Ähnlich verhält es sich mit dem Extinktionskoeffizienten E_{260}/E_{230} . Kohlenhydrate, Phenole und aromatische Verbindungen zeigen ein Absorptionsmaximum bei 230 nm. Durch den Quotienten E_{260}/E_{230} , welcher bei reiner RNA $> 2,0$ sein sollte, lassen sich ebenfalls Aussagen zur RNA-Reinheit treffen. Berücksichtigt werden muss jedoch, dass MicroRNAs im

Vergleich zu anderen RNA-Formen wesentlich resistenter gegenüber Ribonukleasen sind, so dass Verunreinigungen durch Proteine in MicroRNA-Lösungen nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Die photometrischen Messungen wurden zunächst mit einem UV-Vis-Photometer der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) vorgenommen. Hierbei wurde die Extinktion von 3µl Lösung nach Verdünnung mit 50µl destilliertem Wasser mit einer Leerprobe (50µl destilliertes Wasser) verglichen. Es ergaben sich Konzentrationen von 0,7 – 217,9 µg/ml RNA. Der die RNA-Reinheit widerspiegelnde Extinktionskoeffizient E_{260}/E_{280} variierte hierbei von 0,66 bis 1,77. Ähnliche Werte wurden auch für den Extinktionskoeffizienten E_{260}/E_{230} dokumentiert, welcher von 0,73 – 2,12 variierte. Eine stichprobenartige Kontrolle erfolgte durch parallel durchgeführte photometrische Messungen unter Verwendung von Tris(hydroxymethyl)-aminomethan anstelle von RNase-freiem Wasser. Hierbei konnten geringfügig höhere RNA-Konzentrationen und auch diskret höhere Werte für beide Extinktionskoeffizienten nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Menge an Proben, von denen jeweils 3µl Lösung für die photometrische Kontrolle aufgewendet wurde, wurde jedoch auf eine routinemäßige Kontrolle aller Lösungen unter Verwendung von Tris(hydroxymethyl)-aminomethan verzichtet.

Da bei einigen Proben eine Extinktion von unter 0,05 bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde und dies wiederum – gemäß Herstellerangaben zum Eppendorf® Biophotometer – auf eine unsichere Bestimmung der RNA-Konzentration hindeutet, erfolgte der Entschluss zur flouometrischen Kontrollbestimmung unter Nutzung des Qubit® 2.0 Fluorometers. Anders als beim Eppendorf® Biophotometer, welches direkt die Extinktion der Probenlösung zur Konzentrationsbestimmung nutzt, ist beim Qubit® 2.0 Fluorometer eine vorherige Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an die RNA notwendig, um die Konzentration letzterer zu erfassen. Hierdurch wird eine spezifische Messung der RNA gewährleistet und zugleich die Möglichkeit zur Bestimmung geringster Konzentrationen gegeben. Unter Verwendung von 1µl Probenlösung und Anwendung des Qubit® RNA Assay Kits gemäß des herstellereigenen Protokolls

erfolgte nach Herstellung der entsprechenden Reaktionslösungen – unterteilt in Probe und Leerkontrolle – die flourometrische Konzentrationsbestimmung. Hierbei wurden RNA-Konzentrationen bestimmt, die deutlich unter den zuvor vom Eppendorf® Biophotometer gemessenen Werten lagen. Mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer wurden so RNA-Konzentrationen von < 20 ng/ml bis 40,8 µg/ml ermittelt.

Angesichts der höheren Stabilität der MicroRNA im Vergleich zur mRNA und der Tatsache, dass ein quantitativer Nachweis von MicroRNAs mittels PCR schon ab 10 pg RNA möglich ist, wurden die ermittelten Konzentrationen und Reinheitswerte als suffizient für eine nachfolgende PCR-Untersuchung gewertet.

4.6.3 Kryokonservierung der Proben

Nach Dokumentation von RNA-Konzentration und -Reinheit ergab sich für jede Probe eine Restmenge von 14 µl Lösung. Bei -80°C wurden die Proben im Gefrier-Kühlschrank kryokonserviert, um eine nachfolgende Degradation der RNA auszuschließen. Nach Angaben des Unternehmens Qiagen (Hilden / Deutschland), dessen RNA-Extraktions-Kit verwendet wurde, kann die Stabilität der RNA bei einer Lagerung der Proben unterhalb von -20°C für mindestens 1 Jahr gewährleistet werden.

4.7 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

4.7.1 Prinzip der quantitativen Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) beruht auf dem Prinzip der Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Bei diesem handelt es sich um ein Verfahren zur Amplifikation von RNA-Abschnitten. Ausgangspunkt dieser Methode ist die von Kary B. Mullis 1987 entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In Analogie zur natürlichen DNA-Replikation der Zelle werden in diesem Verfahren thermostabile Polymerasen eingesetzt, die ausgehend von einem vorliegenden DNA-Fragment zyklisch neue DNA-Stränge synthetisieren und damit zur Vervielfachung der ursprünglich eingesetzten DNA beitragen. Als Bausteine der Synthese dienen hierbei vier Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), die dem Reaktionsansatz additiv

zur thermostabilen Taq-Polymerase und der Ausgangs-DNA zugesetzt werden müssen. Da die thermostabilen Taq-Polymerasen ausschließlich DNA vervielfältigen können, ist für die Amplifikation und Detektion von RNA ein Umschreiben in DNA notwendig. Hierzu wird das Enzym Reverse Transkriptase eingesetzt, welches einsträngige Ribonukleinsäure in komplementäre, doppelsträngige DNA – die sogenannte cDNA (= complementary DNA) – umwandelt. Um den thermostabilen Taq-Polymerasen die Replikation der cDNA zu ermöglichen, erfolgt unter starker Hitzeeinwirkung die Aufspaltung der Doppelhelix. Erst nachdem die cDNA aufgespalten in zwei Einzelsträngen vorliegt, ist es den Polymerasen möglich, durch komplementäre Basenanlagerung neue DNA-Stränge zu synthetisieren. Hierbei orientieren sich die Polymerasen am ursprünglichen DNA-Strang, den sie als komplementären Bauplan für die Neusynthese nutzen. Als Startpunkt für die erste Verknüpfungsreaktion benötigen die Polymerasen zusätzlich einen sogenannten Primer. Hierbei handelt es sich um ein RNA- oder DNA-Fragment, das sich komplementär an eine definierte Stelle der Ausgangs-DNA anlagert und den Polymerasen die erste Hydroxylgruppe zur DNA-Synthese bereitstellt. Die typischerweise 18 bis 30 Nukleotide umfassenden Primer können hierbei maschinell in jeder gewünschten Sequenz hergestellt werden. Mit der Sequenz des Primers wird vorgegeben, welcher Abschnitt der Ausgangs-DNA vervielfältigt wird. Neben der Sequenz als Auswahlkriterium des Primers spielt auch die Schmelztemperatur desselben eine wichtige Rolle. Diese muss zur Annealing-Temperatur des PCR-Prozesses passen, d.h. der Primer muss stabil gegenüber den maximalen Temperaturen, bei denen noch eine Hybridisierung erzielt werden kann (= Annealing-Temperatur), sein. Unter Nutzung des Primers als Startpunkt und ausgehend von der Ursprungs-DNA findet nun eine Verknüpfung der Nukleotide durch die DNA-Polymerase zu einem komplementären DNA-Strang statt. Hierbei erfolgt die Synthese immer vom 5' zum 3'-Ende des DNA-Stranges.

Mit der quantitativen Real-Time-PCR ist es hierbei nicht nur möglich, DNA und RNA zu amplifizieren, sondern auch die Konzentration der Amplifikate zu bestimmen. Dies gelingt durch die Beimischung von Fluoreszenzfarbstoffen, die erst inaktiv vorliegen, dann aber durch die Synthese der DNA aktiviert werden. Ein Beispiel hierfür ist das auch in dieser Studie genutzte SYBR Green, das sich als asymmetrischer Cyanid-

Farbstoff in doppelsträngige DNA einlagert und hiernach ein grünes Licht emittiert. Die Fluoreszenzintensität wiederum kann gemessen werden und gibt Aufschluss über die Menge an Amplifikaten. Zudem kann im Rahmen einer Schmelzkurvenanalyse die entstehende, doppelsträngige DNA aufgeschmolzen werden, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff (hier: SYBR Green) freigesetzt und somit eine Änderung der Fluoreszenz registriert wird. Da die für den Schmelzprozess notwendige Temperatur abhängig von der DNA-Fragmentlänge ist, kann mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten unterschieden werden. Dieser Umstand befähigt die qRT-PCR spezifisch Kleinstmengen an DNA und RNA, einschließlich der MicroRNA, nachzuweisen. Die anhand von Fluoreszenzmessungen durchgeführte Quantifizierung der Amplifikate erfolgt hierbei in der exponentiellen Phase der PCR.

4.7.2 Auswahl der Primer und des Housekeeping-Gens

Ziel der quantitativen Real-Time-PCR war es, die vorliegenden Proben zum einen auf die klassischen onkogenen MicroRNAs des Pankreaskarzinoms – miR-21, miR-155 und miR-196a – und zum anderen auf die MicroRNA-200-Familie hin zu untersuchen (*Abbildung 16*). Die letztgenannte setzt sich hierbei aus den MicroRNAs miR-141, miR-200a/b/c und miR-429 zusammen. Von nahezu jeder MicroRNA existieren wiederum zwei Isoformen – eine „Major“-Form (miR), die in den jeweiligen Zellen in höherer Konzentration vorliegt und eine „Minor-Form“ (miR*), die nur in geringen Konzentrationen vorliegt. Die „Major“- und die „Minor“-Form stellen hierbei keineswegs Isoformen im eigentlichen Sinne dar, da sie sich sowohl hinsichtlich ihrer Basenzusammensetzung, als auch bezüglich ihrer Zielstrukturen deutlich voneinander unterscheiden. Dennoch ist von einer weitgehend äquivalenten Wirkung beider Varianten auszugehen. Je nach MicroRNA-Familie entsprechen dabei „Major“- (miR) und „Minor“-Form (miR*) entweder der 3p- oder der 5p-Variante. In dieser Studie wurden vorwiegend die „Major“-Formen (miR) untersucht. Die Primer wurden hinsichtlich ihrer 3p-/5p-Form so ausgewählt, dass im Rahmen der qRT-PCR eine Replikation der „Major“-Form erfolgte. Eine Ausnahme hiervon bildete die MicroRNA miR-21*, welche in der „Minor“-Variante ausgewählt wurde. Die Auswahl der „Minor-Variante“ miR-21* erfolgte unter der Überlegung, dass dieser eine wichtige Rolle im

Pankreaskarzinom zukommen könnte, da sie die Genexpression u.a. von Bcl-2 und CDK6 beeinflusst [1]. Sowohl für Bcl-2, als auch für CDK6 wurde bereits eine Beteiligung an der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms nachgewiesen [49, 130].

Zur Amplifikation der in den Proben enthaltenen MicroRNAs wurden miScript Primer der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Bei diesen handelte es sich um MicroRNA-spezifische „forward primer“, die eine Initiierung der Kettenverlängerung nur im Beisein der entsprechenden komplementären MicroRNA ermöglichten. Für den Synthesebeginn wurde neben den MicroRNA-spezifischen „forward primer“ auch ein unspezifischer „reverse primer“ benötigt, welcher in Form des Qiagen miScript Universal Primer dem Reaktionsansatz hinzugefügt wurde.

Als Haushaltsgen wurde RNU6-2 (Synonym RNU6B) genutzt. Haushaltsgene (engl. *housekeeping genes*) sind nicht-regulierte Gene, deren Expression unabhängig von der Zellart, vom Zellstadium sowie von äußeren Einflüssen erfolgt. Damit eignen sich Haushaltsgene zur Normalisierung von RNA-Expressionslevel in qRT-PCR-Untersuchungen. RNU6-2 stellt hierbei eine kleine Ribonukleinsäure (snRNA) dar, die integraler Bestandteil von Spleißosomen ist und nicht reguliert wird. Das für RNU6-2 kodierende Gen ist im Menschen auf Chromosom 10 (10p13) lokalisiert und umfasst 107 Basenpaare. Da RNU6-2 weitgehend unabhängig von zellulären Einflüssen exprimiert wird, stellt es ein ideales Haushaltsgen zur Normalisierung der RNA-Expression dar. Als Referenzgen fand RNU6-2 dementsprechend bereits in zahlreichen Studien, die sich thematisch mit MicroRNAs in soliden Tumoren auseinandersetzten, Verwendung [26, 101, 199, 202, 261]. Analog zu den MicroRNAs bediente sich die hier vorliegende Arbeit auch bezüglich des Haushaltsgens RNU6-2 eines Qiagen® miScript Primers (Qiagen, Hilden / Deutschland).

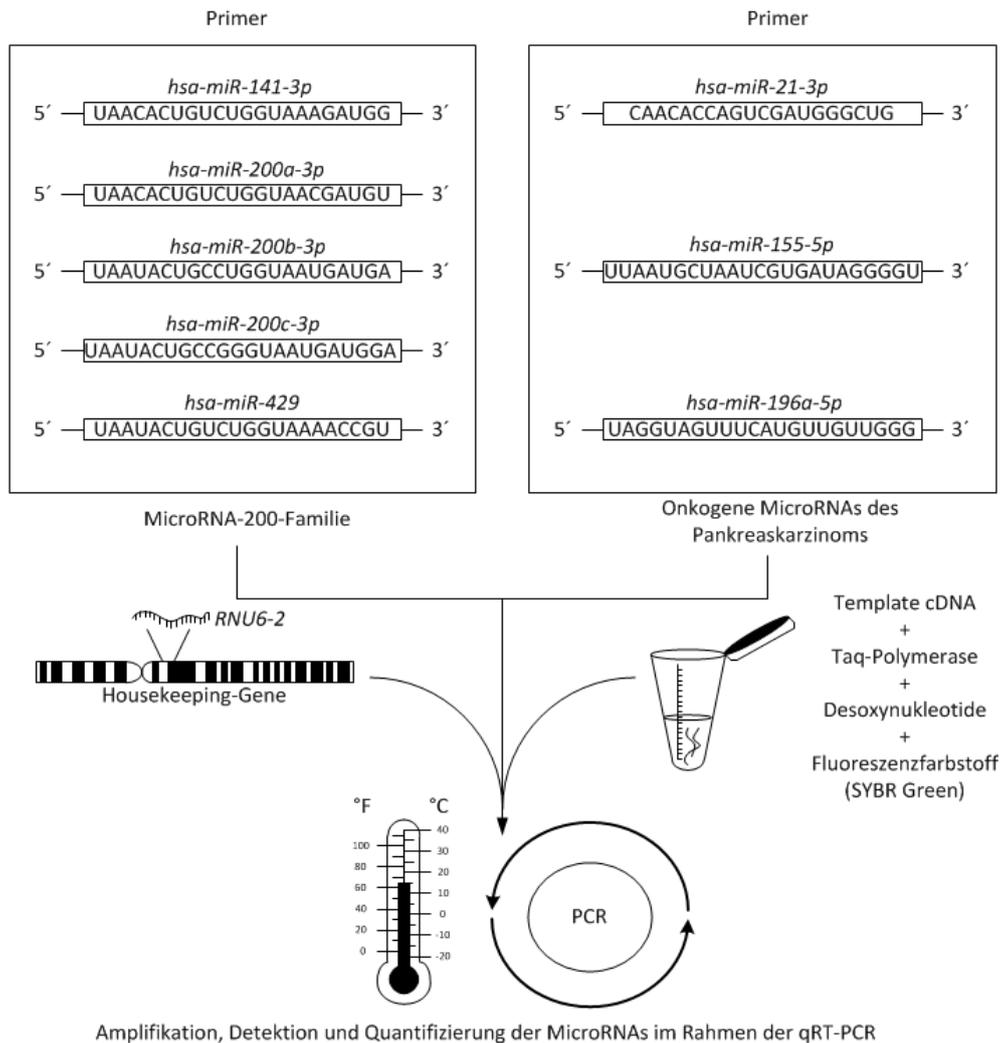


Abbildung 15: Primer der Real-Time-PCR

In dieser Studie kamen vorwiegend die „Major“-Formen (miR), d.h. die biologisch aktiven Varianten der MicroRNAs zur Anwendung. Während die Mitglieder der MicroRNA-200-Familie biologisch aktiv in der 3p-Form vorliegen, stellt die 5p-Variante die biologisch aktive Form der MicroRNAs miR-155 und miR-196a dar. Als einzige „Minor-Form“ (miR*) wurde die MicroRNA hsa-miR-21-3p genutzt. Diese wurde ausgewählt, da sie die Expression von Genen beeinflusst, denen eine Beteiligung in der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms zugeschrieben wird. Die Primer wurden so gewählt, dass die Amplifikation der gewünschten MicroRNA-Form sichergestellt werden konnte. Als Haushaltsgen fand RNU6-2 Verwendung. Neben Primer, RNU6-2 und Ausgangs-DNA waren auch Desoxynucleotide, Taq-Polymerase und der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green integrale Bestandteile des PCR-Ansatzes.

4.7.3 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Reagenzien, Lösungen und Hilfsmittel zur Durchführung der reversen Transkription:

- Qiagen® miScript II RT Kit (Qiagen®, Hilden / Deutschland), darin enthalten:
 - miScript Reverse Transcriptase Mix
 - miScript Nucleics Mix
 - miScript HiSpec Buffer
 - RNase-Free Water
- Eppendorf® ThermoStat plus (Eppendorf®, Hamburg / Deutschland)
- Tischzentrifuge Eppendorf MiniSpin® (Eppendorf®, Hamburg / Deutschland)
- 0,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf®, Hamburg / Deutschland)
- Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen (Eppendorf®, Hamburg / Deutschland)
- Eis

Unter Nutzung der Reversen Transkriptase konnte die aus den Pankreasgeweben extrahierte RNA in komplementäre DNA, der sogenannten cDNA, überführt werden. In einem ersten Schritt wurden hierzu die RNA-haltigen Lösungen aufgetaut, zentrifugiert und auf Eis gebettet. Jeweils 12 µl RNA-Lösung wurde den Reaktionsgefäßen nachfolgend entnommen und mit jeweils 4 µl miScript HiSpec Buffer, 2 µl miScript Nucleics Mix sowie 2 µl miScript Reverse Transcriptase Mix zu einer Ansatzlösung von 20 µl Gesamtvolumen gemischt. Nach erneuter Zentrifugierung erfolgte die Inkubation der jeweiligen Ansatzlösungen für 60 Minuten bei einer Temperatur von 37°C im Thermoblock. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Umwandlung der RNA in komplementäre DNA (cDNA), katalysiert durch das Enzym Reverse Transkriptase. Der Abbruch der reversen Transkription wurde im Anschluss hieran durch ein kurzzeitiges, fünfminütiges Erhitzen der Proben auf eine Temperatur von 95°C, bei der es zur Inaktivierung des Enzyms kommt, erzielt. Die Abkühlung der Proben wurde mittels Einbettung in Eis vorgenommen. Durch Zufügen von 80 µl RNase-freiem Wasser (DEPC H₂O) erfolgte eine Verdünnung der cDNA auf ein Ausgangsvolumen von 100 µl (Verdünnung 1:5). Bei -20°C wurden die, auf diesem Wege entstandenen, cDNA-Lösungen kryokonserviert.

4.7.4 Durchführung der qRT-PCR

4.7.4.1 Reagenzien, Lösungen und Hilfsmittel zur Durchführung der qRT-PCR

- Qiagen® miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen®, Hilden / Deutschland),
darin enthalten:
 - 2x QuantiTect SYBR Green Master Mix*
 - 10x miScript Universal Primer
 - RNase-Free Water
- 10 x Qiagen® miScript Primer Assay (Primer der zu untersuchenden MicroRNAs sowie des Haushaltsgens RNU6-2) (Qiagen®, Hilden / Deutschland)
- cDNA-Lösung (siehe 4.7.3)
- ABI PRISM® 384 Well-Clear Optical Reaction Plate (Applied Biosystems Inc., Foster City / USA)
- BioRad® CFX384 Real-Time PCR Detection System (BioRAD Laboratories Inc., Hercules / USA)
- Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen (Eppendorf®, Hamburg / Deutschland)
- RNase-freie Reaktionsgefäße (2 ml; 0,5 ml; 200 µl) (Eppendorf®, Hamburg / Deutschland)
- Eis

* Der QuantiTect SYBR Green Master Mix setzt sich aus HotStar Taq® DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR Buffer, einem dNTP-Mix (einschließlich dUTP), SYBR Green I, Rox® passive reference dye sowie 5 mM MgCl₂ zusammen.

Der Umgang mit den oben genannten Materialien und Hilfsmitteln fand unter sterilen Bedingungen statt. Diese wurden durch Desinfektion der genutzten Arbeitsflächen, durch Tragen von Einmalhandschuhen und durch die Verwendung von RNase-freien Einmalartikeln (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc.) gewährleistet.

4.7.4.2 Herstellung des Reaktionslösung

Für jede MicroRNA – miR-21*, miR-155, miR-196a, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429 – sowie für das Haushaltsgen RNU6-2 wurde ein Reaktionslösung bestehend aus dem QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, einem Universal Primer (miScript Universal Primer) und dem jeweiligen Primer für die MicroRNA bzw. für das Haushaltsgen erstellt (*Tabelle 10*). Der QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix enthielt wiederum die für die qRT-PCR unabdingbaren Komponenten Taq-Polymerase, Desoxynukleotide, MgCl₂, SYBR Green-I-Fluoreszenzfarbstoff, SYBR Green-Pufferlösung sowie den Rox® Referenzfarbstoff, welcher zur Normalisierung des Fluoreszenz-Reportersignals während der PCR diente. Entsprechend den 22 Pankreasgewebeprobe (9 Pankreaskarzinome, 7 chronische Pankreatitiden, 3 gesunde Pankreata und 3 Azinusproben), von denen nach reverser Transkription nun 22 cDNA-Lösungen vorlagen, wurden die Reaktionslösungen für jede MicroRNA zuzüglich Haushaltsgen in 23 Proben unterteilt und mit jeweils 2 µl der 22 cDNA-Lösungen vermischt. Die 23. Probe stellte hierbei eine Leerkontrolle („No template control“) dar, die zwar die Reaktionslösung inklusive Primer enthielt, nicht jedoch mit cDNA versehen wurde (*Tabelle 11*). Es resultierten somit 207 mit cDNA versehene Reaktionslösungen, entsprechend den jeweils 22 Pankreasproben sowie einer Leerkontrolle für 8 zu untersuchende MicroRNAs und einem Haushaltsgen. Da jede Probe als Triplet in die PCR eingehen sollte, wurde die Menge des Reaktionsgemisches so gewählt, dass eine Befüllung von 3 Wells der Reaktionsplatte möglich war. Die cDNA-haltige Reaktionslösung wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl pro Well aufgefüllt. Vorab wurde eine Pipettierreserve mit dem Faktor 1,16 des Ausgangsvolumens definiert, um mögliche Pipettierverluste auszugleichen.

Tabelle 10: Pipettierschema der qRT-PCR

Ingredienz:	1 Well:	1 Well (mit Pipettierreserve):	Triplet (3 Well inklusive Pipettierreserve)
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µl	11,6 µl	35 µl
10x miScript Universal Primer	2 µl	2,32 µl	7 µl
10x miScript Primer Assay*	2 µl	2,32 µl	7 µl
RNase freies Wasser	4 µl	4,64 µl	14 µl
cDNA	2 µl	2,32 µl	7 µl
Gesamt:	20 µl	23,2 µl	70 µl

Primer für die einzelnen MicroRNAs (miR-21, miR-155, miR-196a, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429) sowie für das Haushaltsgen RNU6-2

Tabelle 11: Pipettierschema der PCR-Leerkontrolle

Ingredienz:	1 Well:	1 Well (mit Pipettierreserve):
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µl	11,6 µl
10x miScript Universal Primer	2 µl	2,32 µl
10x miScript Primer Assay*	2 µl	2,32 µl
RNase freies Wasser	6 µl	6,96 µl
Gesamt:	20 µl	23,2 µl

Primer für die einzelnen MicroRNAs (miR-21, miR-155, miR-196a, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429) sowie für das Haushaltsgen RNU6-2

Nach Herstellung der cDNA-haltigen PCR-Reaktionslösung wurde diese unter Verwendung von 384 Well-Reaktionsplatten in die jeweiligen Wells pipettiert. Die befüllten Reaktionsplatten wurden in einem abschließenden Schritt mit einer Folie versiegelt.

4.7.4.3 Inkubation

Die Inkubation erfolgte in einem BioRad® CFX384 Real-Time PCR Detection System, welches von der Sektion „Integrierte Funktionelle Genomik“ des Interdisziplinären

Zentrums für Klinische Forschung (IKZF) der Universität Münster bereitgestellt wurde. Das BioRad® CFX384 Real-Time PCR Detection System führte nach Eingabe des Inkubationsprotokolls und dem Einlegen der Reaktionsplatte vollautomatisch sowohl die Inkubation der 384-Well-Reaktionsplatten zur Amplifikation, als auch die Quantifizierung der Amplifikationsprodukte durch. Das hierbei genutzte Inkubationsprotokoll orientierte sich an den Vorgaben zum miScript PCR Assay der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Den Anfang der Inkubation markierte die Aktivierung der Taq-Polymerase bei einer Temperatur von 95°C, gefolgt von der Denaturierung der DNA bei 94°C (Tabelle 12). Fortgesetzt wurde die Inkubation mit der Hybridisierung der Primer (Annealing) bei einer Temperatur von 55°C, woran wiederum die Amplifikationsphase, die bei einem Temperaturoptimum von 70°C durchgeführt wurde, anknüpfte. Zur Kettenverlängerung erfolgten insgesamt 40 Zyklen aus sich jeweils wiederholender Denaturierung, Annealing und Amplifikation. In der exponentiellen Phase der Amplifikation führte das BioRad® CFX384 Real-Time PCR Detection System selbsttätig Fluoreszenzmessungen durch und quantifizierte hierdurch die Menge der Amplifikate. In einem letzten Schritt erfolgte die Schmelzkurvenanalyse, bei der durch stufenweises Erhitzen von 60°C auf 95°C die Denaturierungstemperaturen der einzelnen Amplifikationsprodukte bestimmt wurden. Diese wiederum ermöglichten Rückschlüsse auf die jeweilige Fragmentgröße der Amplifikate.

Tabelle 12: Inkubationsschema qRT-PCR

Arbeitsschritt:	Temperatur:	Temperatur- anstieg:	Zeit:	Hintergrund:
Initiale Aktivierung	95°C	1°C/s	15 Minuten	Aktivierung der HotStar® Taq-Polymerase
Denaturierung	94°C	1°C/s	15 Sekunden	Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges
Annealing	55°C	1°C/s	30 Sekunden	Anlagerung des Primers an die Ausgangs-DNA
Amplifikation	70°C	1°C/s	30 Sekunden	DNA-Replikation
Zyklen	Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Amplifizierung		40 Zyklen	DNA-Replikation und Fluoreszenzmessung
Stopp der Amplifikation	95°C	1°C/s	15 Sekunden	Dissoziation des Primers von der Ausgangs-DNA
Schmelzkurve	60°C - 95°C	0,5°C/s	15 Sekunden	Fragmentgrößen-abhängige Denaturierung der DNA

4.7.4.4 Bestimmung der normalisierten Expression ($\Delta\Delta Ct$)

Die Quantifizierung der Amplifikationsprodukte erfolgte durch die Erfassung von in DNA eingelagertem Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green). Ausgehend von den Fluoreszenzmessungen wurde der Ct-Wert ($Ct = cycle\ threshold$) bestimmt, welcher ein Maß für die exponentielle Amplifikation der Ziel-DNA ist. Zusätzlich wurde die Effizienz E erfasst. Hierbei handelt es sich um einen Wert, der die Anzahl der Amplifikationsprodukte angibt, die in jedem PCR-Zyklus neu gebildet werden. Unter Berücksichtigung des Ct-Wertes und der Effizienz E konnte für jede Probe die relative Quantität berechnet werden. Um eine Normalisierung der Expressionswerte durchzuführen, wurden – gemäß der von Pfaffl [189] 2001 vorgestellten Methode – für jede Probe die relativen Quantitäten der einzelnen MicroRNAs mit denen des Haushaltsgens RNU6-2 in Relation zueinander gesetzt. Der Berechnung lag folgende Formel zugrunde:

$$\begin{aligned} \text{Normalisierte Expression} &= \frac{E_{\text{MicroRNA}}^{Ct(\text{Minimum})-Ct(\text{Probe})}}{E_{\text{RNU6}}^{Ct(\text{Minimum})-Ct(\text{Probe})} \frac{1}{n}} \\ &= \frac{\text{Relative Quantität (Probe)}}{\text{Relative Quantität (Haushaltsgen RNU6-2)} \frac{1}{n}} \end{aligned}$$

E = Effizienz

$Ct(\text{Minimum})$ = Kleinster Ct-Wert einer Probe als Kontrollwert

$Ct(\text{Probe})$ = Mittlerer Ct-Wert einer Probe

Für die Berechnung der normalisierten Expressionswerte wurde die Software „CFX-Manager“ der Firma BioRad genutzt. Alle weitergehenden statistischen Berechnungen stützten sich hierbei auf die mittels oben genannter Formel errechneten und normalisierten Expressionswerte.

Anhand der für die Leerkontrolle (No Template Control [NTC]) bestimmten Ct-Werte konnte zudem nachgewiesen werden, dass ohne die eingesetzte cDNA eine

Amplifikation nicht möglich war. Eine relevante DNA-Kontamination der Reaktionsplatte wurde somit ausgeschlossen.

4.8 Erfassung patientenbezogener Daten

Anhand des histopathologischen Berichtes, der für jede Pankreas-Gewebeprobe vorlag, konnte jede Gewebeprobe einem Patienten zugeordnet werden. Retrospektiv wurden Daten zu jedem dieser Patienten erhoben. Informationen zu den Patienten wurden sowohl der onkologischen Sprechstunde der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Münster, als auch den histopathologischen Befunden entnommen. Ergänzt wurden die Daten durch Informationen aus Arztbriefen und durch Angaben der Hausärzte. Für den Zeitraum von 24 Monaten nach Operation lagen Follow-up-Daten der Pankreaskarzinom-Fälle vor.

Folgende Daten wurden für die Auswertung erhoben:

- Allgemeine Daten für alle Patientengruppen:
 - Name, Geschlecht und Geburtsdatum des Patienten
 - Operationsbericht (einschließlich Operationszeitpunkt und -verfahren)
 - Histologie
- Zusätzlich erhobene Daten für die Gruppe der Pankreaskarzinome:
 - Angaben zur initialen Symptomatik
 - Postoperative, histopathologische Tumorklassifikation (TNM), einschließlich dem Differenzierungsgrad (G) sowie Angaben zu Residualtumor (R-Stadium), Lymphgefäßinfiltration (L-Stadium) und venöser Infiltration (V-Stadium)
 - Angaben über eine adjuvante Behandlung (Chemotherapie, Radiotherapie)
 - Angaben zur rezidivfreien Zeit; bei Vorhandensein von Rezidiven, Angaben über die Rezidivart
 - Todesdatum und -ursache bzw. Datum der letzten Vorstellung in der onkologischen Sprechstunde

Allgemeine Informationen konnten für alle 19 Patienten erhoben werden. Für einen Patienten aus der Gruppe der Pankreaskarzinome konnten nur unvollständige Daten erhoben werden, so dass dieser Patient in der Mehrzahl der statistischen Analysen nicht berücksichtigt wurde.

4.9 Statistische Methoden

4.9.1 Hilfsmittel zur statistischen Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS Statistics 20.0 der Firma IBM (IBM Corporation, Armonk / USA).

4.9.2 Untersuchung der klinischen Daten

Die erhobenen klinischen Daten (Alter, Geschlecht, Operationsverfahren, Tumorlokalisation, initiale klinische Symptomatik und adjuvante Therapie) wurden einer deskriptiven Analyse unterzogen. Hierzu erfolgte eine tabellarische Erfassung der Daten mit nachfolgender Untersuchung der Verteilung.

4.9.3 Untersuchung der MicroRNA-Expression in Bezug auf die Pankreasproben

Untersucht wurde zunächst die Beziehung zwischen dem MicroRNA-Expressionsmuster und dem jeweiligen Gewebetyp (PDAC, chronische Pankreatitis, gesunde duktale Epithelien, Azinuszellen). Es galt herauszufinden, ob anhand der MicroRNA-Expression Rückschlüsse auf den jeweiligen Gewebetyp möglich sind. Hierzu wurden die normalisierten Expressionswerte – unterteilt nach den MicroRNAs – für jede Pankreasprobe tabellarisch erfasst. Aufgeschlüsselt nach den vier Untersuchungsgruppen sowie den einzelnen MicroRNAs erfolgte eine Berechnung des Expressionsmittelwertes sowie des Medians unter Angabe der Standardabweichung bzw. des Standardfehlers. Unterschiede in den Expressionsmittelwerten, die unter den vier Untersuchungsgruppen ausgemacht werden konnten, wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests weiter untersucht. Es sollte geprüft werden, ob ein die MicroRNA-Expression betreffender Unterschied zwischen den vier Untersuchungsgruppen zufällig

oder zu verallgemeinern, d.h. signifikant ist. Da die Pankreasgewebe unabhängige, nicht verbundene Stichproben darstellen, wurde der Mann-Whitney-U-Test als geeigneter nichtparametrischer Test ausersehen. Die Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests ist jedoch nur bei nicht normalverteilten Werten zulässig. Aus diesem Grund wurden die, für die jeweiligen MicroRNAs bestimmten, Expressionswerte initial einer Überprüfung der Normalverteilung unterzogen (Kolmogorov-Smirnov-Test). Eine Normalverteilung der Expressionswerte konnte hierbei nicht nachgewiesen werden. Angesichts der geringen Fallzahl pro Stichprobe wurde für die Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests die exakte Signifikanz (= 2* [1-seitige Signifikanz]) gewählt. Des Weiteren wurde die diagnostische Leistungsfähigkeit der einzelnen MicroRNAs in Bezug auf die Identifikation von Pankreaskarzinomen (PDAC) untersucht. Hierzu wurde im Rahmen einer ROC-Analyse geprüft, ob mittels einzelner, deregulierter MicroRNAs die Diagnose eines Pankreaskarzinoms verifiziert werden kann. Im Zuge dessen erfolgte eine graphische Darstellung von Sensitivität und Spezifität in Form einer ROC-Kurve. Die ROC-Analyse wurde auf einem Signifikanzniveau von 5% ($p \leq 0,05$) durchgeführt.

4.9.4 Untersuchung von Korrelationen bezüglich der MicroRNA-Expression

Um Zusammenhänge zwischen den Expressionen der einzelnen MicroRNAs aufzuzeigen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Für diese wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (= Spearmans Rho) genutzt, welcher auch bei nicht-linearen Beziehungen Verwendung findet und robust gegenüber Ausreißern ist. Für die Korrelationen wurde ein Signifikanzniveau von 5 % ($p \leq 0,05$) definiert. Da sowohl ein positiver, als auch ein negativer Zusammenhang zwischen den einzelnen MicroRNA-Expressionen für möglich gehalten wurde, erfolgte eine zweiseitige Signifikanzprüfung.

4.9.5 Untersuchung der rezidivfreien Zeit

Die Rezidivfreiheit wurde über einen Zeitraum von 24 Monaten nach stattgefundener Operation beobachtet. Hierbei konnte auf die Daten von 8 der 9 Pankreaskarzinom-Fälle zurückgegriffen werden. Die Berechnung des durchschnittlichen rezidivfreien Überlebens erfolgte mit der Kaplan-Meier-Methode. Des Weiteren wurde ein möglicher Zusammenhang der Rezidivfreiheit mit den Kriterien Geschlecht, Nodalbefall und

Residualtumor analysiert. Hierfür wurde der Log-Rank-Test genutzt. Sich der Cox-Regressionsanalyse bedienend, wurde zusätzlich ein möglicher Zusammenhang zwischen der MicroRNA-Expression und des, für jeden Patienten bestimmten, rezidivfreien Überlebens in Monaten untersucht. Die Rezidivfreiheit wurde hierbei über einen Zeitraum von 24 Monaten nach stattgefundener Operation beobachtet. Analog zu den übrigen statistischen Untersuchungen dieser Studie, erfolgte die Durchführung der Cox-Regressionsanalyse ebenfalls unter Verwendung eines 95%-Konfidenzintervalls.

4.9.6 Untersuchung der Überlebenszeit

Zur Analyse der Überlebenszeit wurden für die Pankreaskarzinom-Fälle die Monate von der Operation bis zum Tod des Patienten berechnet. Die Patienten, die zum Abschluss des 24-monatigen Beobachtungszeitraumes noch lebten ($n = 2$), wurden zum Zeitpunkt des Beobachtungsendes zensiert. Ebenfalls zensiert werden musste ein Patient, der sich der weiteren Beobachtung entzog. Hier erfolgte die Zensur zum Zeitpunkt der letzten Kontrolle. Die Überlebenszeiten wurden graphisch in Form von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Eine differenzierte Betrachtung der Überlebenszeiten erfolgte hinsichtlich der Kriterien Geschlecht, Nodalbefall, Residualtumor und MicroRNA-Expression. Während die Einflussnahme der Kriterien Geschlecht, Nodalbefall und Residualtumor mithilfe des Log-Rank-Tests untersucht wurden, erfolgte die Untersuchung der MicroRNA-Einwirkung auf die Überlebenszeit mithilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman sowie einer nachfolgenden Cox-Regressionsanalyse. Diese wurde für jede der 8 untersuchten MicroRNAs durchgeführt. Erneut wurde ein Signifikanzniveau von 5% definiert.

5 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Studie wurden FFPE-Gewebeproben von 19 verschiedenen Patienten, darunter 9 Pankreaskarzinompatienten, 7 Patienten mit einer chronischen Pankreatitis sowie 3 Patienten mit einem gesunden Pankreas, untersucht. Mittels Laser-Mikrodissektion wurden die duktaalen Epithelien der einzelnen Gewebeproben isoliert. Die Entfernung der duktaalen Epithelien erfolgte unter der Überlegung, dass das duktaale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) seinen Ursprung von ebendiesen Zellen nimmt. In einem nachfolgenden Schritt wurde die RNA dieser Proben extrahiert und auf ihre Konzentration sowie Reinheit getestet. Um die MicroRNA-Expression dieser Proben zu untersuchen, wurde eine quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Mit dieser gelang eine Quantifizierung der in den einzelnen Gewebeproben vorliegenden MicroRNAs. Die den Gewebeproben zugrundeliegenden Patienten wurden auf ihre Überlebenszeit beobachtet, um Zusammenhänge zwischen der MicroRNA-Expression und dem Überleben herauszustellen. Analog zur Überlebenszeit wurde auch die rezidivfreie Zeit der jeweiligen Patienten dokumentiert, um eine Korrelation der MicroRNA-Expression mit dem Rezidivzeitpunkt zu untersuchen.

5.1 Epidemiologische und klinische Aspekte der Patientengruppen

5.1.1 *Klinische und pathologische Charakteristika der PDAC-Patientengruppe*

Der Altersdurchschnitt zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag in dieser Patientengruppe bei 67,6 Jahren (*Tabelle 13*). Der jüngste Patient, von dem FFPE-Proben in dieser Studie untersucht wurden, war 48,7 Jahre alt, der älteste hingegen 76,9 Jahre alt. Das Verhältnis erkrankter Männer zu erkrankten Frauen betrug 1,25:1.

Die der Diagnose vorausgegangene, initiale Symptomatik wurde im Wesentlichen von Ikterus (56%) und Gewichtsverlust (44%) dominiert. Schmerzen (22%) spielten hingegen eine untergeordnete Rolle. Die Symptomatik ist hierbei im Zusammenhang mit der Tumorlokalisierung zu sehen. In 2/3 der Fälle war das Pankreaskarzinom im Pankreaskopf lokalisiert, zu einem Drittel im Pankreaskörper. Die häufigste Operation,

die bei der PDAC-Patientengruppe durchgeführt wurde, war die pyloruserhaltende Pankreatoduodenektomie nach Traverso-Longmire (67%). Eine R0-Resektion konnte bei 75% der Patienten erzielt werden. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wiesen die meisten Patienten bereits einen Lymphknotenbefall auf (N0 = 22%, N1 = 78%). Alle Pankreaskarzinome wurden dem UICC-Stadium II zugeordnet.

Tabelle 13: Charakteristika der PDAC-Untersuchungsgruppe

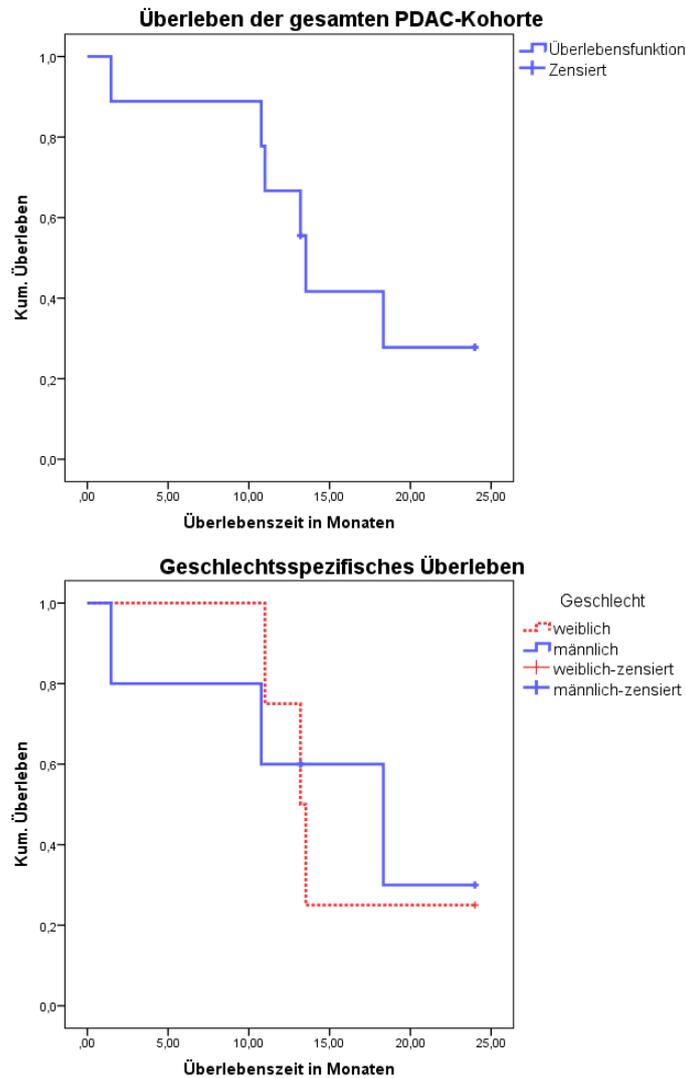
Charakteristikum:	Subkategorie:	PDAC-Kohorte:
Anzahl der Patienten	-	9
Mittleres Alter in Jahren	-	67,6
Geschlecht	männlich	5
	weiblich	4
Initiale Symptomatik	Ikterus	5
	Gewichtsverlust	4
	Schmerzen	2
Operationsverfahren	OP n. Traverso-Longmire	6
	OP n. Kausch-Whipple	1
	Pankreaslinksresektion	1
	Totale Pankreatektomie	1
Resektion	R0	6
	R1	2
	Nicht bekannt	1
Tumorstadium	IIA	2
	IIB	7
Tumorlokalisation	Pankreaskopf	6
	Pankreaskörper	3
	Pankreasschwanz	0
Tumorgröße	< 20mm	1
	20 -40mm	7
	> 40mm	1
Lymphknotenbefall	N0	2
	N1	7
Lymphgefäßinfiltration	L0	5
	L1	3
	Nicht bekannt	1
Venöse Infiltration	V0	5
	V1	3
	Nicht bekannt	1
Differenzierungsgrad	G1	0
	G2	5
	G3	4
Adjuvante Therapie	Ja	7
	Nein	1
	Nicht bekannt	1

Die resezierten Tumoren zeigten in der Mehrzahl der Fälle eine Größe zwischen 2 cm und 4 cm. Während G1-differenzierte Tumoren aus der Studie ausgeschlossen wurden, waren 55% der hier verwendeten Karzinomgewebe mäßig (G2) und 45% schlecht (G3) differenziert.

Der überwiegende Anteil der Patienten (87,5%) erhielt nach der Operation eine adjuvante Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin. Lediglich bei einem Patienten (12,5%) konnte eine adjuvante Therapie nicht initiiert werden, da dieser bereits vor Beginn der Chemotherapie seinem Tumorleiden erlag. Von 8 PDAC-Patienten, zu denen Angaben hinsichtlich des Rezidivauftritts vorlagen, entwickelten 5 im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv (62,5%). Hierbei handelte es sich vorwiegend um Leber- und Lungenmetastasen. Die mediane rezidivfreie Zeit der Patienten betrug – unter Verwendung der Kaplan-Meier-Methode – 10,5 Monate (Mittelwert 12,5 Monate). Ein Einfluss des Geschlechts auf die rezidivfreie Zeit konnte nicht ausgemacht werden ($p = 0,536$), genauso wenig wie ein Einfluss der Kriterien Nodalbefall ($p = 0,919$) und Residualtumor ($p = 0,813$).

Die Überlebenszeit wurde für die PDAC-Patientenkohorte über einen Zeitraum von 24 Monaten nach der Operation erfasst. Die nach der Kaplan-Meier-Methode ermittelte mediane Überlebenszeit betrug für beide Geschlechter 13,5 Monate (Mittelwert 15,1 Monate). Analog zur rezidivfreien Zeit konnte auch hier kein Einfluss des Geschlechts auf die Prognose nachgewiesen werden ($p = 0,901$). Gleiches galt auch für die Einflussfaktoren Nodalbefall ($p = 0,806$) und Residualtumor ($p = 0,075$). 2 der 9 PDAC-Patienten lebten zum Ende des Beobachtungszeitraumes noch. Ein Patient entzog sich nach etwa einem Jahr der weiteren Beobachtung. All dies wurde in der Berechnung der Überlebenszeit berücksichtigt (*Abbildung 16*).

Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurven der Überlebenszeiten



5.1.2 Klinische und pathologische Charakteristika der Pankreatitis-Gruppe

Zum Zeitpunkt der Operation waren die Patienten, die unter einer chronischen Pankreatitis litten und deren FFPE-Proben in dieser Studie berücksichtigt wurden, im Durchschnitt 47,9 Jahre alt (*Tabelle 14*). Während der jüngste Patient mit chronischer Pankreatitis zum Operationszeitpunkt ein Alter von 34,7 Jahren aufwies, war der älteste Patient dieser Patientengruppe 56,9 Jahre alt. Das Verhältnis erkrankter Männer zu erkrankten Frauen betrug hierbei 6:1.

Analog zu der Pankreaskarzinom-Untersuchungsgruppe stellte die pyloruserhaltende Operation nach Traverso-Longmire auch in der Pankreatitis-Gruppe das häufigste

Operationsverfahren (57%) dar. Die den FFPE-Blöcken zugrundeliegenden, Gewebeproben wurden hierbei vornehmlich dem Pankreaskopf entnommen (86%), seltener dem Pankreaskörper (14%).

Tabelle 14: Charakteristika der Pankreatitis-Gruppe

Charakteristikum:	Subkategorie:	Chronische Pankreatitis-Kohorte:
Anzahl der Patienten	-	7
Mittleres Alter in Jahren	-	47,9
Geschlecht	männlich	6
	weiblich	1
Operationsverfahren	OP n. Traverso-Longmire	4
	OP n. Kausch-Whipple	1
	OP n. Partington-Rochelle	1
	Lokale Exzision	1
Entnahmeort der Präparate	Pankreaskopf	6
	Pankreaskörper	1
	Pankreasschwanz	0

5.1.3 Charakteristika der Kontrollgruppe

Das zur Kontrolle eingesetzte, gesunde Pankreasgewebe entstammte Patienten, deren Pankreasschwanz aus unterschiedlichen Indikationen heraus entfernt wurde. Zum Zeitpunkt der Operation waren die den gesunden Kontrollen zugrundeliegenden Patienten im Mittel 48,6 Jahre alt (*Tabelle 15*). Das Alter des jüngsten Patienten betrug 38,7 Jahre, das des ältesten 58,9 Jahre. Das Geschlechterverhältnis männlich zu weiblich lag bei 2:1.

Tabelle 15: Charakteristika der Kontrollgruppe

Charakteristikum:	Subkategorie:	Kohorte der gesunden Kontrollen:
Anzahl der Patienten	-	3
Mittleres Alter in Jahren	-	48,6
Geschlecht	männlich	2
	weiblich	1
Operationsverfahren	Splenektomie	2
	Pankreasschwanzresektion	1
Entnahmeort der Präparate	Pankreasschwanz	3

5.2 Die MicroRNA-Expression

5.2.1 Expression der untersuchten MicroRNAs in Relation zum Haushaltsgen

In allen 22 Proben konnten die zu untersuchenden MicroRNAs – miR-21*, miR-155, miR-196a, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429 – nachgewiesen werden. Die, gegenüber dem Haushaltsgen RNU6-2 normalisierten, Expressionswerte ($\Delta\Delta Ct$) erstreckten sich hierbei von 0,00644 bis 6,01993 (Tabelle 16). Das Pankreaskarzinom exprimierte im Durchschnitt die meisten MicroRNAs, gefolgt von den gesunden Kontrollen und den chronischen Pankreatitiden (Abbildung 17).

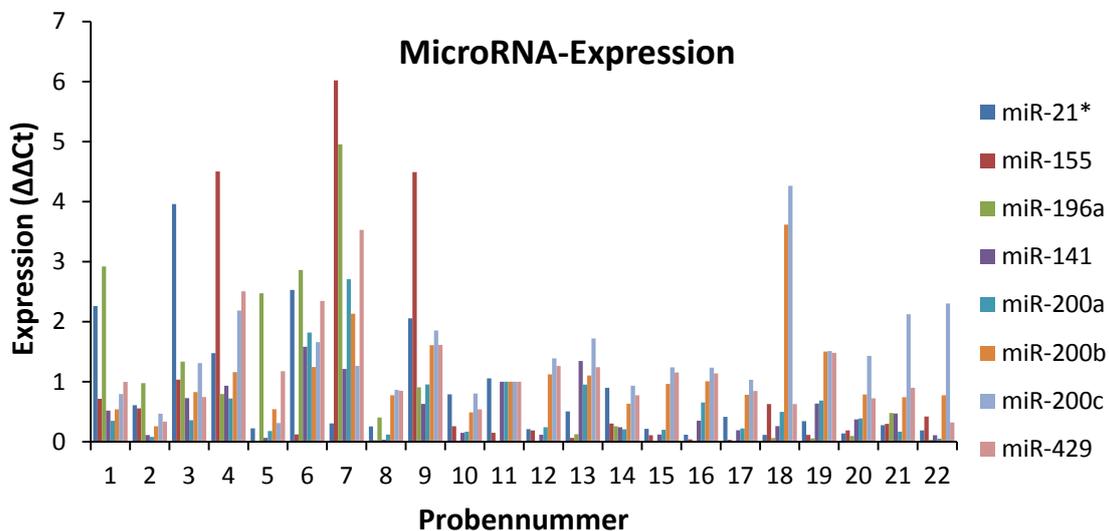


Abbildung 17: Expression aller untersuchten MicroRNAs

Die größten Expressionswerte wurden auf Seiten der Pankreaskarzinome (Proben-Nr. 1-9) ermittelt. Auch die gesunden Kontrollen (Proben-Nr. 17-19) wiesen vereinzelt hohe Expressionswerte auf. Im Vergleich hierzu zeigten die Untersuchungsgruppen der chronischen Pankreatitiden (Proben-Nr. 10-16) sowie der Acini (Proben-Nr. 20-22) hingegen geringere Spannweiten.

Tabelle 16: Expression aller MicroRNAs in Abhängigkeit vom zugrundeliegenden Gewebe

Untersuchungsgruppe:	Anzahl der Expressionswerte *	Minimum:	Maximum:	Mittelwert:	Standardabweichung:
Pankreaskarzinom	72	0,1474	6,01993	1,33018	1,26759
Chronische Pankreatitis	56	0,00860	1,71946	0,60446	0,47643
Gesunde Kontrollen	24	0,00644	4,26288	0,82986	1,06766
Acini	24	0,3223	2,30271	0,57430	0,60372

*Die Anzahl der Expressionswerte ist das Produkt aus FFPE-Probenzahl und der Anzahl an untersuchten MicroRNAs (8).

5.2.2 Die Expression der MicroRNAs miR-21*, miR-155 und miR-196a

Die MicroRNAs miR-21, miR-155 sowie miR-196a unterschieden sich hinsichtlich ihrer Expression beträchtlich.

Die MicroRNA miR-21* zeigte – bezogen auf die Expression – keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen Pankreaskarzinom, chronische Pankreatitis und gesunde Kontrollen (*Abbildung 18*). Lediglich 5 der 9 Pankreaskarzinome (56%) wiesen eine Überexpression von miR-21* im Vergleich zu den chronischen Pankreatitiden und den gesunden Kontrollen auf; signifikante Unterschiede bezüglich der Expression ergaben sich zwischen PDAC und chronischer Pankreatitis ($p = 0,091$) sowie zwischen PDAC und gesunden Kontrollen ($p = 0,209$) jedoch nicht. Einzig zwischen dem Pankreaskarzinom und den azinären Kontrollen konnte ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die miR-21*-Expression nachgewiesen werden ($p = 0,036$). Die miR-21*-Expression gesunder Duktuszellen und gesunder Azinuszellen hingegen unterschied sich nicht ($p = 0,700$).

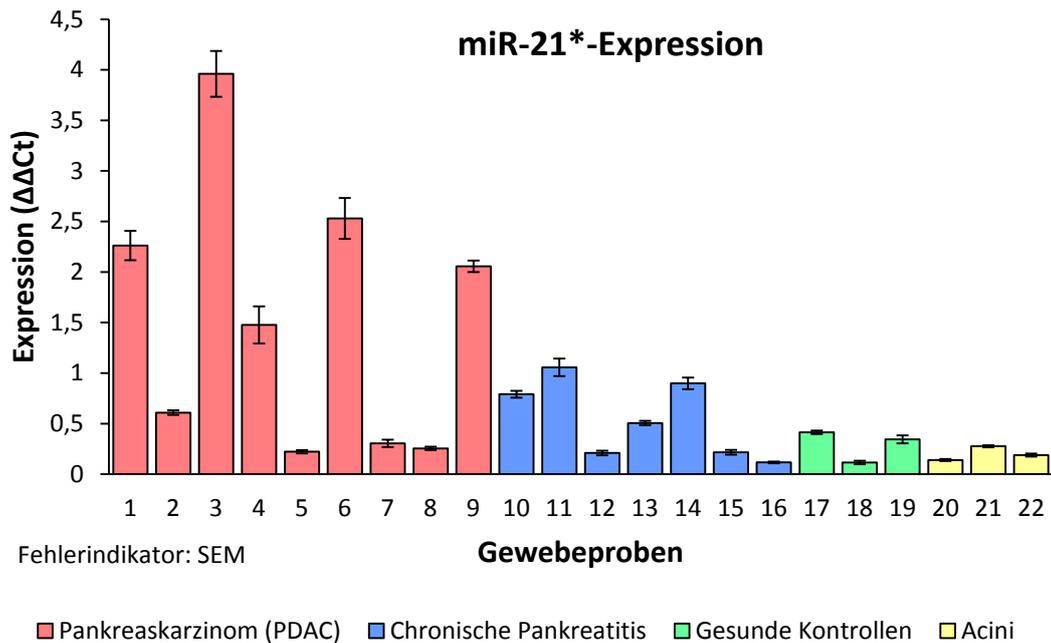


Abbildung 18: Die miR-21*-Expression bezogen auf die jeweiligen Untersuchungsgruppen

Die Expression der MicroRNA mir-21* wies große Schwankungen insbesondere in der Untersuchungsgruppe der Pankreaskarzinome auf. Signifikante Unterschiede zwischen der miR-21*-Expression von PDAC, chronischer Pankreatitis und gesunden Kontrollen ergaben sich nicht.

Auch für die MicroRNA miR-155 konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen nachgewiesen werden (*Abbildung 19*). Relativ zur Pankreatitisgruppe und zu den gesunden Kontrollen zeigte sich nur bei 5 von 9 Pankreaskarzinomen eine übermäßige Expression (56%). Ungleiche Expressionsmuster mit signifikantem Charakter konnten zwischen PDAC und chronischer Pankreatitis ($p = 0,174$) sowie zwischen PDAC und gesunder Kontrolle ($p = 0,373$) nicht beobachtet werden. Zudem konnte auch der für die miR-21* nachgewiesene, signifikante Expressionsunterschied zwischen PDAC und azinärer Kontrolle für miR-155 nicht aufgezeigt werden ($p = 0,482$). Auch die duktaalen Zellen differierten in ihrer miR-155-Expression nicht wesentlich von jener der Azinuszellen ($p = 0,700$).

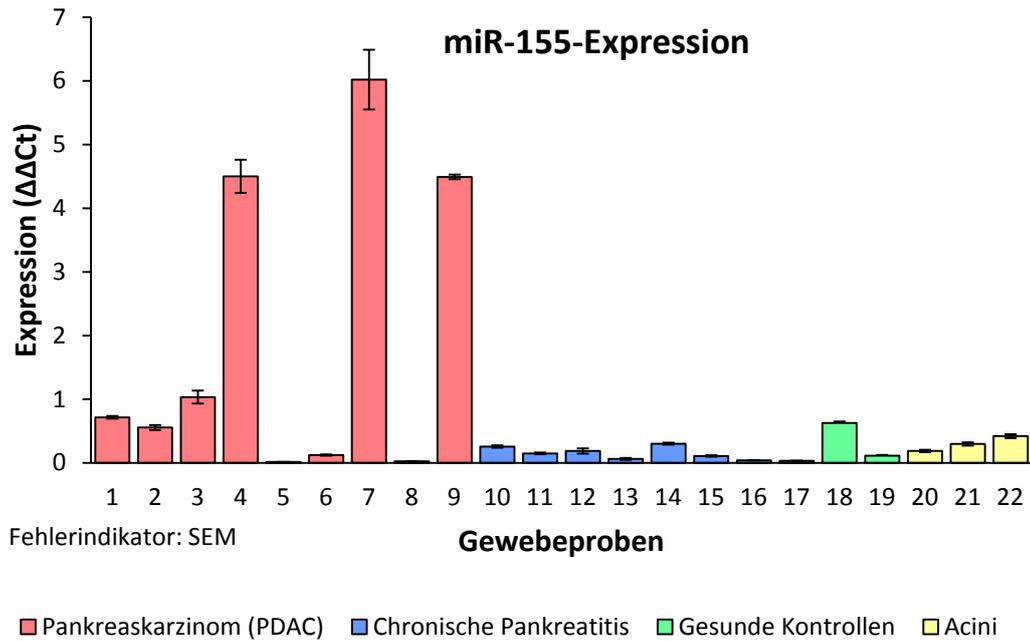


Abbildung 19: miR-155-Expression bezogen auf die jeweiligen Untersuchungsgruppen

Analog zur miR-21*-Expression war auch die miR-155-Expression in Pankreaskarzinomen großen Schwankungen unterworfen. So zeigten 5 der 9 PDAC-Fälle eine übermäßige Expression, während die restlichen PDAC-Proben dem Expressionsniveau der chronischen Pankreatitis und der gesunden Kontrollen glichen. Signifikante Expressionsunterschiede lagen für miR-155 hinsichtlich der 4 Untersuchungsgruppen (PDAC, chronische Pankreatitis, gesunde Kontrollen, Acini) nicht vor.

Im Gegensatz zu miR-21* und miR-155, deren Expression in den unterschiedlichen Gewebetypen nicht signifikant differierte, konnte für miR-196a eine signifikante Überexpression in der Gruppe der Pankreaskarzinome beobachtet werden, wodurch sich diese von der Gruppe der chronischen Pankreatitiden und der gesunden Kontrollen abhob. Alle 9 Pankreaskarzinome zeigten – verglichen mit den chronischen Pankreatitiden und den gesunden Kontrollen – eine Überexpression von miR-196a (*Abbildung 20*). Die Überexpression von miR-196a im Pankreaskarzinom imponierte am deutlichsten im direkten Vergleich mit der miR-196a-Expression gesunder Kontrollen: Die Pankreaskarzinome wiesen gegenüber den gesunden Kontrollen eine 6,6- bis 769,4-fach höhere miR-196a-Expression auf und unterschieden sich damit signifikant vom gesunden Pankreasgewebe ($p = 0,009$). Auch gegenüber den

chronischen Pankreatitiden ließ sich beim PDAC eine 1,6- bis 576,1-fach höhere miR-196a-Expression beobachten ($p = 0,001$). Ein signifikanter Unterschied der miR-196a-Expression konnte, wie schon zuvor für miR-21*, auch zwischen PDAC und azinären Kontrollen nachgewiesen werden ($p = 0,018$). Im Gegensatz hierzu stellte sich zwischen den gesunden Duktus- und Azinuszellen jedoch kein Unterschied in der miR-196a-Expression dar ($p = 0,400$). In Zusammenschau dieser Ergebnisse wird deutlich, dass sich die miR-196a-Expression des duktales Adenokarzinoms des Pankreas deutlich von den übrigen untersuchten Pankreasgewebe (Chronische Pankreatitis, gesundes Pankreas, Azinuszellen) abgrenzt.

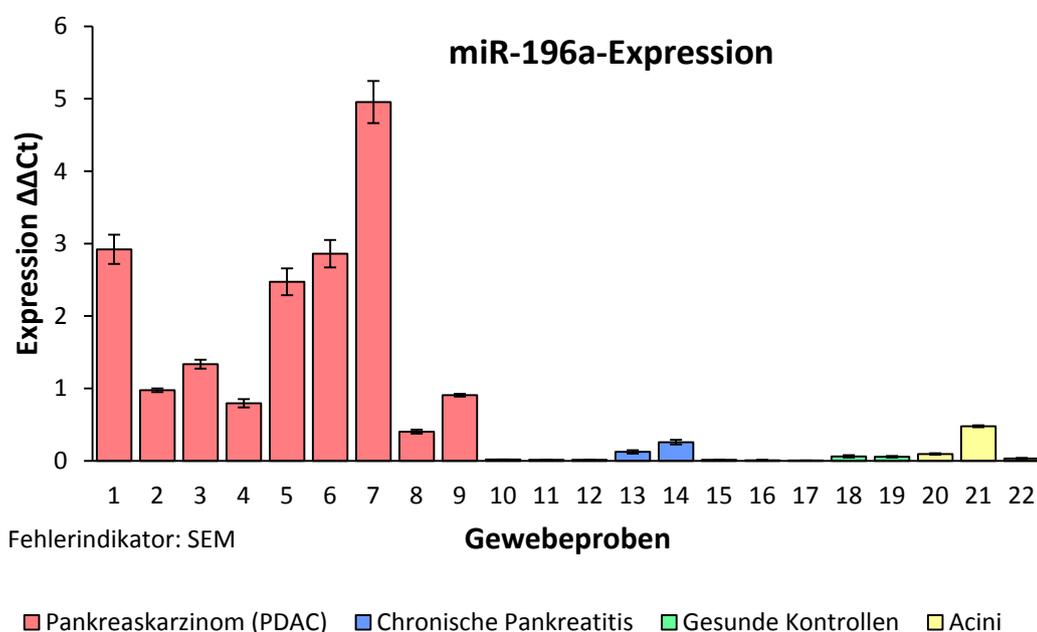


Abbildung 20: Expression von miR-196a untergliedert nach den jeweiligen Untersuchungsgruppen

miR-196a stellte sich in allen 9 Pankreaskarzinomen als überexprimiert dar. Gegenüber der chronischen Pankreatitis zeigte das PDAC eine bis zu 576-fach höhere miR-196a-Expression; gegenüber den gesunden duktales Epithelien lag sogar eine bis zu 769-fach höhere miR-196a-Expression im PDAC vor. Auch im Vergleich zu den azinären Kontrollen konnte bei den Pankreaskarzinomen eine 0,8- bis 153-fache Überexpression nachgewiesen werden.

Zusammengefasst stellt miR-196a die einzige MicroRNA dar, für die eine signifikante Überexpression in den hier untersuchten Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden konnte. Die MicroRNAs miR-21* und miR-155, welche, wie auch miR-196a, zu den onkogenen MicroRNAs des Pankreaskarzinoms gezählt werden, zeigten hingegen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den jeweiligen Untersuchungsgruppen (Tabelle 17).

Tabelle 17: Gewebsspezifische Unterschiede in der MicroRNA-Expression des Pankreas

MicroRNA:	Parameter:	Signifikanz:	Unterschied:	miR-Expression des PDAC:
miR-21*	PDAC vs. chron. Pankreatitis	p = 0,091	Nein	↔
	PDAC vs. gesunde Kontrollen	p = 0,209	Nein	↔
	PDAC vs. Acini	p = 0,036	Ja	↑
miR-155	PDAC vs. chron. Pankreatitis	p = 0,174	Nein	↔
	PDAC vs. gesunde Kontrollen	p = 0,373	Nein	↔
	PDAC vs. Acini	p = 0,482	Nein	↔
miR-196a	PDAC vs. chron. Pankreatitis	p = 0,001	Ja	↑
	PDAC vs. gesunde Kontrollen	p = 0,009	Ja	↑
	PDAC vs. Acini	p = 0,018	Ja	↑

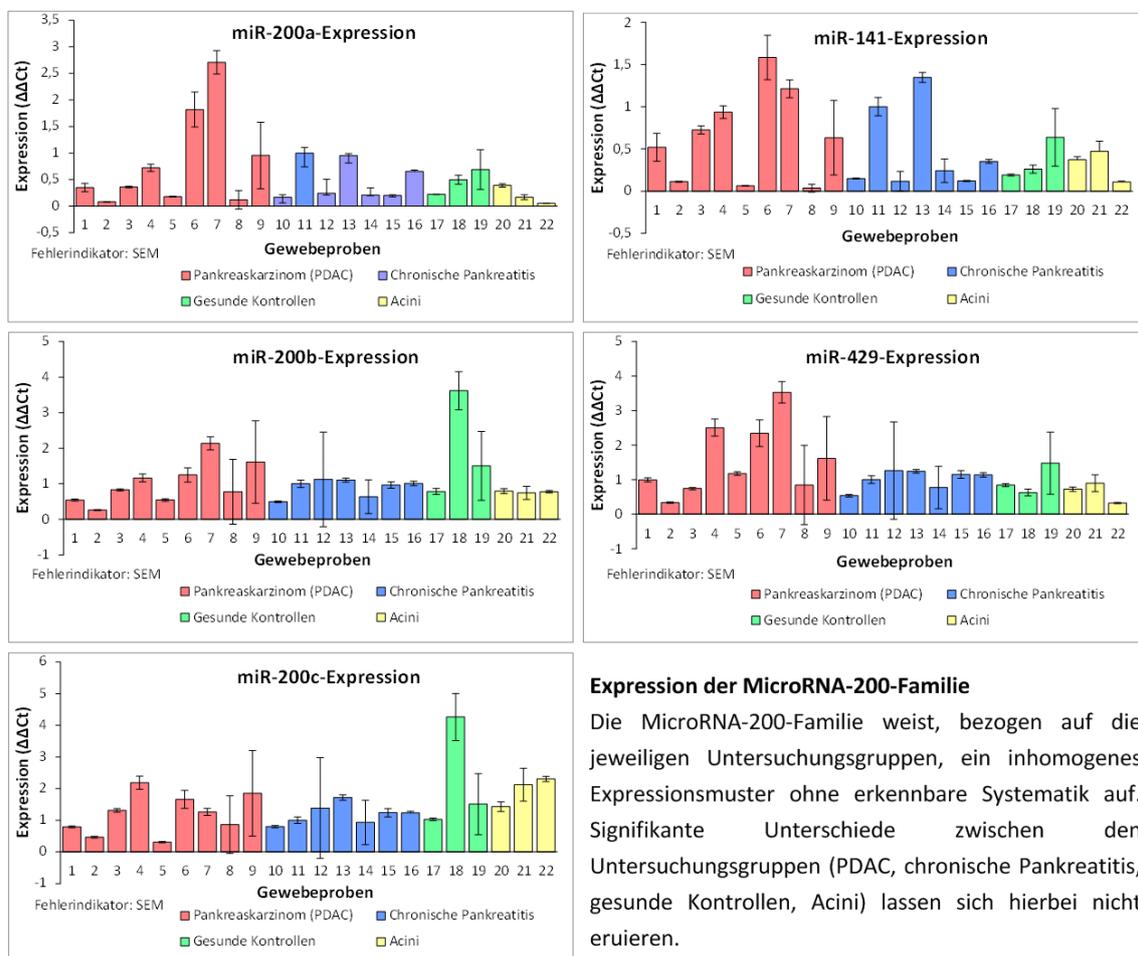
5.2.3 Die Expression der MicroRNA-200-Familie

Die MicroRNA-200-Familie umfasst die MicroRNAs miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c sowie miR-429. Sämtliche Mitglieder der MicroRNA-200-Familie wurden in dieser Studie untersucht.

Für die MicroRNA-200-Familie mit ihren einzelnen Vertretern konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis, gesunden duktalem Kontrollen sowie azinärem Gewebe nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein inhomogenes Expressionsmuster, welches teilweise durch erhebliche Schwankungen innerhalb der jeweiligen Untersuchungsgruppe gekennzeichnet war (Abbildung 21). Die geringsten Unterschiede in der Expression ergaben sich hierbei im Vergleich Pankreaskarzinom zu chronischer Pankreatitis: miR-141 (p = 0,918), miR-200a (p = 0,837), miR-200b (p = 0,837), miR-200c (p = 1,000) und miR-429 (p = 0,536) differierten äußerst gering zwischen den beiden

Gewebeformen. Auch zwischen den Pankreaskarzinomen und den gesunden Kontrollen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von miR-141 ($p = 0,727$), miR-200a ($p = 1,000$), miR-200b ($p = 0,282$), miR-200c ($p = 373$) und miR-429 ($p = 0,373$) beobachtet werden. Gleiches gilt für die azinären Gewebe, die sich bezüglich der MicroRNA-Expression sowohl gegenüber den Pankreaskarzinomen, als auch gegenüber den gesunden Duktusepithelien nicht wesentlich unterscheiden.

Abbildung 21: Überblick über die Expression der MicroRNA-200-Familie



Alles in allem konnte für die MicroRNA-200-Familie weder eine generelle Über- noch eine Minderepression in Pankreaskarzinomen festgestellt werden. Signifikante Expressionsunterschiede bestanden nur zwischen den jeweiligen Proben, nicht aber

zwischen den 4 Untersuchungsgruppen (PDAC, chronische Pankreatitis, gesunde Kontrollen, Acini).

5.2.4 Zusammenhänge der MicroRNA-Expression

Die für miR-21, miR-155 und miR-196a ermittelten Expressionswerte korrelierten nur geringfügig miteinander. Zwischen den 3 onkogenen MicroRNAs konnten zwar positive Zusammenhänge nachgewiesen werden, jedoch stellten sich diese marginal dar (*Tabelle 18*). Eine gleichgerichtete Expression, geschweige denn eine gleichartige Funktion kann damit für miR-21, miR-155 und miR-196a nicht sicher herausgestellt werden.

Tabelle 18: Zusammenhänge zwischen miR-21, miR-155 und miR-196a

Zusammenhängende MicroRNAs:		Korrelation:	Signifikanz:	Zusammenhang zwischen der Expression zweier MicroRNAs:
miR-21	miR-155	r = 0,359	p = 0,101	Kein Zusammenhang
miR-21	miR-196a	r = 0,499	p = 0,018	Schwacher Zusammenhang
miR-155	miR-196a	r = 0,471	p = 0,027	Schwacher Zusammenhang

Bei der MicroRNA-200-Familie fielen hingegen die Zusammenhänge in der Expression der einzelnen Mitglieder – miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429 – deutlicher aus: Zwischen nahezu allen Vertretern der MicroRNA-200-Familie bestand ein positiver Zusammenhang, der teils auf mittelgradigem, teils auf höhergradigem Niveau rangierte (*Tabelle 19*). Die verstärkte Expression einer, zur MicroRNA-200-Familie gehörender, MicroRNA ging somit in der Regel auch mit einer stärkeren Expression der übrigen Vertreter der MicroRNA-200-Familie einher. Somit lag überwiegend eine gleichgerichtete Expression der Mitglieder der MicroRNA-200-Familie vor.

Tabelle 19: Korrelationen der MicroRNA-200-Expression

Zusammenhängende MicroRNAs:		Korrelation:	Signifikanz:	Zusammenhang zwischen der Expression zweier MicroRNAs:
miR-141	miR-200a	r = 0,864	p = 0,001	Starker Zusammenhang
miR-141	miR-200b	r = 0,571	p = 0,006	Mittelgradiger Zusammenhang
miR-141	miR-200c	r = 0,397	p = 0,067	Kein Zusammenhang
miR-141	miR-429	r = 0,544	p = 0,009	Mittelgradiger Zusammenhang
miR-200a	miR-200b	r = 0,791	p = 0,001	Starker Zusammenhang
miR-200a	miR-200c	r = 0,339	p = 0,122	Kein Zusammenhang
miR-200a	miR-429	r = 0,689	p = 0,001	Mittelgradiger Zusammenhang
miR-200b	miR-200c	r = 0,669	p = 0,001	Mittelgradiger Zusammenhang
miR-200b	miR-429	r = 0,624	p = 0,002	Mittelgradiger Zusammenhang
miR-200c	miR-429	r = 0,197	p = 0,379	Kein Zusammenhang

Zwischen den onkogenen MicroRNAs miR-21*, miR-155 und miR-196a auf der einen Seite und der eher tumorsupprimierend agierenden MicroRNA-200-Familie auf der anderen Seite, konnten keine relevanten Korrelationen beobachtet werden. Zwar stellte sich zwischen miR-21* und miR-141 ein positiver und signifikanter Zusammenhang dar, der jedoch nur gering ausgeprägt war und dem somit keine größere Bedeutung beigemessen wurde.

5.3 Das diagnostische Potential der untersuchten MicroRNAs

5.3.1 Diagnostisches Potential von miR-21*, miR-155 und miR-196a

Vorangehend wurde dargestellt, dass einzig für die MicroRNA miR-196a eine Überexpression im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) nachgewiesen werden konnte. Für miR-21* und miR-155 konnten hingegen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis und

gesundem Pankreas beobachtet werden. Diese Ergebnisse spiegeln sich größtenteils auch im diagnostischen Potential der einzelnen MicroRNAs wieder (*Abbildung 22*): Während für miR-196a in Bezug auf die Erkennung des Pankreaskarzinoms deutlich ein diagnostischer Nutzen herausgestellt werden konnte, fiel das diagnostische Potential von miR-21 deutlich geringer aus. Für miR-155 zeigte sich im Hinblick auf die Identifikation des Pankreaskarzinoms hingegen kein signifikantes diagnostisches Potential.

Mit einem Areal von 0,991 unter der ROC-Kurve ($p = 0,001$) ergab sich für die MicroRNA miR-196a das größte diagnostische Potential aller hier untersuchten MicroRNAs. Ansteigende Expressionswerte resultierten hierbei in einer größeren Spezifität von miR-196a im Hinblick auf die Identifikation des Pankreaskarzinoms. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch bei diskret erhöhten Expressionswerten ($\geq 0,63617 \Delta\Delta Ct$) ein Nachweis des Pankreaskarzinoms mit hoher Sensitivität und hoher Spezifität möglich ist.

Auch die MicroRNA miR-21* bewies diagnostische Leistungsfähigkeit; allerdings muss der diagnostische Nutzen bei einer Fläche von 0,803 unter der ROC-Kurve ($p = 0,018$) deutlich geringer eingeschätzt werden, als für miR-196a. Eine sichere Zuordnung des Pankreaskarzinoms war lediglich bei sehr ausgeprägter miR-21-Expression möglich. Dementsprechend muss die Sensitivität von miR-21* als relativ gering eingestuft werden. Dies wiederum spricht gegen einen alleinigen Einsatz von miR-21* als PDAC-Tumormarker, wobei miR-21* jedoch zugestanden werden muss, dass diese in Kombination mit anderen MicroRNAs womöglich einen deutlich größeren diagnostischen Wert aufweisen könnte.

Die MicroRNA-155 erwies sich als insuffizient gegenüber der PDAC-Diagnostik. Mit einem Areal von 0,701 unter der ROC-Kurve wies miR-155 die schlechtesten Werte für Sensitivität und Spezifität der hier untersuchten onkogenen MicroRNAs auf. Zudem stellte sich die ROC-Analyse von miR-155 als nicht signifikant dar ($p = 0,117$).

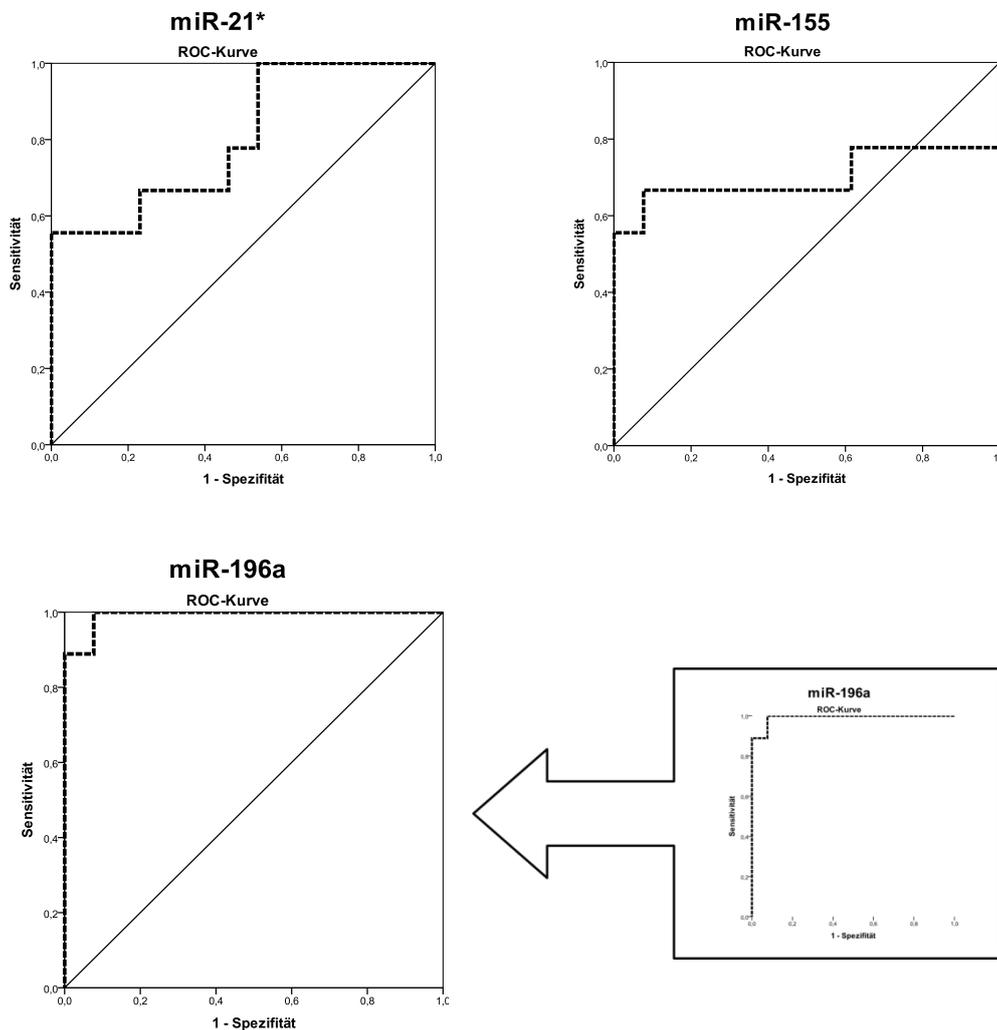


Abbildung 22: ROC-Kurven der MicroRNAs miR-21*, miR-155 und miR-196a

Graphische Darstellung der diagnostischen Leistungsfähigkeit der MicroRNAs miR-21*, miR-155 und miR-196a in Bezug auf die Identifikation des Pankreaskarzinoms. Hierbei imponierte für miR-196a das größte diagnostische Potential (AUC = 0,991), gefolgt von miR-21 (AUC = 0,803) und miR-155 (AUC = 0,701).

Konkludierend konnte für die MicroRNA miR-196a das ausgewogenste Verhältnis von Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden. Schon für gering erhöhte Expressionswerte scheint eine sensitive und spezifische Erkennung des Pankreaskarzinoms durch miR-196a möglich zu sein. miR-21* und miR-155 sind zwar ebenfalls in der Lage, Pankreaskarzinome anhand ihres Expressionsmusters

nachzuweisen, jedoch sind hier deutlich höhere Expressionswerte notwendig. Dies wiederum geht zu Lasten der Sensitivität. Generell zeigte sich, dass hohe Expressionswerte für miR-21*, miR-155 und miR-196a auf das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms hindeuten.

5.3.2 Diagnostisches Potential der MicroRNA-200-Familie

Die sich aus miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429 zusammensetzende MicroRNA-200-Familie wies keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Pankreaskarzinomen, den chronischen Pankreatitiden und den gesunden Pankreata auf. Dementsprechend konnte der MicroRNA-200-Familie auch kein diagnostisches Potential hinsichtlich der Erkennung des Pankreaskarzinoms bescheinigt werden.

Eine signifikante diagnostische Leistungsfähigkeit konnte für keines der 5 Mitglieder der MicroRNA-200-Familie ermittelt werden. Jedoch kann auch ohne das Vorliegen signifikanter Ergebnisse von einer eher geringen Sensitivität und Spezifität der MicroRNA-200-Familie im Hinblick auf die Diagnostik des Pankreaskarzinoms ausgegangen werden: Die MicroRNAs miR-141 (AUC = 0,581; p = 0,526), miR-200a (AUC = 0,581; p = 0,526), miR-200b (AUC = 0,487; p = 0,920), miR-200c (AUC = 0,368; p = 0,301) und miR-429 (AUC = 0,684; p = 0,151) zeigten im Rahmen der ROC-Analyse deutlich geringere Flächen unterhalb der Kurven, als die als onkogen einzustufenden MicroRNAs miR-21*, miR-155 und miR-196a (*Abbildung 23*).

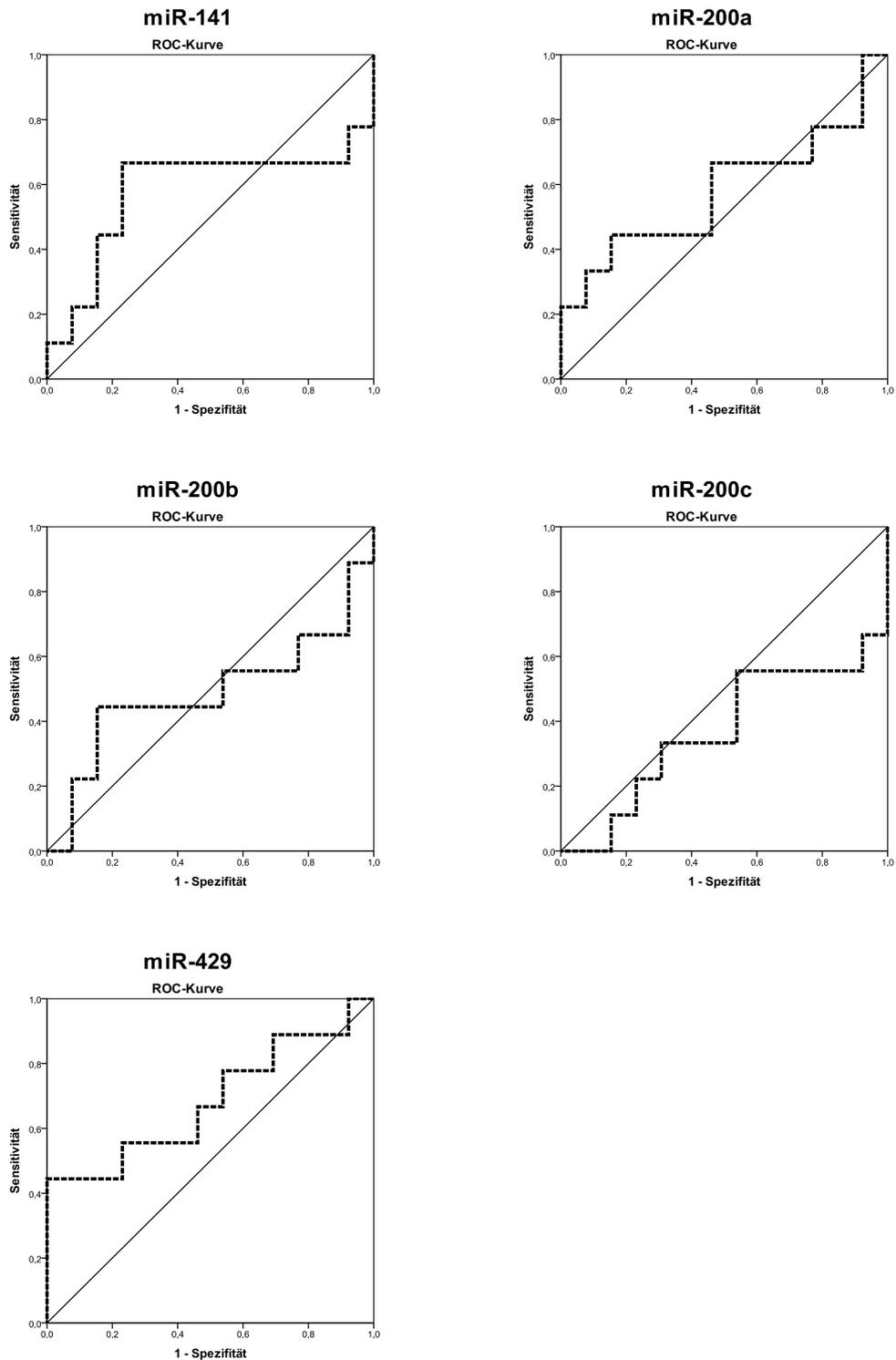


Abbildung 23: ROC-Kurven der MicroRNA-200 Familie

Von den ROC-Kurven abzulesen ist die unzureichende Sensitivität und Spezifität der einzelnen Mitglieder der MicroRNA-200-Familie in Bezug auf die Identifikation des Pankreaskarzinoms.

5.4. Das prognostische Potential der untersuchten MicroRNAs

Um das prognostische Potential der 8 untersuchten MicroRNAs zu illuminieren, wurde sowohl der Einfluss der MicroRNA-Expression auf das rezidivfreie Überleben, als auch auf das Gesamtüberleben untersucht. Hierzu wurden Rangkorrelationsanalysen nach Spearman sowie Cox-Regressionsanalysen durchgeführt. Die hierbei ermittelten Ergebnisse sollen im Nachfolgenden nähergehend dargestellt werden:

5.4.1 Einfluss der MicroRNA-Expression auf die Rezidivfreiheit

Bei allen acht untersuchten MicroRNAs konnte im Rahmen einer Korrelationsanalyse nach Spearman kein Zusammenhang zwischen den in dieser Studie untersuchten MicroRNAs und der rezidivfreien Zeit nachgewiesen werden.

Äquivalente Ergebnisse lieferten die durchgeführten Cox-Regressionsanalysen: Auch hier konnte ein Nachweis über den Einfluss der MicroRNA-Expression auf das rezidivfreie Überleben nicht erbracht werden. Unter der Annahme, dass die hierbei fehlende Signifikanz in erster Linie der geringen Fallzahl geschuldet ist, lassen sich jedoch – vorbehaltlich der Signifikanz – folgende Tendenzen formulieren: Mit einer Hazard Ratio > 1 , die für miR-21*, miR-155 und miR-196a, ermittelt wurde, lassen sich diese als potentielle Risikofaktoren für PDAC-Rezidive einordnen (*Tabelle 20*). Die MicroRNA-200-Familie zeichnete, gleichwohl sich hier auch kein signifikanter Einfluss beobachten ließ, ein tendenziell eher differentes Bild: Während miR-141, miR-200c sowie miR-429 Hazard-Ratios > 1 aufwiesen, was auf eine Erhöhung des Rezidivrisikos hindeutet, zeigten miR-200a und miR-200b Hazard-Ratios von deutlich unter 1 (*Tabelle 21*). Dies kann – sofern sich bei höherer Fallzahl Signifikanzen einstellen sollten – auf einen protektiven Charakter von miR-200a und miR-200b bezüglich der Rezidivneigung des Pankreaskarzinoms hinweisen. Es muss an dieser Stelle jedoch nochmals darauf verwiesen werden, dass angesichts der fehlenden Signifikanz ein Einfluss der MicroRNAs auf die rezidivfreie Zeit in dieser Studie nicht beobachtet werden konnte und sich allenfalls nur Vermutungen hierüber aufstellen lassen.

Tabelle 20: Cox-Regressionsanalyse von miR-21*, miR-155 und miR-196a in Bezug auf die Rezidivfreiheit

Abhängige Variable:	Endpunkt:	Unabhängige Variable:	Hazard-Ratio:	Signifikanz:
Rezidivfreie Zeit in Monaten	Rezidiv	miR-21*	1,275	p = 0,543
Rezidivfreie Zeit in Monaten	Rezidiv	miR-155	1,153	p = 0,588
Rezidivfreie Zeit in Monaten	Rezidiv	miR-196a	1,154	p = 0,686

Tabelle 21: Cox-Regressionsanalyse der MicroRNA-200-Familie in Bezug auf die Rezidivfreiheit

Abhängige Variable:	Endpunkt:	Unabhängige Variable:	Hazard-Ratio:	Signifikanz:
Rezidivfreie Zeit in Monaten	Rezidiv	miR-141	3,369	p = 0,853
Rezidivfreie Zeit in Monaten	Rezidiv	miR-200a	0,325	p = 0,869
Rezidivfreie Zeit in Monaten	Rezidiv	miR-200b	0,347	p = 0,862
Rezidivfreie Zeit in Monaten	Rezidiv	miR-200c	2,134	p = 0,885
Rezidivfreie Zeit in Monaten	Rezidiv	miR-429	4,169	p = 0,504

5.4.2 Einfluss der MicroRNA-Expression auf die Überlebenszeit

Um einen möglichen Einfluss der MicroRNA-Expression auf die Überlebenszeit nachzuweisen, wurden beide Parameter zunächst einer Korrelationsanalyse nach Spearman und nachfolgend einer Cox-Regressionsanalyse unterzogen. Bei den MicroRNAs miR-21*, miR-155 und miR-196a wurden zusätzlich Unterteilungen vorgenommen, so dass die hieraus resultierenden Gruppen anhand von Kaplan-Meier-Kurven und des Log-rank-Tests weitergehend untersucht werden konnten.

Die Korrelationsanalyse nach Spearman konnte für die 8 untersuchten MicroRNAs keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der jeweiligen Expression und der Überlebenszeit ermitteln.

Aus den Ergebnissen der Cox-Regressionsanalyse konnte ein signifikanter Einfluss der MicroRNA-Expression auf die Überlebenszeit ebenfalls nicht entnommen werden (Tabellen 22 und 23).

Tabelle 22: Cox-Regressionsanalyse von miR-21*, miR-155 und miR-196a in Bezug auf die Überlebenszeit

Abhängige Variable:	Endpunkt:	Unabhängige Variable:	Hazard-Ratio:	Signifikanz:
Überlebenszeit in Monaten	Tod durch PDAC	miR-21*	0,955	p = 0,892
Überlebenszeit in Monaten	Tod durch PDAC	miR-155	1,181	p = 0,432
Überlebenszeit in Monaten	Tod durch PDAC	miR-196a	0,838	p = 0,597

Tabelle 23: Cox-Regressionsanalyse der MicroRNA-200-Familie in Bezug auf die Überlebenszeit

Abhängige Variable:	Endpunkt:	Unabhängige Variable:	Hazard-Ratio:	Signifikanz:
Überlebenszeit in Monaten	Tod durch PDAC	miR-141	0,164	p = 0,690
Überlebenszeit in Monaten	Tod durch PDAC	miR-200a	0,863	p = 0,974
Überlebenszeit in Monaten	Tod durch PDAC	miR-200b	0,271	p = 0,760
Überlebenszeit in Monaten	Tod durch PDAC	miR-200c	6,664	p = 0,555
Überlebenszeit in Monaten	Tod durch PDAC	miR-429	3,527	p = 0,363

Nachdem die Auswirkung der MicroRNA-Expression auf das Überleben bereits in einer Korrelationsanalyse nach Spearman und in einer Cox-Regressionsanalyse untersucht wurde, erfolgte im Rahmen von Kaplan-Meier-Kurven die graphische Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit von der MicroRNA-Expression. Hierzu wurde, ausgehend von den einzelnen Expressionswerten, eine Unterteilung in eine Gruppe der hohen Expression und in eine Gruppe der niedrigen Expression vorgenommen. Beide Gruppen

wurden anschließend mithilfe eines Log-Rank-Tests in Bezug auf das Überleben miteinander verglichen.

Für die MicroRNA miR-21* wurden die Proben, die eine Expression über dem 5fachen des Expressionsmaximums der gesunden Kontrolle aufwiesen, zu einer Gruppe der hohen Expression zusammengefasst. Umgekehrt beinhaltete die Gruppe der niedrigen Expression solche Proben, die durch eine MicroRNA-Expression unterhalb der 5fachen Expression der gesunden Kontrollen gekennzeichnet waren. Beide Gruppen wurden schließlich hinsichtlich des Überlebens untersucht und graphisch in Form von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt (Abbildung 24).

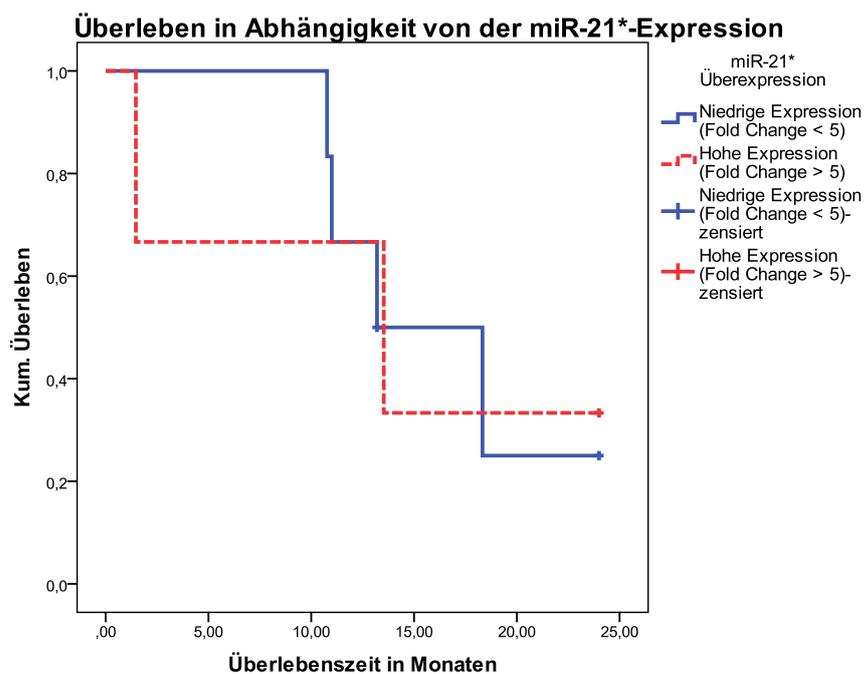


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der miR-21*-Expression

Dargestellt sind die Überlebenszeiten, die für die Gruppe der hohen miR-21*-Expression (> 5fache Überexpression) und für die Gruppe der niedrigen miR-21*-Expression (< 5fache Überexpression) ermittelt wurden. Es zeigt sich, dass das Gesamtüberleben, welches über einen Zeitraum von 24 Monaten erfasst wurde, bei beiden Gruppen annähernd gleich ist.

In Einklang mit den eingangs genannten Analysen konnte auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden ($p = 0,975$). Somit kann ein Einfluss der miR-21*-Expression auf die Überlebenszeit auch unter Hinzuziehung der Kaplan-Meier-Methode nicht ausgemacht werden.

In gleicher Weise wurde bei der MicroRNA miR-155 verfahren. Auch hier erfolgte eine Unterteilung in eine Gruppe der hohen Expression (> 5 fache Überexpression im Vergleich zu den gesunden Kontrollen) und in eine Gruppe der niedrigen Expression (< 5 fache Überexpression im Vergleich zu den gesunden Kontrollen). Auch hier erbrachte ein Vergleich beider Gruppen keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,338$). Neben der Korrelationsanalyse nach Spearman und der Regressionsanalyse nach Cox konnte nun auch die Kaplan-Meier-Analyse keinen Zusammenhang zwischen der miR-155-Expression und dem Überleben nachweisen (*Abbildung 25*).

Die MicroRNA miR-196a lag in allen 9 PDAC-Proben – verglichen mit den gesunden Kontrollen – deutlich überexprimiert vor. Aus diesem Grund wurde für die Gruppe der hohen Expression eine Überexpression um mehr als das 25fache, bezogen auf das Expressionsmaximum der gesunden Kontrollen, definiert. Äquivalent hierzu wurden die Proben, die eine geringere Expression als das 25fache der Kontrollexpression aufwiesen, der Gruppe der niedrigen miR-196a-Expression zugeordnet. Trotz der großen Expressionsunterschiede konnte zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Überlebens ermittelt werden (*Abbildung 26*). Die Daten suggerierten hierbei, dass eine hochgradige miR-196a-Überexpression mit dem gleichen Überleben einhergeht, wie eine mindergradige miR-196a-Überexpression. Damit stellt sich auch in der Kaplan-Meier-Analyse ein Zusammenhang zwischen der miR-196a-Expression und dem Überleben nicht dar.

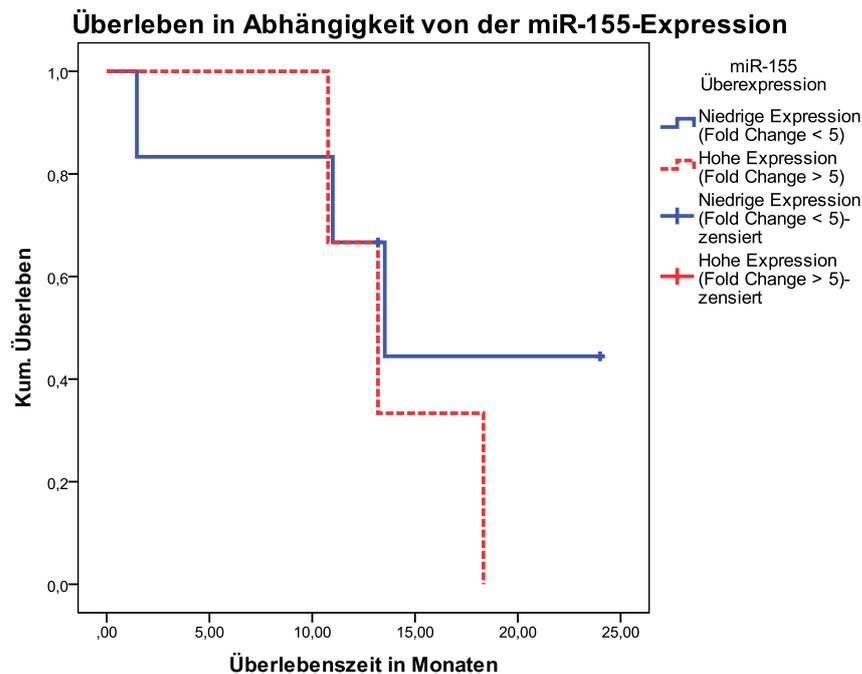


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurven der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der miR-155-Expression

Dargestellt sind die Kaplan-Meier-Kurven des Überlebens aufgeschlüsselt nach hoher (> 5 fache Überexpression im Vergleich zu den gesunden Kontrollen) und nach niedriger Expression (< 5 fache Überexpression in Relation zu den gesunden Kontrollen). Auch hier lassen sich keine signifikanten Unterschiede im Kurvenverlauf nachweisen, wenn auch das Gesamtüberleben bei einer hohen Expression von miR-155 reduziert erscheint.

Da für die gesamte MicroRNA-200-Familie keine deutliche Überexpression (> 5 fach) in direktem Vergleich zu den gesunden Kontrollen bestimmt werden konnte, wurde hier auf eine Kaplan-Meier-Analyse mit Unterteilung der Proben in eine hoch- und niedrigexpressive Gruppe verzichtet. Wie bereits beschrieben fanden sich sowohl in der Korrelationsanalyse, als auch in der Cox-Regressionsanalyse keine Hinweise darauf, dass die Expression der einzelnen miR-200-Familienmitglieder in Zusammenhang mit dem Überleben steht. Zu einem gleichen Ergebnis würde vermutlich auch eine nachfolgende Kaplan-Meier-Analyse kommen, auf die jedoch mangels sinnvoller Unterteilungskriterien verzichtet wurde.

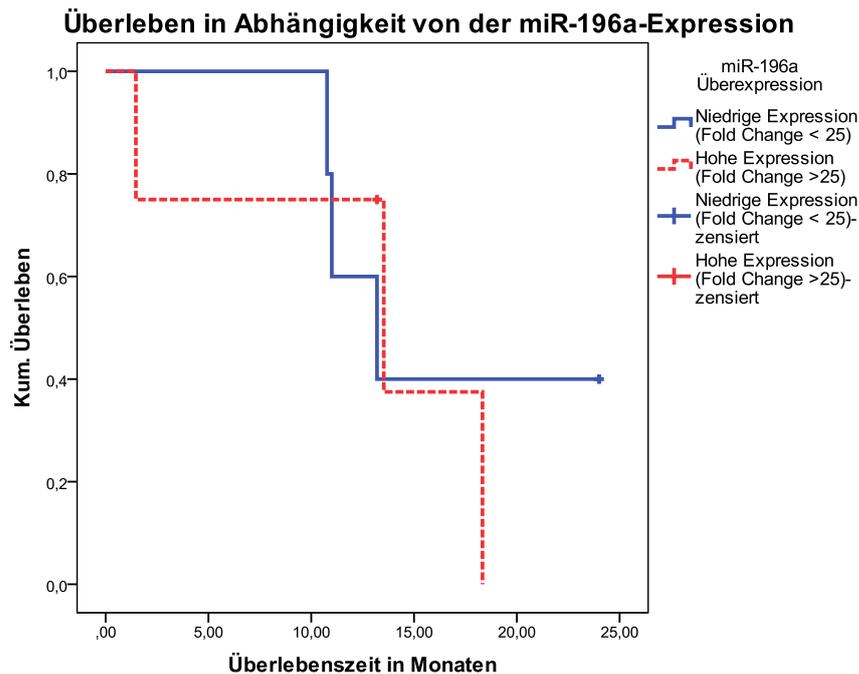


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurven der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der miR-196a-Expression

Im Diagramm sind die Kaplan-Meier-Kurven der Überlebenszeit bezogen auf die miR-196a-Expression dargestellt. Zwischen hoher (Überexpression > 25fach im Vergleich zu den gesunden Kontrollen) und niedriger Überexpression (< 25fach in Relation zu den gesunden Kontrollen) existierte hierbei kein signifikanter Unterschied. Ausgehend von den differierenden Endpunkten beider Kurven kann jedoch die Vermutung geäußert werden, dass eine hohe miR-196a-Expression tendenziell mit einem reduzierten Überleben assoziiert ist.

In Zusammenschau der hier vorliegenden Daten kann ein prognostisches Potential der untersuchten MicroRNAs – miR-21*, miR-155, miR-196a, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429 – in dieser Studie nicht ausgemacht werden.

6 Diskussion

Das Pankreaskarzinom weist auch noch im 21. Jahrhundert eine sehr schlechte Prognose auf. Nahezu 75% aller Betroffenen sterben innerhalb eines Jahres und nur 4% weisen eine Überlebenszeit auf, die über einen Zeitraum von 5 Jahren nach Diagnosestellung hinausgeht [71]. Ursächlich für die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms ist hierbei in erster Linie die späte Primärdiagnose, die zumeist zu einem Zeitpunkt erfolgt, bei dem das Malignom schon weit fortgeschritten ist und oft schon nodale oder sogar organische Metastasen gesetzt hat. So gelten nur 15 -20% aller Patienten als potentiell resektabel und können einer kurativen Behandlung zugeführt werden [251]. Die realen Zahlen zeichnen allerdings ein noch düsteres Bild: Lediglich 38% aller potentiell resektablen Patienten wird das Angebot einer kurativen Operation unterbreitet [248] und nur 3% der gesamten PDAC-Patienten unterziehen sich tatsächlich einer in kurativer Intention erfolgenden Resektion [97]. Eine sichere Identifikation resektabler Tumoren muss also der Anspruch an zukünftige Diagnostika des Pankreaskarzinoms sein. Augenblicklich liegt hier jedoch genau die Schwierigkeit: Pankreaskarzinome mit einer Größe > 30 mm können zwar in bildgebenden Verfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden, sind aber in den seltensten Fällen resektabel. Umgekehrt sind Karzinome, mit einer Größe < 20 mm zumeist in kurativer Hinsicht operabel, entgehen jedoch oftmals der bildgebenden Diagnostik [236]. Ist radiologisch oder endoskopisch erst einmal eine verdächtige Läsion gefunden, so stellt sich unweigerlich die Frage, ob diese einem Pankreaskarzinom entspricht. Aber auch hier ist eine Abgrenzung zwischen benignen und malignen Läsionen des Pankreas oftmals nur sehr schwer vorzunehmen und führt nicht selten zu falschen Resultaten [30, 240].

Um die bisherige, auf klinischen und bildgebenden Verfahren ausgerichtete Diagnostik des Pankreaskarzinoms zu ergänzen, rücken verstärkt Biomarker in den Mittelpunkt der PDAC-Forschung. CA 19-9 ist der derzeit einzige, regelhaft verwendete Biomarker des Pankreaskarzinoms. Sich durch gute Sensitivität und Spezifität auszeichnend, geht CA 19-9 jedoch in erheblichen Maße mit falsch-negativen (Abwesenheit der Lewis-

Antigene) oder falsch positiven (Obstruktionsikterus, Leberzirrhose, akute und chronische Pankreatitis, andere gastrointestinale Karzinome) Ergebnissen einher [15, 22, 171, 230]. Weitere Biomarker wurden bereits zuhauf identifiziert: Genetische Biomarker, wie K-ras, TP53, MDF1 und ZNF415 [22], proteomische Biomarker, darunter das Heat shock protein 70 [52] und Plectin-1 [223], sowie zirkulierende Tumorzellen [111]. Breit gefächert sind auch die möglichen Quellen der Biomarkeranalyse: Diese scheint aus Biopsaten, Pankreassaft, Serum/Plasma, Speichel und Stuhl möglich zu sein [22, 112]. Allen neueren Biomarkern gemein ist jedoch die fragliche Tauglichkeit hinsichtlich des klinischen Einsatzes. Ein von Biomarkern ausgehendes Screening zum frühzeitigen Nachweis des Pankreaskarzinoms ist bisher nicht verfügbar.

Eine herausragende Stellung unter allen derzeit untersuchten Biomarkern nehmen MicroRNAs ein: Anders als viele Biomarker, die lediglich das Produkt malignomassoziierter zellulärer Veränderungen sind und keinen direkten Einfluss auf Entstehung und Ausbreitung des Malignoms ausüben, stellen MicroRNAs zentrale Faktoren in der Genese und Progression, aber auch in der Suppression von Tumoren dar. Dieser Umstand macht die MicroRNAs gleichermaßen interessant für die Diagnostik und Therapie von Malignomen [98, 116]. Ihrer ambivalenten Funktion als Onkogene und Tumorsuppressoren [57] geschuldet, liegen MicroRNAs in zahlreichen malignen Tumoren dereguliert vor [43, 243]. Dies trifft auch auf das duktales Adenokarzinom des Pankreas zu, bei dem mehr als 100 deregulierte MicroRNAs identifiziert werden konnten [129]. In zahlreichen Studien fanden sich hierbei Belege für einen diagnostischen [26, 50, 83, 227, 245], prognostischen [48, 100, 168, 258] und therapeutischen Nutzen [183, 234] der im Pankreaskarzinom dereguliert vorliegenden MicroRNAs. Besonders in den Fokus gegenwärtiger Untersuchungen gerückt sind die MicroRNAs miR-21, miR-155, miR-196 sowie die MicroRNA-200-Familie, die sich aus miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429 zusammensetzt. Während miR-21, miR-155 und miR-196a hierbei als onkogene MicroRNAs gelten [26], wird der MicroRNA-200-Familie eine überwiegend tumorsupprimierende Wirkung zugeschrieben [34, 258]. Gleichsam liegen jedoch auch Anhaltspunkte für eine onkogene Wirkung der MicroRNA-200-Familie vor, die jedoch auf bestimmte Prozesse

– wie der Metastasierung – beschränkt zu sein scheint [53, 187]. Die Mehrheit der Studien sieht in der MicroRNA-200-Familie jedoch einen Tumorsuppressor und damit einen möglichen Gegenspieler von miR-21, miR-155 und miR-196a [34, 75, 93, 137, 258].

Es ist bislang nicht geklärt, von welchen Zellen das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) seinen Ursprung nimmt [190]. Als mögliche Ursprungszellen sind hierbei duktales, wie auch azinäre Epithelzellen, zentroazinäre Zellen, endokrine β -Zellen der Langerhans'schen Inseln und spezielle Tumor-Stammzellen im Gespräch. Ähnlich verhält es sich mit der Frage nach dem Ursprung der MicroRNA-Deregulation. Auch hier kann derzeit nicht eindeutig beantwortet werden, ob die im Pankreaskarzinom nachgewiesene Deregulation stromaler, duktaler oder azinärer Herkunft ist und welche der deregulierten MicroRNAs spezifisch einem Zelltyp zugeordnet werden können [129]. Möglicherweise stellt die Analyse der zellspezifischen MicroRNA-Expression den Schlüssel zur Klärung des PDAC-Ursprungs dar. Die Identifikation einzelner, im Pankreaskarzinom dereguliert vorliegender MicroRNAs und die Verknüpfung selbiger mit einer bestimmten Herkunftsort könnte zudem einen unschätzbaren Fortschritt in der Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze beim Pankreaskarzinom bedeuten.

Weitere Erkenntnisse aus Grundlagen-, translationaler und angewandter Forschung sind nötig, um die molekularbiologische Bedeutung von MicroRNAs im duktales Adenokarzinom des Pankreas in ihrer ganzen Komplexität zu erfassen und hieraus einen klinischen Nutzen abzuleiten. Immer mit dem Ziel vor Augen, 80-85 % der bisher nicht resektablen Patienten Perspektiven aufzuzeigen und darzustellen, dass der Begriff „kurative Chirurgie“ auch beim Pankreaskarzinom seiner Bedeutung gerecht wird.

6.1 Diskussion der Methode

Formalin-fixierte Paraffingewebe des Pankreas – unterteilt in Pankreaskarzinomen, chronischen Pankreatitiden und gesunden Pankreata – dienen in dieser Studie als Ausgangsmaterial. Duktale Epithelien und Tumorzellen wurden mittels Laser-Mikrodissektion vom umliegenden Gewebe separiert und nachfolgend auf die MicroRNA-Expression hin untersucht. Die RNA-Extraktion erfolgte hierbei unter Nutzung des Qiagen® miRNeasy FFPE-Kit (Qiagen®, Hilden / Deutschland), die Validierung der MicroRNAs wurde im Anschluss hieran mittels quantitativer Realtime-PCR vorgenommen. Die Methodik der hier vorliegenden Untersuchung soll im Folgenden einer näheren Betrachtung unterzogen und unter Berücksichtigung des derzeitigen Wissenstandes kritisch diskutiert werden.

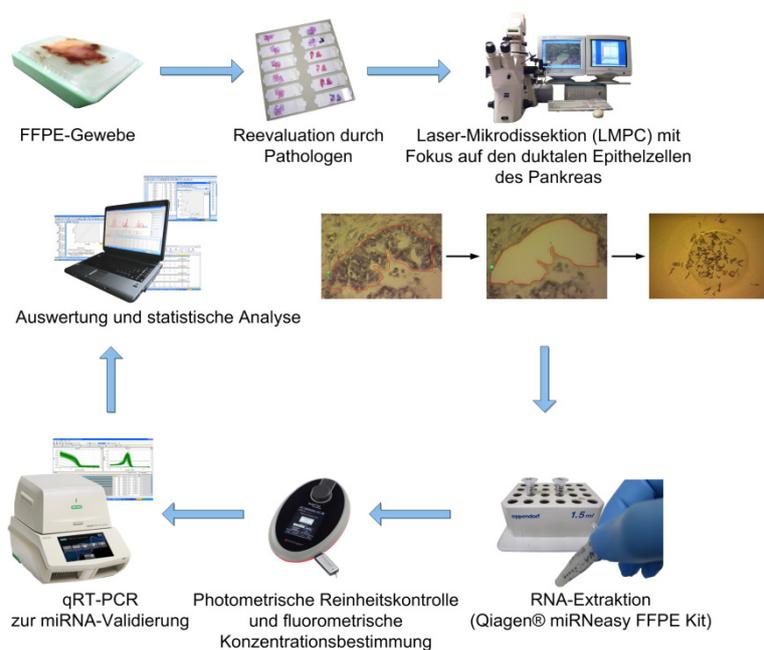


Abbildung 27: Die methodische Struktur der vorliegenden Studie

Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit der MicroRNA-Expression des Pankreaskarzinoms, der chronischen Pankreatitis und von gesundem Pankreasgewebe. Die Separierung duktalem und maligner Zellverbände wurde hierbei mittels Laser-Mikrodissektion vorgenommen, die Validierung der MicroRNA erfolgte mithilfe der qRT-PCR.

6.1.1 Formalinfixierte Paraffingewebe des Pankreas

Die Formalin-Konservierung von Geweben geht auf den deutschen Arzt F. Blum zurück. Dieser warb in einer 1893 eigens zu diesem Thema verfassten Abhandlung für die Nutzung von Formalin (Formaldehyd, Formol) als Fixiermittel von Geweben, um letztere einer nachfolgenden mikroskopischen Untersuchung zugänglich zu machen [27]. Seither bilden Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebe (FFPE) die vorherrschende Asservierungsform von Geweben in pathologischen Archiven. Die Fähigkeit zum unverfälschten Erhalt der Gewebemorphologie sowie die über Jahrzehnte dauerhaft mögliche Konservierung machen FFPE-Gewebe zum bevorzugten Ausgangsmaterial für histopathologische Begutachtungen. Obwohl FFPE-Gewebe heute aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken sind und sie in großer Anzahl für die Forschung zur Verfügung stehen, werden sie nur selten für molekularbiologische Untersuchungen genutzt [135]. Dies beruht vor allem auf dem negativen Einfluss, den das Formalin auf zelluläre Komponenten ausübt: Infolge von mehr oder weniger reversiblen Quervernetzungen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren, der Ausbildung Schiff'scher Basen sowie der Fragmentierung von Nukleinsäuren ist eine Analyse von RNA und DNA aus FFPE-Gewebe nur sehr schwer möglich [63]. *Xi et al.* [252] verwiesen in ihrer Studie daraufhin, dass die mRNA-Analyse aus FFPE-Gewebe deutliche Diskrepanzen zu derjenigen aus frisch-gefrorenem Gewebe (*fresh frozen tissue*) zeigt.

Im Gegensatz zur Desoxynukleinsäure und zu den meisten anderen Ribonukleinsäuren ist die Analyse von MicroRNAs aus Formalin-fixierten Paraffingeweben weitaus unkomplizierter: Aufgrund ihrer geringen Größe (17 - 25 nt) bleiben sie von einer FFPE-induzierten RNA-Fragmentation, die i.d.R. mit einer Bruchstückgröße > 80 bp einhergeht, weitgehend verschont [63]. Zudem werden sie durch die Proteine des assoziierten RISC-Komplexes geschützt [135]. Zahlreiche Studien – wie die von *Li et al.* [135], *Xi et al.* [252], *Siebolts et al.* [211] und *Liu et al.* [141] – belegen, dass ein Nachweis von MicroRNAs aus FFPE-Gewebe genauso zuverlässig gelingt, wie aus frisch-gefrorenem Gewebe und dass beide Ausgangsmaterialien in Bezug auf qRT-PCR-Untersuchungen mit nahezu identischen Ergebnissen aufwarten können. Die jahrelange Archivierung der FFPE-Gewebe führt hierbei nicht zu einer nennenswerten

Veränderung der MicroRNA-Zusammensetzung, so dass auch noch Jahre später retrospektive Einblicke in die molekularen Prozesse eingelagerter Gewebe möglich sind. Diesen Schluss zogen jedenfalls *Siebolts et al.* [211] aus den Daten ihrer Untersuchung zu Geweben mit einer Lagerungsdauer von unter 10 Jahren. Gleichzeitig verwiesen sie jedoch darauf, dass es bei FFPE-Geweben, die länger als 10-20 Jahre archiviert wurden, tatsächlich zu einer allmählichen MicroRNA-Reduktion kommt.

Mit der Analyse von MicroRNAs aus Formalin-fixierten Paraffingeweben öffnet sich eine molekularbiologische Schatztruhe ungeahnten Ausmaßes: Die ubiquitäre Verfügbarkeit von FFPE-Geweben ermöglicht einen schnellen Zugriff auf das gewünschte Organmaterial; zudem ist aufgrund der weltweiten Verwendung eine größtmögliche Vergleichbarkeit gegeben. Herausragendstes Merkmal einer solchen Untersuchung von FFPE-Geweben ist sicherlich die Retrospektion. Rückblickend können nun Einsichten in die biologischen Prozesse archivierter Gewebe genommen und mit dem klinischen Verlauf oder neuen Erkenntnissen abgeglichen werden.

Diesen Ansatz verfolgt auch die hier vorliegende Studie. Die Analyse von MicroRNAs aus FFPE-Geweben von Pankreaskarzinom-, Pankreatitis- und Kontrollpräparaten ist hierbei ein relativ neues Thema: Von *Bloomston et al.* [26] 2007 erstmalig praktiziert und im darauffolgenden Jahr von *Dillhoff et al.* [48] erneut durchgeführt, handelt es sich um ein mittlerweile etabliertes Vorgehen zum Vergleich der MicroRNA-Expression zwischen Pankreaskarzinom (PDAC), chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas. Dennoch sind die bisherigen Studien zur MicroRNA-Analyse aus FFPE-Pankreasgewebe immer noch überschaubar. Die Mehrzahl aller MicroRNA-Studien wird nach wie vor an Zellkulturen mit MIA-PaCa-, Capan- oder PANC-Zelllinien vorgenommen. Die Ergebnisse derartiger, auf Zellkulturen basierender, Untersuchungen lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf die humane Situation übertragen. Auch in Bezug auf archivierte Proben stehen FFPE-Gewebe in der molekulargenetischen Pankreasforschung hinter frisch-gefrorenem Gewebe zurück. Dies ist vermutlich auf die höhere RNA-Konzentration des frisch-gefrorenen Gewebes zurückzuführen, mit denen nachfolgende, konzentrationsintensive Untersuchungen einfacher zu verwirklichen sind

[72]. Die Verfügbarkeit von frisch-gefrorenem Gewebe ist jedoch stark limitiert, so dass derartige Studien zumeist nur kleine Fallzahlen umfassen und oftmals mehrere Gewebeformen (fresh frozen tissue, Zellkultur, FFPE) miteinander kombinieren.

Die hier vorliegende Arbeit nutzte zur MicroRNA-Analyse ausschließlich Formalin-fixierte Paraffingewebe des Pankreas. Damit hebt sie sich von dem Großteil aller anderen Studien ab, die Zellkulturen oder frisch-gefrorene Gewebe als Grundlagen haben.

6.1.2 Festlegung der Untersuchungsgruppen und Auswahl der Proben

Das Pankreaskarzinom ist eng mit der chronischen Pankreatitis verknüpft: Diese Verknüpfung bezieht sich zum einen auf die mögliche Entstehung des Pankreaskarzinoms aus einer vorbestehenden chronischen Pankreatitis [149], zum anderen aber auch auf differentialdiagnostische Schwierigkeiten in der Unterscheidung beider Entitäten [15, 161]. Um mehr über eine mögliche Progression von der chronischen Pankreatitis bis hin zum Pankreaskarzinom in Erfahrung zu bringen und gleichermaßen differentialdiagnostisch nutzbare Unterschiede herauszustellen, ist es nötig die MicroRNA-Expression sowohl vom Pankreaskarzinom, als auch von der chronischen Pankreatitis zu untersuchen. *Lee et al.* [129] verglichen 2007 erstmalig die MicroRNA-Expression vom duktalem Adenokarzinom mit der von chronischer Pankreatitis sowie von gesundem Pankreasgewebe. Noch im gleichen Jahr gelang es *Bloomston et al.* [26] Formalin-fixierte Paraffingewebe von Pankreaskarzinomen, chronischen Pankreatitiden und gesunden Pankreata auf MicroRNAs hin zu analysieren und die Expression aller drei Gewebeformen miteinander zu vergleichen. Seither ist die Gegenüberstellung von Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas ein gebräuchliches Versuchsmodell, um die MicroRNA-Deregulation im Pankreaskarzinom tiefergehend zu beleuchten.

Auch dieser Studie liegt ein Vergleich zwischen dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas, der chronischen Pankreatitis und dem gesunden Pankreas zugrunde. Für die

einzelnen Untersuchungsgruppen kamen jedoch nur niedrige Fallzahlen zustande (PDAC $n = 9$, CP $n = 7$ und gesunde Kontrollen $n = 3$). Diese sind in erster Linie das Resultat strikter Auswahlkriterien, mit denen eine größtmögliche Präzision dieser Studie erzielt werden sollte. Um der von einigen Autoren beschriebenen Abnahme des MicroRNA-Gehaltes infolge langer Lagerungszeiten entgegenzuwirken [211], wurden nur FFPE-Präparate mit einer Archivierungsdauer von unter 4 Jahren verwendet. Des Weiteren fanden nur solche Präparate Eingang in die Studie, die genügend Zellen epithelialen Ursprungs bzw. epithelialer Differenzierung (Tumorzellen, duktale Zellen) aufwiesen. Duktale Epithelzellen bilden, wie von *Anne Grapin-Botton* beschrieben, hierbei nur ca. 10% aller pankreatischen Zellen und besitzen lediglich einen Anteil von 4% am Gesamtvolumen des Pankreas [74]. Auch die Hyperplasie der dukталen Zellen bei chronischer Pankreatitis sowie die nahezu ungebremste Proliferation von Tumorzellen beim Pankreaskarzinom führen nicht zu einer größeren Verschiebung dieser Relation, da nun desmoplastische Gewebeanteile führend sind (*Abbildung 28*). Zudem wurden solche Präparate aus der Studie ausgeschlossen, die nicht den klassischen histomorphologischen Kriterien der jeweiligen Untersuchungsgruppe entsprachen oder darüberhinausgehende Auffälligkeiten zeigten. All diesen Faktoren ist es zuzurechnen, dass größere Fallzahlen in dieser Studie nicht verwirklicht werden konnten, woraus sich die leider nur begrenzte Aussagekraft selbiger ergibt. Dies ist allerdings nicht nur ein Phänomen der vorliegenden Arbeit: Auch andere Untersuchungen zu spezifischen pankreatischen Zellen oder Gewebestrukturen, bei denen sowohl FFPE-Gewebe, als auch die Laser-Mikrodissektion zum Einsatz kamen, weisen ähnlich niedrige Fallzahlen auf: So untersuchten *Heinmöller et al.* [87] 2003 duktale Epithelien und PanINs von insgesamt 9 Pankreatitis-Präparaten, während *Jury et al.* [107] sich 2012 auf intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien (IPMN) fokussierten und hierbei 14 FFPE-Gewebe des Pankreas verwendeten. Ähnliche Studiengrößen finden sich auch in den neueren proteomischen Analysen von *Naidoo et al.* [166] mit ebenfalls 14 FFPE-Geweben (davon 7 PDAC-Lymphknoten-Metastasen) sowie von *Takadate et al.* [228] mit 13 Pankreasgeweben. Dies unterstreicht die Komplexität von Analysen, denen Laser-mikrodissektierte FFPE-Gewebe zugrunde liegen, und erklärt, warum bis zum jetzigen Zeitpunkt nur Studien mit geringem Probenumfang publiziert wurden.

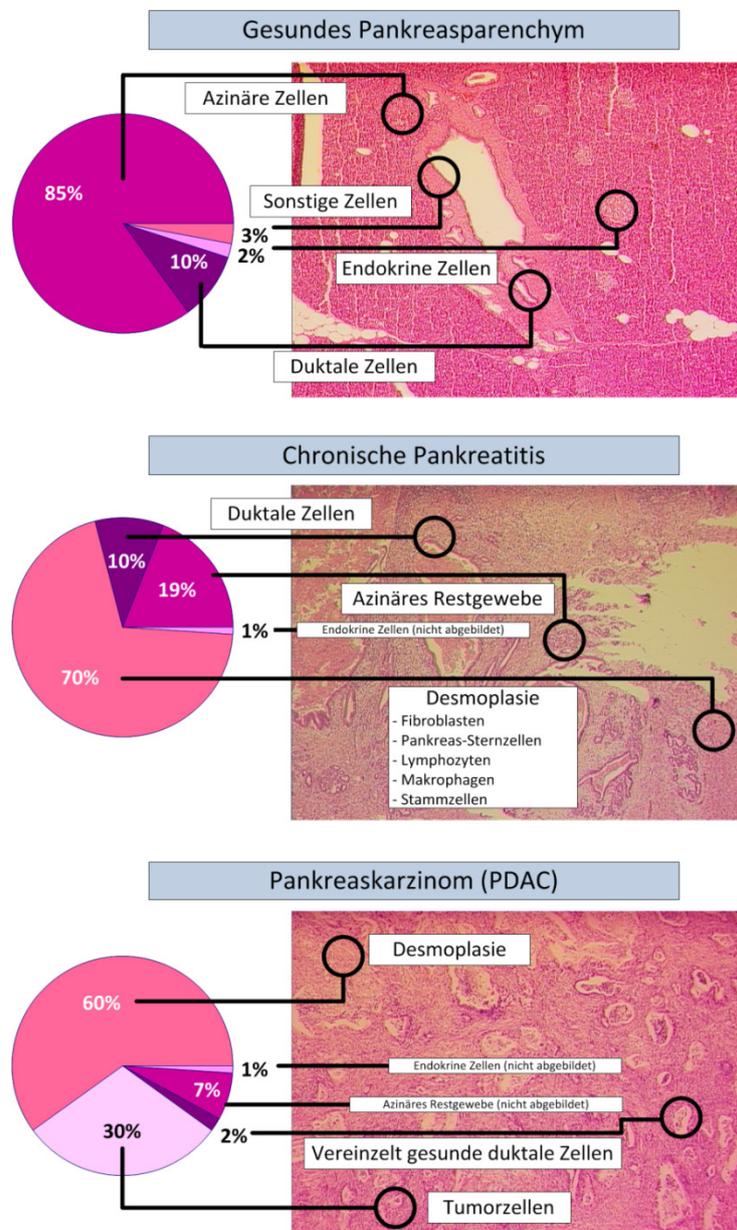


Abbildung 28: Zusammensetzung des jeweiligen Pankreasparenchyms - Gesundes Pankreas, chronische Pankreatitis und Pankreaskarzinom im Vergleich

Dargestellt sind die relativen Anteile der einzelnen Zelltypen am Gesamtgewebe des Pankreas. Die hier angegebene prozentuale Zusammensetzung orientiert sich hierbei an den in dieser Studie verwendeten FFPE-Präparaten. Sowohl beim gesunden Pankreas, als auch bei der chronischen Pankreatitis machen die dukталen Epithelien nicht mehr als 10% aller pankreatischen Zellen aus. Auch das Pankreaskarzinom ist im Vergleich zu anderen Karzinomen relativ arm an Tumorzellen: Hier setzt sich ein Großteil des Gewebes – wie auch bei der chronischen Pankreatitis – aus desmoplastischen Anteilen zusammen. All dies erschwert die spezifische Kollektivierung dukтaler Zellen bzw. von Tumorzellen.

6.1.3 Die Laser-Mikrodissektion duktaler Zellen

Mit einem Anteil von 92% aller Pankreaskarzinomen stellt das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) das häufigste Malignom der Bauchspeicheldrüse dar [28]. Ungeachtet des Namens, der eine duktale Genese des Karzinoms suggeriert, ist der tatsächliche Ursprung des Pankreaskarzinoms (PDAC) bis heute ungeklärt [221]. Der Begriff „duktales Adenokarzinom“ ist hierbei weniger auf die Ätiologie und Pathogenese des Pankreaskarzinoms zu beziehen, sondern vielmehr Ausdruck des histomorphologischen Erscheinungsbildes: So ähneln die Tumorzellen des Pankreaskarzinoms mit ihren kuboidalen Zellen und ihrer tubulären Anordnung deutlich den epithelialen Zellen der kleinen bis mittleren Pankreasgänge [74].

Die wahre zelluläre Herkunft des duktales Adenokarzinoms des Pankreas liegt aktuell jedoch noch im Verborgenen und wird seit vielen Jahren kontrovers diskutiert. Je nach Studie werden duktale Zellen, azinäre Zellen, zentroazinäre Zellen, klare Zellen, endokrinen Inselzellen, sowie neu entdeckte atypische flache Läsionen und Tumorstammzellen als Ausgangszellen des PDAC benannt. Argumente, dieser oder jener Zellform den eigentlichen Ursprung des Pankreaskarzinoms einzuräumen, gibt es dabei genug: Für eine azinäre Genese des Pankreaskarzinoms spricht die bereits 1985 von *Parsa et al.* [186] entdeckte Metaplasie azinärer Zellen zu duktales Zellen. Gestützt wird diese Hypothese durch Mausmodelle, in denen durch K-Ras-Aktivierung derartige Metaplasien reproduziert werden konnten [88]. Eine besondere Rolle wird hierbei insbesondere den zentroazinären Zellen zugeschrieben, die als eine Art Schnittstelle zwischen dem azinären und dem duktales System fungieren. Diese können, so schlussfolgern *Stanger et al.* [221] in ihrer Studie, nach Mutationen im PTEN-Gen wesentliche Initiatoren des Pankreaskarzinoms darstellen. Eine weitere Zellform, die als Ausgangspunkt des Pankreaskarzinoms in Frage kommt, sind die endokrinen β -Zellen. Diese kommen nicht nur multipel in Form von Langerhans-Inseln vor, sondern finden sich zudem solitär in normalem, hyperplastischem oder malignem duktales Epithel des Pankreas. Zudem konnte in pankreatischen Hamster-Zelllinien gezeigt werden, dass sich β -Zellen, die mit dem Karzinogen N-nitrosorbis(2-oxopropyl)amin (BOP) behandelt wurden, in ein duktales Adenokarzinom transformieren und hierbei die für das PDAC typische Mutation des K-ras-Onkogens aufweisen [190]. Eine relativ neue

Hypothese zur Entstehung des Pankreaskarzinoms wurde von *Aichler et al.* [6] 2012 formuliert: Diese fanden in Pankreaskarzinomen von Mäusen und Menschen atypische flache Läsionen, die in Regionen azinärer/duktaler Metaplasien auftraten und hierbei eine deutlich höhere Proliferation zeigten, als die Zellen anderer duktaler Läsionen, einschließlich den PanINs. Zusätzlich konnten auch hier regelhaft auftretende Mutationen des K-ras-Onkogens nachgewiesen werden. *Aichler et al.* äußerten hierbei die Vermutung einer Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz, bei der den atypischen flachen Läsionen eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Auch wenn viele Fakten auf eine nicht-duktales Entstehen des PDAC hindeuten, spricht nach wie vor vieles dafür, dass das duktales Adenokarzinom des Pankreas tatsächlich seinen Ursprung vom Epithel der pankreatischen Ductuli nimmt. Die morphologischen Ähnlichkeiten zwischen den PDAC-Tumorzellen und den dukталen Epithelzellen stellen zwar längst keinen Beweis eines dukталen Ursprunges dar, implizieren jedoch die Möglichkeit einer dukталen Entstehung [74]. Hinzu kommt, dass das Pankreaskarzinom reich an Mucinen ist, also an Glykoproteinen, die üblicherweise von dukталen Epithelzellen gebildet werden [44]. Zudem lassen sich in den Tumorzellen des Pankreaskarzinoms duktale Marker, wie CA 19-9, DU-PAN-2 sowie zahlreiche Zytokeratine nachweisen [74, 190]. *Cubilla und Fitzgerald* [45] beobachteten 1976, dass papilläre duktales Hyperplasien in Pankreaskarzinomen deutlich häufiger vorkommen, als im gesunden Pankreas und leiteten hieraus die Annahme ab, dass derartige Hyperplasien frühe Vorstufen des PDAC sind. Auch wenn dies strittig ist, so sind doch weitere Vorläuferläsionen bekannt, für die eine Bedeutung in der Entstehung des PDAC klar belegt ist. In diesem Zusammenhang sind vor allem die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) zu nennen, die sich schrittweise (über PanIN 1-3) in ein invasives Pankreaskarzinom transformieren können und ebenfalls eine duktales Morphologie aufweisen [95, 190]. Eine Transformation dukталer Zellen zu einem invasiven Adenokarzinom des Pankreas gelang auch im Ratten-Modell: Die Arbeitsgruppe um *Ueda et al.* [237] konnte hierbei zeigen, dass eine Ha-ras-Aktivierung in dukталen Zellen mittels vektorvermittelter Cre-Einschleusung in der Entstehung eines Adenokarzinoms des Pankreas gipfelt. All dies stützt die – auch in dieser Studie präferierten – Vorstellung einer dukталen Genese des PDAC.

Nach wie vor gilt jedoch die bereits von *Cubilla und Fitzgerald* [45] 1976 formulierte Forderung nach weiterführender Erforschung der dukталen Zellen des Pankreas – insbesondere im Hinblick auf das Pankreaskarzinom. Gerade über die MicroRNA-Expression duktalere Zellen ist zurzeit nur wenig bekannt. Unter der Annahme einer schrittweisen Entartung duktalere Epithelien hin zu einem Pankreaskarzinom, war es das Ziel dieser Studie, die dukталen Zellen von gesundem Pankreas und chronischer Pankreatitis mit den Tumorzellen des PDAC zu vergleichen.

Die selektive Untersuchung homogener Zellpopulationen aus einem ansonsten inhomogenen Gewebe heraus ist hierbei eine Domäne der Mikrodisektion. Mit der 1996 von *Emmert-Buck et al.* [56] vorgestellten Laser-Mikrodisektion ist es nunmehr möglich, kontaktlos, standardisiert und kontaminationsfrei größere Mengen homogener Zellverbände zu kollektivieren [213, 242]. Diese Technik ermöglichte es, im Rahmen dieser Studie gezielt duktale Zellen und Karzinomzellen zu sammeln und diese nachfolgend zu analysieren. Dass die Laser-Mikrodisektion auch für pankreatische FFPE-Gewebe eine geeignete Methode darstellt, um spezifische Gewebestrukturen zu isolieren, stellten bereits *Heinmöller et al.* [87] mit ihrer Studie über die Mikrodisektion von Pankreatitis-Präparaten unter Beweis. Auch die Kombination von Laser-Mikrodisektion und MicroRNA-Analyse ist bereits etabliert: Sowohl *Giovannetti et al.* [68], als auch *Nakahara et al.* [167] nutzten für ihre Studien über pankreatische MicroRNAs die Laser-Mikrodisektion. Eine Gegenüberstellung von dukталen Zellen des gesunden Pankreas sowie der chronischen Pankreatitis auf der einen und den Tumorzellen des PDAC auf der anderen Seite ist – legt man den aktuellen Stand der Forschung zugrunde – bisher jedoch noch nicht erfolgt. Aber genau auf der Ebenen der dukталen Zellen bietet sich ein Vergleich der drei Gewebeformen an: Nicht nur die mögliche Entstehung des Pankreaskarzinoms aus dukталen Zellen über die chronische Pankreatitis als Zwischenstufe macht einen derartigen Vergleich interessant, sondern auch der Ausschluss anderer Zellformen, die andernfalls als Artefakte ein verzerrtes Bild der jeweiligen Erkrankung wiedergeben könnten. So finden sich im Stroma bei chronischer Pankreatitis, aber auch beim Pankreaskarzinom zahlreiche Leukozyten wechselnder Ausprägung, die ihrerseits MicroRNAs exprimieren und hierüber das MicroRNA-Profil eines makrodisektierten Gewebes deutlich beeinflussen.

Hierbei sind nicht nur Leukozyten zu nennen, sondern auch Myofibroblasten, Fibroblasten und Erythrozyten. Über ihren eigenen MicroRNA-Gehalt üben sie einen deutlichen Einfluss auf das MicroRNA-Profil des Gesamtgewebes aus, so dass ein auf die zugrundeliegende Pathologie bezogener Unterschied der MicroRNA-Expression möglicherweise nicht mehr zu erkennen ist. So könnten sich beispielsweise die chronische Pankreatitis und das von einer pankreatitischen Reaktion begleitete Pankreaskarzinom in ihrem Gesamt-MicroRNA-Profil gleichen, obwohl bei beiden Erkrankungen eventuell eine Deregulation unterschiedlicher MicroRNAs vorliegt. Mit der Untersuchung homogener Zellpopulationen, wie es die duktaalen Zellen bzw. die Tumorzellen darstellen, wird dieses Problem jedoch umschifft. Aus diesem Grund wurden in der hier vorliegenden Studie nur duktaale Zellen sowie Tumorzellen untersucht.

6.1.4 Die MicroRNA-Extraktion

Dass MicroRNAs zuverlässig aus Formalin-fixierten Paraffingeweben extrahiert werden können, wurde bereits eingangs erwähnt (siehe Kapitel 6.1.1). *Bloomston et al.* [26], *Dillhoff et al.* [48], *Hwang et al.* [100], *Yu et al.* [258] sowie vielen anderen Arbeitsgruppen gelang ebenfalls die MicroRNA-Extraktion aus pankreatischen FFPE-Geweben. Die für die MicroRNA-Extraktion eingesetzten Techniken sind hierbei vielfältig: So kann die Separation sowohl über magnetische Partikel („magnetic bead-based extraction“), als auch über Filtersäulen („column-based extraction“) erfolgen. Letztere kamen in Form des Qiagen® miRNeasy FFPE-Kit im Rahmen dieser Studie zur Anwendung.

Obwohl Säulen-basierte, manuelle Extraktionsverfahren sicherlich am meisten verwendet werden, ist eine kritische Auseinandersetzung mit diesen angebracht: *Bohmann et al.* [29] stellten in ihrer Untersuchung aus dem Jahr 2009 dar, dass im Vergleich zu Extraktionsverfahren, die magnetische Partikel nutzen, Säulen-basierte Extraktionsverfahren hinsichtlich des RNA-Erlöses aus FFPE-Geweben deutlich schlechter abschnitten. Auch wenn in der hier vorliegenden Studie ausschließlich das Qiagen miRNeasy FFPE-Kit genutzt und dieses nicht direkt mit magnetischen Partikel-

Extraktionsverfahren verglichen wurde, lässt sich angesichts des geringen RNA-Erlöses dennoch der Eindruck gewinnen, dass Säulen-basierte Systeme den RNA-Gehalt von FFPE-Proben nur unzureichend ausschöpfen. Dies wiederum wirkt sich nachteilig auf Analysen aus, für die hohe RNA-Konzentrationen benötigt werden, um valide Ergebnisse zu erzielen. Als Beispiel hierfür sind Microarray-basierte Untersuchungen zu nennen, die in dieser Studie aufgrund der zu geringen RNA-Mengen nicht durchgeführt werden konnten.

6.1.5 Die Reinheitskontrolle bei MicroRNA-haltigen Lösungen

Ein hoher Reinheitsgrad gilt bei RNA als Voraussetzung für nachfolgende Analysen mit möglichst hoher Genauigkeit (accuracy). Der Reinheitsgrad RNA-haltiger Lösungen lässt sich hierbei auf verschiedene Arten bestimmen: Der photometrisch zu ermittelnde Extinktionskoeffizient E_{260}/E_{280} , welcher ein direktes Maß für die RNA-Reinheit darstellt, zählt sicherlich zu den einfachsten, aber auch fehlerträchtigsten Formen der RNA-Qualitätskontrolle. In die gleiche Kategorie ist auch der Extinktionskoeffizient E_{260}/E_{230} einzuordnen, der als Maß für die Verunreinigung einer RNA-haltigen Lösung mit Proteinen, Phenolen und anderen Stoffen eher indirekt Aufschluss über die Reinheit von RNA gibt. Ein deutlich genaueres Kriterium für die RNA-Reinheit stellt die RNA-Integritäts-Nummer (RIN) dar, die Werte von 1 (= völlig zerfallene RNA) bis 10 (= völlig intakte RNA) annehmen kann und die RNA-Kettenlänge widerspiegelt. Spezielle Genchips ermöglichen die Messung der RNA-Kettenlänge und können über den RIN-Wert eine Bewertung der RNA-Qualität vornehmen. Zwar stellen RIN-Wert und die zuvor genannten Extinktionskoeffizienten nur bedingt Prädiktoren für ein erfolgreiches Durchführen nachgeschalteter Analysen dar, jedoch ist die Unabdingbarkeit eines hohen Reinheitsgrades der Ausgangs-RNA unumstritten [84]. Für MicroRNA-Analysen gilt dies jedoch nicht: Infolge ihrer weitgehenden Resistenz gegenüber Ribonukleasen stellen MicroRNAs stabile Nukleinsäuren dar, die auch bei ansonsten völlig degradiert RNA mit RIN-Werten < 5 noch intakt vorliegen und zuverlässig detektiert werden können. Mit ihrem Vergleich von mRNA und MicroRNA aus Zelllinien sowie renalem und prostatischem Gewebe wiesen *Jung et al.* [106] nach, dass die RNA-Reinheit zwar einen großen Einfluss auf die Analysen von mRNA hat, für MicroRNA-Untersuchungen jedoch zu vernachlässigen ist. Die im Rahmen der Studie untersuchten

MicroRNAs erbrachten in der RT-PCR sowohl bei degradierter RNA ($RIN \leq 3$), als auch bei intakter RNA ($RIN 8 -10$) nahezu identische C_t -Werte. Hieraus lässt sich schussfolgern, dass Reinheitskontrollen für MicroRNA-Analysen weitgehend irrelevant sind und auf diese verzichtet werden kann.

Der Wert des in der hier vorliegenden Studie bestimmten Extinktionskoeffizienten E_{260}/E_{280} lag im Durchschnitt bei 1,19. Dies weist auf eine eher mäßige RNA-Qualität hin, die auf die im Zuge der Formalinfixierung und der mehrjährigen Lagerung der FFPE-Gewebe erfolgten RNA-Degradation zurückzuführen und in ebendieser Ausprägung zu erwarten ist. Für nachfolgende mRNA-Untersuchungen disqualifizierend, stellt der E_{260}/E_{280} -Quotient von 1,19 – wie oben beschrieben – für MicroRNA-Analysen jedoch kein Hindernis dar. Untermauern lässt sich dies mit den Ergebnissen dieser Studie, mit denen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass MicroRNA-Analysen auch aus archivierten Paraffingeweben mit degradierter RNA möglich sind.

6.1.6 Die MicroRNA-Detektion mittels qRT-PCR

Die im Jahr 1987 erstmalig vorgestellte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt ein etabliertes Verfahren zur Vermehrung und Detektion von Nukleinsäuren dar. Schon 1989 versuchten *Delidow et al.* [47] die PCR zur Quantifizierung von mRNA zu nutzen und verwendeten hierzu eine interne Kontrolle in Form von nukleärer RNA aus GH3-Zellen. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche 1991 von *Landgraf et al.* [124] vorgestellt wurde, verhalf der quantitativen RT-PCR schließlich zum Durchbruch. Als einer der Standard-Fluoreszenzfarbstoffe, die in diesem Zusammenhang Anwendung finden, kristallisierte sich SYBR-Green heraus, welches dem zuvor verwendeten Ethidium-Bromid hinsichtlich der Sensitivität deutlich überlegen ist. Dies stellten jedenfalls *Becker et al.* [20] heraus, die 1995 als eine der ersten Arbeitsgruppen weltweit SYBR-Green zur Quantifizierung im Rahmen einer PCR verwendeten. Auch in der hier vorliegenden Studie wurde SYBR-Green als Fluoreszenzfarbstoff zur sensitiven Quantifizierung der – in cDNA transkribierten – MicroRNAs genutzt.

Während die quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) alsbald zur einer Standardmethode für den Nachweis und die Quantifizierung von mRNA avancierte, dauerte es lange Zeit bis die qRT-PCR auch in MicroRNA-Analysen eingebunden werden konnte. Dies ist auf die geringe Größe der MicroRNAs zurückzuführen, die mit ihren 17 – 25 Nukleotiden nur sehr schwer eine stabile und spezifische Bindung des Primers („Annealing“) ermöglichen [41, 105, 205]. So stellte lange Zeit das Northern Blotting die Methode der Wahl zur Detektion von MicroRNAs dar. *Schmittgen et al.* [205] gelang es 2004 jedoch, MicroRNA-Vorläufer (pre-miRNAs) mit einer durchschnittlichen Größe von 75 Nukleotiden mittels RT-PCR nachzuweisen und die Überlegenheit dieser Methode gegenüber dem Northern Blotting herauszustellen. *Jiang et al.* [105] weiteten die Untersuchung aus und konnten 2004 abermals die hohe Sensitivität der qRT-PCR für die Validierung von MicroRNA-Vorläufern belegen. Noch im selben Jahr designten *Chen et al.* [41] stem-loop-Primer, mit denen auch reife MicroRNAs, die – verglichen mit den pre-miRNAs – sich durch eine nochmals kleinere Nukleotidsequenz auszeichnen, detektiert werden konnten. Durch Polyadenylierung von MicroRNAs erzielten *Shi et al.* [209] 2005 eine zusätzliche Optimierung der qRT-PCR-basierten MicroRNA-Analyse. Die Polyadenylierung der MicroRNA und die Nutzung von stem-loop-Primern sind auch heute noch integrale Bestandteile der qRT-PCR von MicroRNAs. Auch der in dieser Untersuchung genutzte PCR-Ansatz, welcher sich aus Qiagen® miScript II RT Kit, Qiagen® miScript SYBR Green PCR Kit und Qiagen® miScript Primer Assay zusammensetzte, schloss ebenfalls eine Polyadenylierung der MicroRNA mit ein.

Der herausragendste Vorteil einer MicroRNA-Validierung mittels qRT-PCR besteht in der hohen Sensitivität der Methode. So gelingt ein zuverlässiger und robuster Nachweis von MicroRNAs beim hier verwendeten Qiagen® miScript SYBR Green PCR Kit schon ab einer Ausgangsmenge von 10 pg reiner RNA. Bereits 10 Kopien einer MicroRNA lassen sich auf diesem Wege detektieren. Damit ist die qRT-PCR anderen Nachweismethoden wie Microarray-basierten Untersuchungen oder Northern Blots, die eine geringere Sensitivität aufweisen, deutlich überlegen. Im Vergleich zum Northern Blotting punktet die qRT-PCR mit einem höheren Probendurchsatz und einer ungleich höheren Sensitivität, gegenüber Microarrays profiliert sich die qRT-PCR mit einer

besseren Sensitivität für seltene Ziele sowie mit einem geringeren Inputbedarf [205]. Zwar können heutzutage schon Microarray-Analysen mit einer Ausgangsmenge von 2 ng RNA (Qiagen® Hilight Array) durchgeführt werden, jedoch sind zumeist höhere Konzentrationen (1-2 µg) notwendig, um valide Ergebnisse zu erzielen [117]. Insbesondere bei der Laser-Mikrodissektion, die für die Separation einzelner Zellen oder Gewebearealen genutzt wird, kommen oftmals nur geringe RNA-Konzentrationen zustande, so dass Microarray-Analysen von Laser-mikrodissektierten Geweben oft nur schwer möglich sind. Anders verhält es sich mit der qRT-PCR: Dass Laser-Mikrodissektion und qRT-PCR gut und sinnvoll zu kombinierende Verfahren darstellen, erkannten 2004 bereits *Schmittgen et al.* [205]. In der hier vorliegenden Studie erfolgte die Detektion der aus Laser-mikrodissektierten FFPE-Gewebe des Pankreas stammenden MicroRNAs ebenfalls mithilfe der qRT-PCR. Die geringe Menge an RNA, die aus der Extraktion duktaler und maligner Zellverbänden gewonnen wurde, ermöglichte hierbei nicht die Durchführung einer Microarray-Analyse. Dies wiederum ist als Schwachpunkt der Studie zu werten, da so nur eine Untersuchung vorab ausgewählter MicroRNAs (miR-21*, miR-155, miR-196a, miR-141, miR-200a/b/c, miR-429) erfolgte. Ein umfangreiches MicroRNA-Screening, wie es durch eine Microarray-Analyse möglich gewesen wäre, konnte nicht vorgenommen werden. Nichtsdestoweniger stellt der hier vorgestellte MicroRNA-Nachweis aus Laser-mikrodissektierten FFPE-Gewebe ein sensitives Verfahren zur Detektion einzelner MicroRNAs aus archivierten Pankreasgeweben dar, welches sowohl für Forschungszwecke, als auch in der Diagnostik des Pankreaskarzinoms Anwendung finden kann.

6.1.7 Die Primerauswahl

Im Gegensatz zu Microarray-basierten Untersuchungen, bei denen eine Vielzahl von Ziel-MicroRNAs simultan analysiert werden können, ist die qRT-PCR auf wenige Ziel-MicroRNAs pro Durchlauf limitiert. Aus diesem Grund beschränkt sich die vorliegende Untersuchung auf die Analyse von 8 ausgewählten MicroRNAs: hsa-miR-21*, hsa-miR-155, hsa-miR-196a, hsa-miR-141, hsa-miR-200a, hsa-miR-200b, hsa-miR-200c sowie hsa-miR-429. Ausgewählt wurden hierbei sowohl MicroRNAs mit vornehmlich

onkogener Wirkung, wie auch MicroRNAs mit überwiegend tumorsupprimierendem Effekt.

Den MicroRNAs miR-21, miR-155 und miR-196a wird eine tumorfördernde Wirkung zugeschrieben. Dies gilt insbesondere für die Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms, wobei aber auch für andere Malignome ein tumorfördernder Effekt von miR-21, miR-155 und miR-196a belegt ist [42, 243]. So konnte eine Überexpression der MicroRNA miR-21 nicht nur im Pankreaskarzinom, sondern auch im Bronchialkarzinom, Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Magenkarzinom sowie im Glioblastom nachgewiesen werden [40, 243]. Darüber hinaus gibt es Evidenzen, dass miR-21 in zahlreichen weiteren Malignomen eine wichtige Rolle spielt, wie z.B. im hepatozellulären Karzinom der Leber, im Nierenzellkarzinom, im Zervixkarzinom und in Lymphomen [128, 150, 153, 158]. Die MicroRNA-21 lässt sich hierbei in 2 Unterformen unterteilen: Die „Major“-Form miR-21 (= hsa-miR-21-5p), welche in vielen Zellen in vergleichsweise hoher Konzentration vorliegt und die zumeist mengenmäßig geringere miR-21* (= hsa-miR-21-3p), welche gemeinhin als „Minor“-Variante gilt. Sowohl miR-21, als auch miR-21* weisen Zielgene auf, die bei der Entartung von Zellen eine wichtige Rolle spielen (*Abbildung 29*). So wirkt die MicroRNA miR-21 auf Onkogene wie VEGF, EGFR und STAT3 sowie auf Tumorsuppressoren wie PTEN und PDCD4. Die MicroRNA miR-21* zielt wiederum auf Onkogene wie BCL2L1, CDK6, RUNX₁T₁, SMAD3, MAP₃K₁ sowie JAK2 ab und stellt damit ein nicht minder bedeutender Faktor in der Entstehung und Progression von Tumoren dar [1]. In der hier vorliegenden Studie wurde die Expression von miR-21* analysiert. miR-21* wurde bewusst als Untersuchungsgegenstand ausgewählt, da miR-21* an der Regulation von CDK6 und RUNX₁T₁ beteiligt ist und diese wiederum wichtige Onkogene des Pankreaskarzinoms darstellen [1, 130]. Des Weiteren ist über die Expression von miR-21* in Pankreaskarzinomen relativ wenig bekannt, da sich bisher keine Studie explizit mit der Rolle von miR-21* im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) auseinandergesetzt hat.

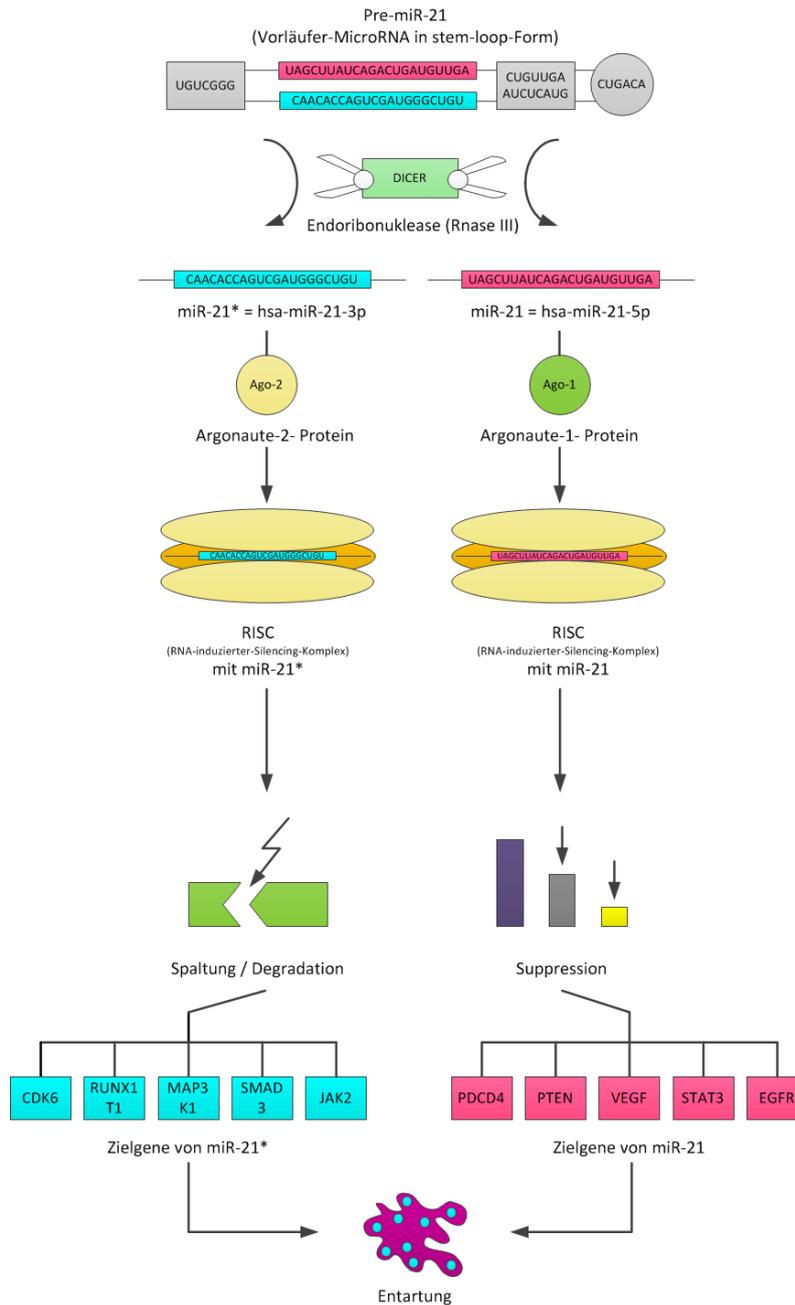


Abbildung 29: Entstehung und Wirkung von miR-21 und miR-21*

Die MicroRNAs miR-21 und miR-21* entspringen einem gemeinsamen Vorläufer (Pre-miR-21) und werden durch die Endoribonuklease Dicer aus diesem herausgetrennt. Während miR-21 eine höhere Affinität zu dem Argonaute-Protein 1 aufweist, bindet miR-21* vorzugsweise an das Argonaute-Protein 2. Die Bindung an die Argonaute-Proteine stellt ein wichtiger Schritt zur Bildung des RISC- Protein-RNA-Komplexes dar, über den miR-21 und miR-21* ihre Wirkung vermitteln. Über ihre unterschiedlichen onkogenen und tumorsupprimierenden Zielgenen können miR-21 und miR-21* entscheidend die Entartung von Zellen fördern. So spielen miR-21 und miR-21* eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression des duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC).

Analog zu miR-21/miR-21* stellt auch miR-155 eine in zahlreichen Malignomen verbreitete onkogene MicroRNA dar. *Lee et al.* [129] stellten 2007 erstmalig einen Bezug zwischen der aberrant exprimierten MicroRNA miR-155 und dem Pankreaskarzinom her. In weiteren Untersuchungen von *Habbe et al.* [83] und *Ryu et al.* [199] zeigte sich, dass miR-155 bereits in Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms, wie den intraduktalen papillären muzinösen Neoplasien (IPMN) und den pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), übermäßig exprimiert vorliegt. Damit gilt miR-155 als die am frühesten dereguliert vorliegende MicroRNA des Pankreaskarzinoms – ein Umstand, dem man sich in der Früherkennung des PDAC zunutze machen könnte. Die MicroRNA miR-155 spielt jedoch auch in zahlreichen anderen Malignomen, darunter dem Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Kolonkarzinom, Schilddrüsenkarzinom, Zervixkarzinom, den Lymphomen und Leukämien, eine wichtige Rolle und konnte in selbigen bereits als überexprimiert nachgewiesen werden [59, 243]. Analog zur miR-21 lässt sich die MicroRNA miR-155 ebenfalls in zwei Unterformen unterteilen: hsa-miR-155-5p, welche als „Major“-Form (miR-155) gilt und hsa-miR-155-3p (miR-155*), die die „Minor“-Form darstellt. Die vorliegende Arbeit befasst sich hierbei mit der MicroRNA hsa-miR-155 (= miR-155), da für diese Zielgene wie Smad2, TP53INP und KRAS, denen eine große Bedeutung in der Entstehung des Pankreaskarzinom zukommt, belegt sind (www.mirbase.org [2]).

Die dritte onkogene MicroRNA, die im Rahmen der hier vorliegenden Studie untersucht wurde, ist miR-196a. Auch für diese MicroRNA wurde bereits eine Beteiligung an verschiedensten Malignomen nachgewiesen: Insbesondere gastrointestinale Tumoren, wie Ösophagus- und Kolonkarzinom gehen mit einer Überexpression von miR-196a einher. Zusätzlich findet sich eine miR-196a-Deregulation auch in Mammakarzinomen, Endometriumkarzinomen, Lymphomen und Leukämien [42]. *Bloomston et al.* [26] beobachteten eine übermäßige Expression von miR-196a im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) und stellten heraus, dass diese mit einem verminderten Überleben korreliert. Nachfolgende Studien von *Szafrańska et al.* [226, 227], *Kong et al.* [115] und *Panarelli et al.* [181] bestätigten diese Beobachtungen. Die MicroRNA miR-196a besitzt hierbei zwei Vorläuferformen: pre-miR-196a-1 und pre-miR-196a-2. Aus beiden Formen gehen die reifen Varianten hsa-miR-196a-3p und hsa-miR-196a-5p hervor.

Ungeachtet ihres Ursprunges aus pre-miR-196a-1 oder pre-miR-196a-2 weisen die 3p- und 5p-MicroRNAs jeweils gleiche Nukleotidsequenzen auf. Einzig in ihrem Abspaltungsort unterscheiden sich die 3p- und 5p-Varianten aus pre-miR-196a-1 oder pre-miR-196a-2. Die vorliegende Studie beinhaltet die Untersuchung von hsa-miR-196a-5p. Die MicroRNA miR-196a-5p wurde ausgewählt, da sie an der Regulation von HOX-Genen, MAP3K19 sowie PDCD4 beteiligt ist. Letztere stehen im Verdacht, an der Entstehung von Malignomen – u.a. auch an der Entstehung des Pankreaskarzinoms – maßgeblich mitzuwirken.

Neben den onkogenen MicroRNAs miR-21*, miR-155 und miR-196a wurden mit der MicroRNA-200-Familie auch solche MicroRNAs in die Studie aufgenommen, für die eine vorwiegend tumorsupprimierende Funktion angenommen wird: miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429. Die Arbeitsgruppen um *Gregory et al.* [75] und *Park et al.* [185] stellten 2008 erstmalig eine Verbindung zwischen der MicroRNA-200-Familie und der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) von Tumoren her. Während *Gregory et al.* nachweisen konnten, dass die MicroRNA-200-Familie überall dort minderexprimiert vorliegt, wo Tumoren eine ausgeprägte Entdifferenzierung im Sinne der epithelial-mesenchymalen Transition aufzeigen, hoben *Park et al.* den positiven Zusammenhang zwischen der Bildung von E-cadherin und der Expression der MicroRNA-200-Familie hervor. *Burk et al.* [34] konnten nachfolgend aufzeigen, dass die MicroRNA-200-Familie mit ihrem Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transition auch in Pankreaskarzinomzellen eine wichtige Rolle spielt. Eine maßgebliche Beteiligung der MicroRNA-200-Familie an der Entstehung, Infiltration und Metastasierung zahlreicher Tumoren – hierunter Blasenkarzinom, Bronchialkarzinom, Magenkarzinom, Melanom, Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom und Prostatakarzinom – gilt als sicher. Ihren tumorsupprimierenden Einfluss übt die MicroRNA-200-Familie im Wesentlichen über die negative Regulation der ZEB1- und ZEB2- (= SIP1-) Gene aus, die wiederum einen essentiellen Beitrag zur epithelial-mesenchymalen Transition leisten [34, 75, 185]. Neben der in zahlreichen Studien nachgewiesenen tumorsupprimierenden Wirkung der MicroRNA-200-Familie mehrten sich jedoch auch Hinweise auf einen onkogenen Effekt selbiger. So konnte für das Mammakarzinom eine erhöhte Metastasierungsneigung bei vermehrter Expression der MicroRNA-200-Familie

nachgewiesen werden [53]. Passend hierzu fanden sich auch in Metastasen kolorektaler Karzinome erhöhte miR-200-Konzentrationen [187]. Da eine Überexpression der MicroRNA-200-Familie auch in den duktaalen Adenokarzinomen des Pankreas beobachtet wurde, ist es möglich, dass im Pankreaskarzinom die tumorsupprimierende Wirkung der MicroRNA-200-Familie zugunsten des onkogenen Einflusses zurücksteht. Über die Expressionsanalyse der MicroRNA-200-Familie sollten in dieser Untersuchung auch diesbezüglich neue Erkenntnisse gewonnen werden. Von den MicroRNAs miR-141, miR-200a, miR-200b und miR-200c erfolgte in dieser Studie ausschließlich die Analyse der 3p-Form, da diese vornehmlich an der Steuerung der ZEB1- und ZEB2-Gene beteiligt ist und letztere wiederum die hauptsächlichen Effektorgene der MicroRNA200-Familie darstellen (www.mirbase.org [2]).

Zur Analyse der MicroRNAs miR-21*, miR-155, miR-196a sowie der MicroRNA-200-Familie wurden Primer von Qiagen® (miScript Primer Assay, Qiagen / Hilden) eingesetzt. Primer zur Amplifikation von MicroRNAs müssen hierbei besonderen Anforderungen genügen: Sie müssen sowohl über eine ausreichende Spezifität, die mit der Höhe der Annealing-Temperatur zunimmt, als auch über eine größtmögliche Sensitivität, welche wiederum reziprok mit der Annealing-Temperatur vergesellschaftet ist, für die jeweilige MicroRNA aufweisen. Dieser Spagat ist bei MicroRNAs besonders schwierig, da MicroRNAs sehr heterogen in ihrem Guanin-Cytosin-Gehalt sind und dieser wiederum maßgeblich für die Annealing-Temperatur ist. Aufgrund der Heterogenität an Guanin und Cytosin differieren die einzelnen MicroRNAs deutlich in ihrer optimalen Annealing-Temperatur [21]. Von großer Bedeutung ist somit ein Primer-Design, das bei einer bestimmten und für alle Primer des Ansatzes gültigen Temperatur eine möglichst spezifische und sensitive Hybridisierung an die Ziel-MicroRNA ermöglicht. Eine weitere Herausforderung ist die spezifische Bindung des Primers an die reife MicroRNA, da deren Nukleotidsequenz zusätzlich auch im Primärtranskript (pri-miRNA) und in der direkten Vorstufe (pre-miRNA) vorkommt [21]. All dies ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Amplifikation von MicroRNAs. Letztere wurde in dieser Studie durch die Primer der Qiagen® miScript-Produktreihe ermöglicht, die sich durch die hier aufgezählten Eigenschaften auszeichnen.

6.1.8 Das Haushaltsgen *RNU6-2*

Die Nutzung eines oder mehrerer Haushaltsgene stellt die häufigste Form der Normalisierung von MicroRNA-Expressionsdaten dar [217]. Zur relativen Quantifizierung wird hierbei die Expression der jeweiligen Ziel-MicroRNA mit der eines endogenen Referenzgenes, welches simultan in der gleichen Proben bestimmt wird, verglichen [202]. Gleichwohl diese Form der Normalisierung in einem Großteil aller qRT-PCR- und Microarray-Untersuchungen angewandt wird, ist sie nicht unumstritten: Da die Wahl des Referenzgenes deutlichen Einfluss auf die Quantifizierung hat und diese oftmals in Abhängigkeit vom genutzten Referenzgen variiert, sind zahlreiche weitere Normalisierungsmethoden im Umlauf, die ohne die Verwendung eines Haushaltsgenes auskommen. Eine Überlegenheit Referenzgen-freier Normalisierungsverfahren konnte jedoch bisher nicht herausgestellt werden [202].

Haushalts- oder Referenzgene müssen dabei zahlreiche Kriterien erfüllen, um eine valide und zuverlässige Normalisierung zu ermöglichen: Die konstante, nicht-regulierte Expression, die unabhängig von biologischen Varianten, pathologischen Prozessen oder Behandlungen sein sollte, stellt hierbei nur ein Attribut von vielen dar. Zudem sollten Haushaltsgene von annähernd gleicher Größe wie die zu untersuchende Ziel-Nukleinsäure sein, um eine äquivalente Effizienz während der RNA-Isolation und der reversen Transkription zu gewährleisten [202]. Zur Normalisierung von MicroRNA-Expressionswerten werden dementsprechend vornehmlich kleine nukleäre Ribonukleinsäuren (snRNAs) sowie MicroRNAs (miRNAs) eingesetzt. Die größeren mRNAs hingegen kommen aufgrund anderer Degradations-, Isolations- und Transkriptionseigenschaften in MicroRNA-Untersuchungen nur selten als Haushaltsgene zur Anwendung.

RNU6-2 (Synonym: *RNU6B*, *RNA U6 small nuclear 2*) ist das – bezogen auf MicroRNA-Untersuchungen – am stärksten frequentierte Haushaltsgen [202, 217, 250]. Das auf Chromosom 10p13 lokalisierte und 107 Nukleotide umfassende *RNU6-2* ist ein Bestandteil des U6-snRNA-Proteinkomplexes, der wiederum als integrale Komponente von Spleißosomen wesentlich an der Umwandlung von Prä-mRNA in reife mRNA

beteiligt ist. Erstmals von *Schmittgen et al.* [205] zur Normalisierung von MicroRNA-Vorläufern eingesetzt, stellt RNU6-2 aktuell ein verbreitetes Referenzgen in Micro-Analysen mit Fokus auf malignen Geweben dar. Auch in der Pankreaskarzinom-Forschung findet RNU6-2 regelhaft Anwendung: Zahlreiche Arbeitsgruppen, darunter *Bloomston et al.* [26], *Zhang et al.* [261], *Ryu et al.* [199] und *Jamieson et al.* [101] nutzten RNU6-2 zur Normalisierung der MicroRNA-Expression pankreatischer Gewebe. Die Tauglichkeit von RNU6-2 als valides Referenzgen wird jedoch zunehmend diskutiert: Während *Schaefer et al.* [202] RNU6-2 in Bezug auf MicroRNA-Analysen des Prostatakarzinoms gute Referenzgen-Qualitäten attestierten, bekundeten *Gee et al.* [66] generell Zweifel an der Nutzung kleiner nukleärer Ribonukleinsäuren zur Normalisierung der MicroRNA-Expression. Letztere würden, so stellten *Gee et al.* heraus, bei Malignomen genauso variabel exprimiert werden, wie die zu untersuchenden MicroRNAs. In ihrer Untersuchung räumten *Gee et al.* jedoch ein, dass RNU6-2 insgesamt als relativ stabiles Referenzgen zu betrachten sei, das nicht mit klinisch-pathologischen Faktoren assoziiert ist. Zu einem deutlich anderen Ergebnis kamen *Wotschovsky et al.* [250] in ihrer Studie über Referenzgene des Nierenzellkarzinoms: Sie beobachteten eine deutliche Abhängigkeit der RNU6-2-Expression von der RNA-Integrität. So zeigte sich eine erhöhte RNU6-2-Expression bei degradierter RNA (RIN 2,9), während sich in intakter RNA (RIN 8,3) nur schwerlich RNU6-2 nachweisen ließ. Dieser aktuell nicht zu erklärende Sachverhalt widerspricht jedoch den Beobachtungen von *Song et al.* [217], die RNU6-2 nicht im Serum von Magenkarzinom-Patienten nachweisen konnten und dies auf die fehlende RNase-Resistenz von RNU6-2 mit konsekutiver Degradation des Haushaltsgens zurückführten.

Obwohl sicherlich die Verwendung von RNU6-2 als Haushaltsgen kritisch hinterfragt werden muss, gilt es – zumindest beim Pankreaskarzinom – derzeit noch als Standard-Referenzgen zur Normalisierung von MicroRNA-Expressionswerten. Diesem Umstand trug auch die hier vorliegende Studie Rechnung, indem ebenfalls RNU6-2 als endogene Kontrolle zur Normalisierung verwendet wurde. Auf eine Nutzung mehrerer Referenzgene, wie von einigen Autoren gefordert wird, wurde hierbei bewusst verzichtet, da SNORD68 und SNORD96A, welche ursprünglich neben RNU6-2 als Haushaltsgene eingesetzt werden sollten, sich aufgrund großer Expressionsstreuung als

untauglich gegenüber einer Normalisierung erwiesen. Eine grobe Auswertung der RNU6-2-Expression dieser Studie ergab hierbei keinen Zusammenhang zwischen der Expression des Haushaltsgenes und dem zugrundeliegenden Gewebe. So konnten zwar deutliche intraindividuelle Unterschiede in der jeweiligen Gruppe (PDAC, chronische Pankreatitis, gesunde Ductuli, Acini) jedoch keine interindividuellen Unterschiede ausgemacht werden.

6.1.9 Kritische Betrachtung der statistischen Auswertung

Die Ergebnisse statistischer Analysen sind eng mit den Daten verknüpft, auf denen sie beruhen: Keinesfalls ist das Ergebnis einer statistischen Untersuchung von höherer Güte, als der zugrundeliegende Datensatz. Diesem Gedanken folgend, ist eine kritische Betrachtung der vorliegenden Studie aus statistischer Perspektive angebracht:

Der aus statistischer Sicht geringe Umfang dieser Untersuchung mit einer Patientenzahl von 19, aufgeteilt in 9 PDAC-Fälle, 7 Fälle von chronischer Pankreatitis und 3 gesunden Kontrollen, stellt sicherlich einen Schwachpunkt der vorliegenden Studie dar. 1995 diskutierten *Fayers und Machin* [60] darüber, wie viele Patienten für eine Studie benötigt werden, um statistisch nennenswerte, valide Ergebnisse zu erhalten. Auch wenn diese Diskussion vornehmlich auf klinische Untersuchungen (clinical trial) abzielte, so lässt sich doch die Erkenntnis, dass kleine Studien nur schwerlich signifikante Ergebnisse liefern, auf alle Formen statistisch erfassbarer Untersuchungen übertragen. In der Tat ist es für Studien mit geringem Probenumfang nahezu unmöglich, kleine Differenzen zwischen Vergleichsgruppen zu erkennen und diese als statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) zu benennen. Für die vorliegende Untersuchung bedeutet dies, dass neben den genannten Expressionsunterschieden zusätzliche Unterschiede bestehen könnten, die in dieser Studie aufgrund der geringen Fallzahl nicht aufgefallen sind. So lässt sich nicht ausschließen, dass neben der MicroRNA miR-196a auch weitere MicroRNAs in ihrer Expression zwischen Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreasgewebe signifikant differieren und ebenfalls gute Biomarker des PDAC darstellen. Wenn in kleinen Studien, denen auch diese Untersuchung zuzurechnen ist, aber selbst angesichts geringer Fallzahlen signifikante Unterschiede

beobachtet werden, so kann davon ausgegangen werden, dass diese nicht unwesentlich sind [176]. Anzumerken ist jedoch, dass die statistische Signifikanz keinesfalls mit der klinischen Relevanz gleichzusetzen ist [35]. So bleibt eine Vielzahl an publizierten, statistisch signifikanten Ergebnissen ohne klinische Konsequenz – sei es bei einem klinischen Vergleich zweier Medikamente oder einer empirischen Studie zu epigenetischen Phänomenen. Umgekehrt können jedoch auch nicht-signifikante Ergebnisse von großer klinischer Bedeutung sein [10]. So sollten auch die infolge der geringen Fallzahl statistisch nicht signifikanten Resultate dieser Untersuchung nicht vollständig ignoriert werden.

Gleichsam wie die Signifikanz zeigen auch Überlebensanalysen eine starke Abhängigkeit von der Fallzahl. Als Beispiel hierfür kann die hier genutzte Cox-Regression angeführt werden. Einflussfaktoren, die mit Wahrscheinlichkeitsveränderungen für das Auftreten bestimmter Ereignisse (*hazard*) einhergehen, wie eine erhöhte postoperative Sterblichkeit oder eine adjuvante Chemotherapie, kommen bei geringen Fallzahlen so stärker zum Tragen, als bei größeren Untersuchungen [60]. Auch für die hier vorliegende Studie ist ein derartiges *Confounding* wahrscheinlich und muss bei der Interpretation der Cox-Regressionsanalysen, die hier allesamt nicht signifikante Ergebnisse lieferten, berücksichtigt werden.

Neben der geringen Probenanzahl dieser Untersuchung ist auch der p-Wert als Maßzahl der Signifikanz kritisch zu betrachten: Obwohl dieser der am häufigsten verwendete Index in biomedizinischen Untersuchungen darstellt, stellt er gleichermaßen der am meisten missinterpretierte statistische Kennwert dar, geben *Markku Nurminen* [176] und *Steven Goodman* [73] in ihren Publikationen zu bedenken. So kann mit dem p-Wert weder beurteilt werden, ob eine Schlussfolgerung richtig oder falsch ist, noch ob Differenzen zwischen zwei zu untersuchenden Gruppen bestehen [35, 73]. Mithilfe des p-Wertes kann lediglich eine Einschätzung vorgenommen werden, wie hoch die Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen der Nullhypothese (= kein Unterschied zwischen zwei Vergleichsgruppen) ist. Die genaue Wahrscheinlichkeit gibt der p-Wert aber auch

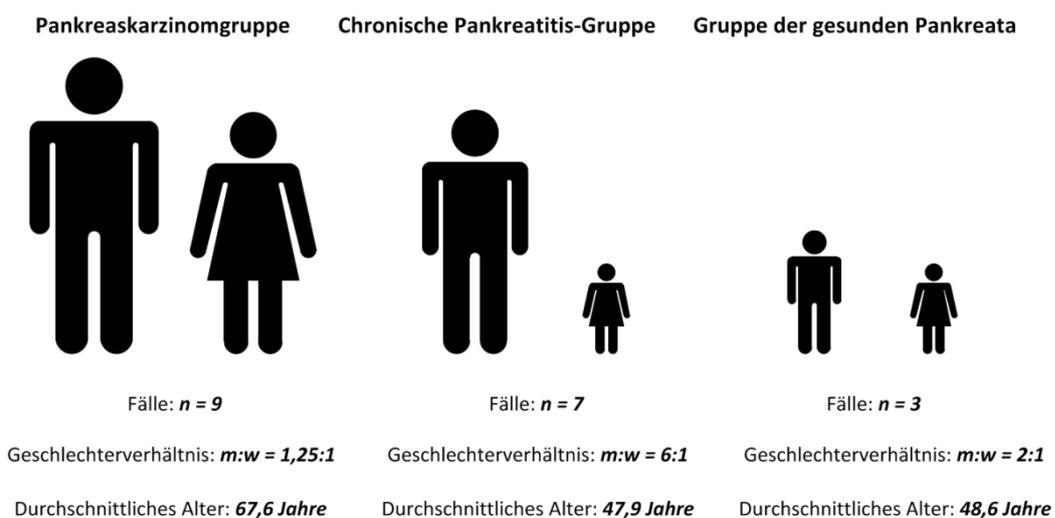
hier nicht an, da er unter der Annahme, dass die Nullhypothese zutrifft, kalkuliert wird. *Steven Goodman* [73] weist daraufhin, dass die Evidenz von Ergebnissen weniger vom p-Wert abhängt, als vielmehr von einem sorgfältigen Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Studien. Dies alles gilt es auch bei der Interpretation der vorliegenden Studie zu berücksichtigen, um die Bedeutung von MicroRNAs in der Diagnostik, Prognostik und Therapie des Pankreaskarzinoms richtig einschätzen zu können.

6.2 Bewertung des Patientenkollektivs

In die Studie wurden FFPE-Proben von Patienten mit histologisch gesicherten Pankreaskarzinomen (PDAC), chronischen Pankreatitiden sowie mit gesunden Pankreata aufgenommen. Das Vorhandensein von Zweitmalignomen stellte bei allen 3 Gruppen ein Ausschlusskriterium dar. Das dieser Studie zugrundeliegende Patientenkollektiv ist dabei in vielerlei Hinsicht als heterogen anzusehen: Die unterschiedliche Größe der drei Untersuchungsgruppen sowie divergierende Alters- und Geschlechterverhältnisse, aber auch die verschiedenartige Herkunft der Pankreasgewebe (Pankreaskopf / Pankreaskörper / Pankreasschwanz) schmälern die Vergleichbarkeit und beeinflussen die Aussagekraft dieser Studie nicht unerheblich (*Abbildung 30*). Nicht zuletzt ist auch die Bedeutung heterogener Tumorstadien im Hinblick auf die MicroRNA-Expression nicht zu vernachlässigen, wenn auch durch die Eingrenzung auf das UICC-Stadium IIA / IIB dieser Effekt zu minimieren versucht wurde.

Im Folgenden soll einmal die Studienpopulation als solche untersucht werden. Insbesondere gilt es hierbei zu klären, ob das Patientenkollektiv dieser Studie der Normalpopulation entspricht oder ob durch relevante Einflüsse eine Verzerrung der Ergebnisse in Betracht gezogen werden muss.

Abbildung 30: Unterschiede zwischen den drei Untersuchungsgruppen dieser Studie



6.2.1 *Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC)*

Der Altersdurchschnitt der PDAC-Patienten dieser Studie lag bei 67,6 Jahre, wobei die Mehrzahl der Patienten zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr erkrankten. Dies entspricht weitgehend der Altersverteilung anderer Studien bzw. den Literaturangaben [28, 67, 99, 149, 192, 247]. Von den 9 Pankreaskarzinompatienten, die in dieser Studie betrachtet wurden, erkrankte einer bereits in einem Alter von 48,8 Jahren. Auch dies lässt sich mit den epidemiologischen Daten zum Thema Pankreaskarzinom vereinbaren, da in diesen der Anteil der PDAC-Patienten unter 50 Jahren auf 5 - 10% beziffert wird [149, 192]. Die Geschlechterverteilung männlich/weiblich lag in dem hier genutzten Patientenkollektiv bei 1,25:1 und spiegelt die geringgradig höhere Prävalenz des Pankreaskarzinoms bei Männern wider, die auch in internationalen Erhebungen beobachtet werden konnte [99, 149, 247]. So wird das Geschlechterverhältnis männlich zu weiblich in Studien für entwickelte Länder bei 1,6:1 und für Entwicklungs- und Schwellenländer bei 1,1:1 angegeben [247].

Zwei Drittel (66,7%) der in dieser Studie herangezogenen FFPE-Gewebeproben von Pankreaskarzinompatienten entstammten dem Pankreaskopf. Lediglich in 3 von 9 Fällen (33,3%) wurden Tumorproben aus dem Pankreaskörper verwendet. Pankreaskarzinome des Pankreasschwanzes lagen in der Studienpopulation nicht vor (0%). Die Tumorlokalisation folgt hierbei weitgehend der in der Literatur angegebenen Verteilung von 60 - 70% Pankreaskopfkarzinomen, 10 - 20% Pankreascorpuskarzinomen und ca. 5 - 10% Pankreasschwanzkarzinomen [28, 146, 198]. Angesichts der überwiegenden Tumorlokalisation im Pankreaskopf verwundert es nicht, dass der Ikterus als führendes Initialsymptom (56%) in der hier zugrundeliegenden Patientenkohorte imponierte. Auch dies ist typisch für Patienten mit Pankreaskarzinom, wenn auch die meisten Studien in epigastrischen Schmerzen die führenden, initialen Beschwerden beim PDAC sehen [121, 251].

In die vorliegende Studie wurden nur Patienten mit einem nicht organisch metastasiertem Pankreaskarzinom des UICC-Stadiums II eingeschlossen. Dieses, durch Abwesenheit von Fernmetastasen und großen Gefäßinfiltrationen gekennzeichnete,

Stadium stellt auch in den groß angelegten Studien von *Ferrone et al.* [61], *He et al.* [85] sowie in zahlreichen anderen Untersuchungen das vorherrschende, noch als operabel einzustufende Tumorstadium dar. Gleichwohl handelt es sich hierbei um eine selektionierte Stichprobe, die einen Großteil aller Pankreaskarzinompatienten nicht repräsentiert, da letztere mit einem Anteil von 80-85% der Gesamtfälle schon bei Erstdiagnose als nicht kurativ operabel gelten [251]. Glaubt man einigen Studien, die für das Pankreaskarzinom eine Operationsrate von lediglich 3% – Operationen in nicht kurativer Absicht ausgenommen – postulieren, so vertritt die hier vorliegende Untersuchung nur eine Minderheit der Pankreaskarzinompatienten [97]. Dies gilt es bei der Übertragung der in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse auf die Gesamtheit der Pankreaskarzinompatienten zu berücksichtigen.

Die Patienten der hier vorliegenden Studie wurden in kurativer Intention operiert. Als Operationsverfahren kamen hierbei die pyloruserhaltende partielle Pankreatoduodenektomie (PPPD) nach Traverso und Longmire (66,7%), die partielle Pankreatoduodenektomie nach Kausch und Whipple (11,1%), die totale Pankreatektomie (11,1%) sowie die Pankreaslinksresektion (11,1%) zur Anwendung. In 75% der Fälle konnte hierdurch eine R0-Resektion erzielt werden, in den restlichen Fällen lag eine R1-Resektion vor. Einheitliche Daten hinsichtlich des Resektionsstatus existieren aktuell nicht: Während *Butturini et al.* [36] in ihrer Studie eine R0-Resektionsrate von 68% und eine R1-Resektionsrate von 32% angeben, beziffern *Menon et al.* [159] den Anteil der R1-Resektionen mit 82% deutlich höher, als den der R0-Resektionen mit nur 18%. Der Grund für diese Diskrepanzen ist hierbei in der jeweiligen pathologischen Aufarbeitung der OP-Präparate sowie in der zum Teil uneinheitlichen Definition des R1-Status zu sehen. Insbesondere die retroperitoneale Tumorausbreitung wird häufig unterschiedlich bewertet, woraus sich differierende Einteilungen ergeben können [241].

Die adjuvante Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin, die bei 8 von 9 Patienten (89%) dieser Studie im Anschluss an die Operation durchgeführt wurde, stellt eine im europäischen Raum übliche Behandlung nach R0-/R1-Resektion von

Pankreaskarzinomen dar [4]. Somit entspricht das Patientenkollektiv auch in diesem Gesichtspunkt der PDAC-Normalpopulation – zumindest im europäischen Raum, da in den USA die adjuvante Radiochemotherapie als Goldstandard der Pankreaskarzinomtherapie gilt [113].

Nach erfolgter Operation und unter adjuvanter Chemotherapie konnte für die PDAC-Patienten dieser Studie eine mediane rezidivfreie Zeit von 10,5 Monaten (Kaplan-Meier-Schätzer) beobachtet werden. Die Rezidive traten hierbei am häufigsten in Form von Leber- und Lungenmetastasen, gefolgt von lokalen Tumorrezidiven in Erscheinung. Dem gegenüber beobachteten *Sperti et al.* [220], die sich 1997 mit der Rezidivhäufigkeit nach durchgeführter partieller Pankreatoduodenektomie (Kausch-Whipple und Traverso-Longmire) auseinandersetzten, vor allem ein frühzeitiges Auftreten lokaler Rezidive. Aber auch Lebermetastasen stellen *Sperti et al.* zufolge eine führende Rezidivform des Pankreaskarzinoms dar. Die mittlere rezidivfreie Zeit gaben *Sperti et al.* mit 8 Monaten an, wobei diese in Abwesenheit adjuvanter Therapien ermittelt wurde. Während die vorliegende Untersuchung keinen Zusammenhang zwischen dem Resektionsstatus und der nodalen Metastasierung auf der einen und der rezidivfreien Zeit auf der anderen Seite eruieren konnte, legen zahlreiche andere Studien eine deutliche Einflussnahme von Resektions- und Nodalstatus auf die rezidivfreie Zeit sowie das Gesamtüberleben nahe [102, 159, 220].

Für das Patientenkollektiv dieser Studie konnte – unter Verwendung des Kaplan-Meier-Schätzers – eine mediane Überlebenszeit von 13,5 Monaten ermittelt werden. Damit liegt die hier beobachtete Überlebenszeit knapp unter den Angaben anderer Studien: *Butturini et al.* [36] gaben in ihrer Untersuchung aus dem Jahr 2008 die Überlebenszeit nach R0-Resektion mit 15,9 Monaten und nach R1-Resektion mit 14,1 Monaten an, vergleichbar mit *Menon et al.* [159], die nach R1-Resektion eine Überlebenszeit von 14,0 Monaten ermittelten. Dass die Überlebenszeiten nach kurativer Operation über Jahre hinweg nahezu unverändert geblieben sind, belegen aktuelle Studien: So bezifferten *Speer et al.* [219] die Gesamtüberlebenszeit nach Whipple-Operation im Jahr 2012 auf 16,3 Monate – ein Wert, der sich über Jahre hinweg nur unwesentlich

gebessert hat. *He et al.* [85] bestätigten diese Daten, wiesen jedoch zusätzlich auf die Abhängigkeit der Überlebenszeit vom Patientenalter hin. So konnte für Patienten im Alter von über 70 Jahren eine postoperative Überlebenszeit von 16 Monaten und für Patienten unter 45 Jahren ein medianes Überleben von 19 Monaten beobachtet werden. Langzeitüberlebende stellen nach wie vor seltene Ausnahmen beim Pankreaskarzinom dar, wobei die Zahlen sehr stark schwanken: Während *Speer et al.* [219] den Anteil der Überlebenden nach 5 Jahren mit 2,6% veranschlagten und diese nach Bereinigung vermutlich falsch-positiver Diagnosen auf 1,3% absenkten, stellten *Ferrone et al.* [61] ein 5-Jahres-Überleben von 19% aller behandelten PDAC-Patienten heraus. Dass dieses keinesfalls mit einer Heilung gleichzusetzen ist, mussten *Ferrone et al.* in der gleichen Untersuchung bekennen, da sie zusätzlich beobachteten, dass die Hälfte der 5-Jahres-Überlebenden in den nachfolgenden 5 Jahren ebenfalls verstorben. Somit bleibt die Prognose des Pankreaskarzinoms weiterhin schlecht, auch wenn *Kent et al.* [110] betonen, dass mit jedem überlebten Monat die Chance auf ein längerfristiges Überleben steigt (= bedingtes Überleben).

Die im Vergleich zu anderen Studien niedrigere Überlebenszeit des Patientenkollektives lässt sich mit dem hohen Anteil nodal-metastasierter Patienten (7/9) erklären. Ansonsten ist die hier untersuchte, auf Patienten nach kurativer Resektion beschränkte, Population als weitgehend äquivalent zu denen anderer Studien zu werten. Hinweise auf größere Abweichungen von der Normalpopulation liegen nicht vor.

6.2.2 *Patienten mit chronischer Pankreatitis*

Das erst seit 1983 einheitlich definierte Krankheitsbild der chronischen Pankreatitis ist durch entzündlich bedingte, irreversible Strukturveränderungen des Pankreasparenchyms mit Umwandlung desselben in fibrotisches Gewebe, konsekutiver exokriner Insuffizienz sowie abdominellen Schmerzen gekennzeichnet [13]. In der vorliegenden Studie wurden Gewebeproben von 7 Pankreatitis-Patienten untersucht.

Zum Zeitpunkt der Operation betrug das mittlere Alter der Patienten dieses Studienkollektives 47,9 Jahre. Der Zeitpunkt der Erstdiagnose einer chronischen Pankreatitis ist hierbei deutlich früher anzusiedeln: *Pedrazzoli et al.* [188] geben in ihrer Studie die durchschnittliche präoperative Erkrankungszeit mit 4,1 Jahren an, so dass auch für das hier zugrundeliegenden Patientenkollektiv von einem mittleren Erkrankungsbeginn im Alter von Anfang bis Mitte Vierzig auszugehen ist. Dies deckt sich mit den Daten anderer Studien, die das mittlere Erkrankungsalter ebenfalls in diesem Bereich einordnen. Sich auf die Patientendaten aus den Jahren 1988 bis 1995 im Lüneburger Land stützend, gaben *Lankisch et al.* [126] das mittlere Manifestationsalter der chronischen Pankreatitis mit 46,7 Jahren an. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch *Lowenfels et al.* [147] wie auch *Pedrazzoli et al.* [188], die das mittlere Alter bei Diagnosestellung auf 44,6 bzw. 45 Jahre bezifferten.

Die Pankreatitis-Kohorte dieser Studie wies einen ausgeprägten Überhang an Männern auf, das Geschlechterverhältnis männlich zu weiblich betrug 6:1. Wenn auch dieses Verhältnis ein wenig hochgegriffen erscheint – andere Studien taxieren dieses auf etwa 4:1 – so ist dennoch die deutlich höhere Prävalenz der chronischen Pankreatitis für Männer in der Literatur klar belegt [126, 147]. Letzteres ist vermutlich auf den bei Männern höheren Alkohol- und Nikotinkonsum zurückzuführen. Interessant ist hierbei, dass chronische Pankreatitis und Pankreaskarzinom hinsichtlich des Geschlechterverhältnis deutlich differieren: Obgleich Alkohol- und Nikotinabusus sowohl bei der chronischen Pankreatitis, als auch beim Pankreaskarzinom bedeutende Risikofaktoren darstellen, fällt der Männerüberhang beim Pankreaskarzinom mit 1:1 bis 1,6:1 deutlich niedriger aus.

Die pyloruserhaltende Pankreatoduodenektomie nach Traverso-Longmire war die mit Abstand häufigste Operation ($n = 4$), die bei der Studienpopulation durchgeführt wurde. Es folgten die Pankreatoduodenektomie nach Kausch-Whipple, die laterolaterale Pankreatikojejunostomie nach Partington-Rochelle sowie eine lokale Exzision mit jeweils einem Patienten dieser Studie ($n = 1$). Der große Anteil an partiellen Pankreatoduodenektomien ist dadurch zu erklären, dass 4 von 7 Patienten unter der

Verdachtsdiagnose eines Malignoms, am ehesten eines PDAC, operiert wurden, dieses jedoch postoperativ ausgeschlossen und die Diagnose „chronische Pankreatitis“ gesichert werden konnte. Von solchen Fällen abgesehen, stellen Komplikationen (z.B. Pankreaspseudozysten) und therapierefraktäre Schmerzen die häufigsten Indikationen zur chirurgischen Intervention bei chronischer Pankreatitis dar [13]. Bevorzugt kommen hierbei neben Pankreasdrainageoperationen nach Partington-Rochelle duodenumerhaltende Pankreaskopfresektionen zur Anwendung (Operation nach Beger, Operation nach Frey), da diese – so stellen es *Zheng et al.* [262] in ihrer Studie heraus – im Vergleich zu den partiellen Pankreatoduodenektomie in Bezug auf postoperative Morbidität und Lebensqualität besser abschneiden. Nichtsdestoweniger haben auch die partiellen Pankreatoduodenektomien ihre Berechtigung in der Pankreatitischirurgie und stellen beispielsweise bei der Groove-Pankreatitis – einer Sonderform der chronischen Pankreatitis mit Affektion von Duodenum und Papilla minor – die bevorzugten Operationsverfahren dar [132].

Follow-up-Daten zu den Pankreatitis-Fällen standen dieser Untersuchung nicht zur Verfügung, entsprechende Analysen, wie z.B. zum Überleben, wurden dementsprechend nicht vorgenommen. Dennoch ist es lohnenswert, an dieser Stelle einen kurzen Blick auf das Überleben und den Langzeitverlauf von Patienten mit chronischer Pankreatitis zu werfen: *Pedrizzoli et al.* [188] untersuchten diesbezüglich 174 chirurgisch behandelte Patienten mit chronischer Pankreatitis und ermittelten für diese ein mittleres Überleben von 16,7 Jahren nach Operation. Des Weiteren beobachteten sie, dass 23,3% der untersuchten Pankreatitis-Patienten ein Krebsleiden entwickelten und an diesem verstarben. Der Anteil an Pankreaskarzinomen wurde hierbei nicht angegeben. Schenkt man *Lowenfels et al.* [147] und *Raimondi et al.* [193] Glauben, so entwickelt nur eine Minderheit der Patienten mit chronischer Pankreatitis (2% bzw. 5%) ein Pankreaskarzinom, obgleich das Risiko für dieses deutlich höher ist, als in der Normalbevölkerung. Diesem Umstand Rechnung tragend, empfehlen weder die Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) noch die United States Preventive Service Task Force (USPSTF) derzeit ein generelles, auf eine Früherkennung des Pankreaskarzinoms ausgerichtetes, Screening von Pankreatitis-Patienten [4, 92, 193]. Der Einsatz von Biomarkern zur kostengünstigen, noninvasiven

Diagnostik könnte allerdings ein Umdenken herbeiführen: Auch für dieses Gebiet erscheint ein MicroRNA-basiertes Screeningverfahren erstrebenswert, sollte dieses in der Lage sein, mit hoher Sensitivität und Spezifität Pankreaskarzinome bei Pankreatitis-Patienten zu identifizieren.

Unter Berücksichtigung der oben genannten, aus verschiedenen Studien stammenden Daten muss auf nicht unwesentliche Diskrepanzen der Pankreatitis-Gruppe zur erwarteten Normalpopulation verwiesen werden: Die Dominanz männlicher Patienten sowie der hohe Anteil an radikalen Operationen (Traverso-Longmire / Kausch-Whipple) stellen Abweichungen von der durchschnittlichen Pankreatitis-Konstellation dar. Einen Einfluss dieser Abweichungen auf die Ergebnisse kann freilich gemutmaßt werden, Hinweise hierfür finden sich jedoch nicht.

6.2.3 Die Kontrollgruppe der gesunden Pankreata

Die als Kontrolle eingesetzte Gruppe der gesunden Pankreata umfasste in dieser Studie lediglich 3 Patienten. Diese geringe Patientenzahl ist dem Umstand geschuldet, dass es nur wenige Indikationen für eine Resektion von gesundem Pankreasgewebe gibt und dementsprechend der Umfang von in pathologischen Archiven lagernden gesunden Pankreaspräparaten relativ überschaubar ist. Lediglich im Falle traumatischer oder iatrogenen Pankreasverletzungen sowie im Rahmen einiger Splenektomien findet eine Resektion des gesunden Pankreasgewebes statt. Die hier vorliegende Studie stützt sich auf gesunde Pankreasproben, die dem Pankreasschwanz entnommen sind. Die Entfernung desselben erfolgte in 2 Fällen im Rahmen einer Splenektomie und in einem Fall bei iatrogen verletztem Pankreas.

Zum Zeitpunkt der Operation waren die Patienten im Mittel 48,6 Jahre alt. Damit entspricht die Gruppe hinsichtlich des Alters weitgehend der Gruppe der chronischen Pankreatitiden, stellt sich aber im Vergleich zu den PDAC-Patienten deutlich jünger dar.

Die häufigste Operation, die in dieser Gruppe vorgenommen wurde, war die Splenektomie. Sie erfolgte hierbei zur Kuration einer symptomatischen Milzzyste sowie zu diagnostischen Zwecken. Beide Indikationen machen nur etwa 4,7% aller Splenektomien aus, wie *Rose et al.* [197] zu berichten wissen. Da hämatologische Erkrankungen sowie traumatische Milzverletzungen die häufigsten Indikationen zur Splenektomie darstellen, wird letztere vorwiegend in jüngeren bis mittleren Jahren durchgeführt – *Glass et al.* [70] geben das Durchschnittsalter hierbei mit 48,7 Jahren an. Dies ist nahezu deckungsgleich mit dem hier ermittelten Altersdurchschnitt von 48,6 Jahren.

Der geringe Umfang ($n = 3$) dieser Kontrollkohorte erschwert die Vergleichbarkeit mit der Gruppe der Pankreaskarzinome ($n = 9$) und der chronischen Pankreatitiden ($n = 7$). Allerdings ist der Einsatz von FFPE-Geweben des gesunden Pankreas trotz eingangs erwähnter Akquisitionsschwierigkeiten als alternativlos anzusehen, da ausschließlich mit diesen ein geeigneter Vergleich der MicroRNA-Expression gewährleistet werden kann. Der Einsatz von humanen Pankreas-Zellkulturen als Kontrolle verbot sich hierbei, da diese aufgrund ihrer starken Neigung zur Seneszenz fast ausschließlich in genetisch-manipulierter Form erhältlich sind. Dies wiederum führt einen validen Vergleich der MicroRNA-Expression ad absurdum. Zudem können Zell-Zell-Interaktionen in Zellkulturen nicht in der Form nachgebildet werden, wie sie in vivo vorliegen [238]. Aus diesem Grund ist der geringe Patientenumfang trotz der zu erwartenden Einschränkungen der Aussagekraft hinzunehmen, um mit FFPE-Geweben ein möglichst originalgetreues Abbild der zellulären Funktion des Pankreas zu erhalten.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Studie war es, die MicroRNA-Expression des Pankreaskarzinoms (PDAC), der chronischer Pankreatitis und des gesundem Pankreas vergleichend gegenüberzustellen und MicroRNAs zu identifizieren, die aufgrund ihres Expressionsprofils potentielle Biomarker des Pankreaskarzinoms darstellen. Mit dem Fokus auf Tumorzellen bzw. nicht-neoplastischen, duktalem Epithelien sollte hierbei sichergestellt werden, dass Unterschiede in der MicroRNA-Expression ausschließlich

die unterschiedlichen Entitäten und nicht die Differenzen zwischen verschiedenen Zelltypen widerspiegeln.

Nachfolgend sollen die hier ermittelten Ergebnisse unter Berücksichtigung möglicher Einflussfaktoren beurteilt und im Kontext zu anderen Studien diskutiert werden. Hierbei ist anzumerken, dass es aktuell keine Studie mit dem gleichen Design, wohl aber einige Untersuchungen mit Überschneidungen hinsichtlich der Methodik (FFPE-Gewebe von PDAC, CP und gesundem Pankreas / Laser-Mikrodissektion / Untersuchung duktaler Epithelien bzw. von Tumorzellen / qRT-PCR zur MicroRNA-Analyse) gibt.

6.3.1 Allgemeine Betrachtung der MicroRNA-Expression

Die duktales Adenokarzinome des Pankreas exprimierten in dieser Studie im Durchschnitt die meisten MicroRNAs. Dies ist auf den ersten Blick nicht weiter verwunderlich, da lediglich MicroRNAs untersucht wurden, deren Überexpression im Pankreaskarzinom bereits mehrfach beschrieben wurde. Beginnend mit *Volinia et al.* [243], die als erste überhaupt im Jahr 2006 die MicroRNA-Expression des Pankreaskarzinoms untersuchten, bis hin zu *Schultz et al.* [207], die mit ihrer 2012 veröffentlichten Studie zuletzt einen Überblick über die dysregulierten MicroRNAs des Pankreaskarzinoms lieferten, ist die Überexpression von miR-21, miR-155, miR-196a sowie der MicroRNA-200-Familie im duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) durch zahlreiche Studien gut belegt [26, 48, 109, 129, 258, 261]. Auf den zweiten Blick ist die durchschnittlich stärkere Expression der untersuchten MicroRNAs in den Pankreaskarzinomen dennoch bemerkenswert: Zwar lässt sich für die einzelnen MicroRNAs – ausgenommen für miR-196a – die Überexpression im PDAC gegenüber der chronischen Pankreatitis und dem gesunden Pankreas in dieser Studie nicht bestätigen, jedoch weist die Gesamtheit der hier untersuchten MicroRNAs eine im Mittel höhere Expression in den Pankreaskarzinomzellen auf, als dies bei den duktales Epithelzellen von gesundem Pankreas oder chronischer Pankreatitis der Fall ist. Dies ist umso mehr erstaunlich, als für miR-21*, miR-155 und miR-196a auf der einen und der MicroRNA-200-Familie auf der anderen Seite überwiegend gegensätzliche Einflüsse geltend gemacht werden. So fördern miR-21*, miR-155 und miR-196a die Entartung

und die Tumorausbreitung, während die MicroRNA-200-Familie als Gegenspieler der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) gilt und damit einer weiteren Entdifferenzierung prinzipiell entgegensteht [184, 191, 222, 260]. Aufgrund dieser Eigenschaft wird der MicroRNA-200-Familie von den meisten Autoren eine vorwiegend tumorsupprimierende Wirkung zugeschrieben. Die Stabilisierung des epithelialen Phänotyps, das als tumorsupprimierendes Charakteristikum der MicroRNA-200-Familie betrachtet wird, kann jedoch unter Umständen auch einen genau diametralen Effekt erzielen: So scheint die MicroRNA-200-Familie einen positiven Einfluss auf die Koloniebildung von Zellen zu haben, die bereits eine metastatische Absiedlung vollzogen haben [53, 187]. Dies wiederum würde bedeuten, dass die MicroRNA-200-Familie sowohl onkogen, als auch tumorsupprimierend wirken kann. Im Gegensatz zur Tumorsuppression stehen Belege für die Onkogenität der MicroRNA-200-Familie im Pankreaskarzinom jedoch noch aus.

Eine andere Erklärung dafür, dass parallel zu den onkogenen MicroRNAs auch solche mit vorwiegend tumorsupprimierender Wirkung im Pankreaskarzinom überexprimiert sind, könnte in Veränderungen des MicroRNA-Biosyntheseapparates bestehen [25]. Mutationen, die zu einer veränderten Konzentration oder gestörten Funktion der an der MicroRNA-Biosynthese beteiligten Enzyme und Proteine führen, könnten hierbei in der Tat eine Dysregulation vieler – wenn nicht gar aller – in der jeweiligen Zelle exprimierten MicroRNAs bewirken. So bieten insbesondere die RNasen Drosha und Dicer, aber auch Enzyme wie die Polymerase II und die Helikase sowie die Argonaute-Proteine Angriffspunkte für Mutationen, die in einer veränderten MicroRNA-Expression gipfeln (*Abbildung 31*). Die Auswirkungen derartiger Mutationen im Biosyntheseapparat von MicroRNAs wurden u.a. von *Wang et al.* [246] untersucht: Nach Knockdown von Dicer-1 in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien verzeichneten sie eine gesteigerte p53-Bildung bei gleichzeitiger Minderexpression mehrerer onkogener MicroRNAs. *Wang et al.* verwiesen jedoch zusätzlich darauf, dass dies kein allgemeingültiger Mechanismus der PDAC-Entstehung sein kann, da die Expression von Onkogenen, OncomiR's und Dicer 1 zwischen den jeweiligen Zelllinien in ihrer Studie zu stark differierte, um von einem gemeinsamen molekularen

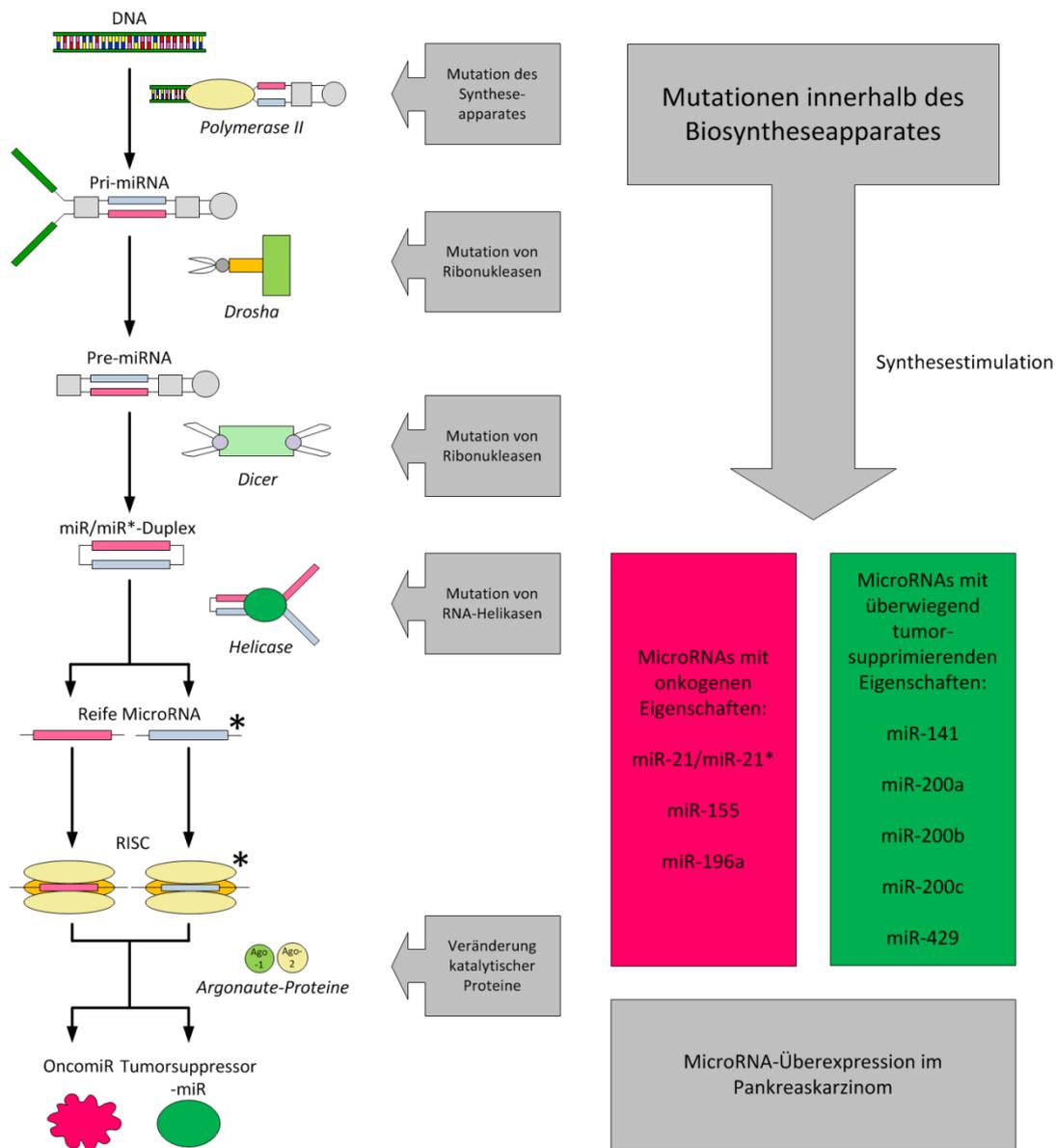


Abbildung 31: Mögliche Mutationen im Biosyntheseapparat von MicroRNAs und ihre Auswirkungen auf die Expression

Mutationen innerhalb des MicroRNA-Biosyntheseapparates können die gesamte MicroRNA-Expression beeinflussen. Wichtige Schnittstellen der Biosynthese, die im Falle einer Mutation die allgemeine MicroRNA-Expression am deutlichsten beeinflussen, sind *RNA-Polymerase II*, *Drosha*, *Dicer*, *Helicase* sowie die *Argonaute-Proteine*. Dass im Pankreaskarzinom sowohl onkogene, wie auch tumorsupprimierende MicroRNAs überexprimiert vorliegen, könnte hierbei auf derartige Mutationen des Biosyntheseapparates zurückzuführen sein.

Pathomechanismus auszugehen. *Bhatti et al.* [23] stellten angesichts ähnlicher Beobachtungen die Hypothese auf, dass einige MicroRNAs im PDAC konstant dysreguliert vorliegen, während andere wiederum eine individuelle, an einzigartige Gegebenheiten des jeweiligen Tumors gebundene Expression aufweisen. Nach wie vor ist jedoch unklar, auf welchem Mechanismus die Dysregulation von MicroRNAs in Pankreaskarzinomen beruht und welche Rolle individuellen Faktoren hierbei spielen.

6.3.2 Die Rolle von miR-21* im duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Die hier vorliegende Studie ist auf wenige MicroRNAs fokussiert. Eine hiervon stellt miR-21* dar. Während die miR-21*-Expression in Pankreaskarzinomen bisher nicht thematisiert wurde, ist für ihr dominantes Pendant – miR-21 – eine wichtige Rolle im PDAC und anderen Malignomen klar belegt. Mit dem Nachweis einer miR-21-Überexpression in Glioblastomen rückten *Chan et al.* [40] miR-21 erstmalig in das Blickfeld onkologischer Forschung. Zusätzlich fanden sie heraus, dass die MicroRNA-21 durch Inhibierung von Caspasen eine antiapoptotische Wirkung erzielt. Dass die miR-21-Überexpression weniger das Charakteristikum eines, als vielmehr das Kennzeichen zahlreicher Malignome ist, stellten kurze Zeit später *Volinia et al.* [243] heraus, die eine Überexpression von miR-21 in Mammakarzinom-, Kolonkarzinom-, Bronchialkarzinom-, Prostatakarzinom-, Magenkarzinom- und Pankreaskarzinomgeweben beobachteten. Spätestens seit der Untersuchung von *Dillhoff et al.* [48] gilt miR-21 als eine der am stärksten exprimierten MicroRNAs des Pankreaskarzinoms, deren Überexpression zudem mit einer schlechteren Prognose assoziiert wird. Während *Dillhoff et al.* jedoch keinen Zusammenhang zwischen der miR-21-Expression und der Tumorgröße sowie dem UICC-Stadium ausmachen konnten, wiesen *Bhatti et al.* [23] eine Korrelation von miR-21-Expression und Tumorprogression nach. Des Weiteren gilt miR-21 als eine wichtige Einflussgröße der Chemoresistenz. *Park et al.* [183] steigerte den antiproliferativen Effekt des Chemotherapeutikums Gemcitabin durch Inhibition von miR-21 und stellten damit die Bedeutung von miR-21 in der Vermittlung von Chemoresistenzen heraus. In umgekehrter Weise beobachteten *Giovannetti et al.* [68] nach pre-miR-21-Transfektion einen sprunghaften Anstieg der Resistenz von Pankreaskarzinomzellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Gemcitabin.

In dieser Studie konnte eine signifikante Überexpression der MicroRNA miR-21* im Pankreaskarzinom gegenüber der chronischen Pankreatitis ($p = 0,091$) und den gesunden Pankreasgeweben ($p = 0,209$) nicht nachgewiesen werden. Dies steht in deutlichen Widerspruch zu zahlreichen Publikationen, in denen eine Überexpression von miR-21 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas bereits beschrieben wurde. So wiesen *Volinia et al.* [243] erstmalig eine Überexpression von miR-21 in PDAC-Gewebeproben verglichen mit gesunden Pankreasgewebeproben nach. *Bloomston et al.* [26] verglichen FFPE-Gewebe des Pankreaskarzinoms mit denen von chronischer Pankreatitis sowie von „gesundem“ Pankreas und konnten hierbei ebenfalls eine Überexpression an miR-21 im PDAC beobachten. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass es sich bei den benignen Kontrollproben hierbei keinesfalls um solche von gesunden Pankreata handelte, sondern vielmehr um mikroskopisch unauffällige Pankreasabschnitte in direkter Nachbarschaft zum Pankreaskarzinom. In ähnlicher Weise wie *Bloomston et al.* [26] verfahren auch *Dillhoff et al.* [48], *Panarelli et al.* [181] und *Papaconstantinou et al.* [182], die allesamt eine miR-21-Überexpression in FFPE-Proben des Pankreaskarzinoms bestätigen konnten. Auch für frisch-gefrorene PDAC-Gewebe sowie für PDAC-Zellkulturen wurde bereits der Nachweis einer Überexpression an miR-21 erbracht. Exemplarisch können hier die Untersuchungen von *Lee et al.* [129] und *Bhatti et al.* [23] genannt werden. Berücksichtigt man die Vielzahl an Studien, die eine übermäßige Expression von miR-21 in Pankreaskarzinomen herausstellten, so lässt sich diese als typisches epigenetisches Phänomen von Pankreaskarzinomen werten. In der hier vorliegenden Studie wurde die im Allgemeinen beobachtete Überexpression von miR-21 in Pankreaskarzinomen hingegen nicht beobachtet. Dafür lassen sich mehrere Erklärungen finden:

1.) Untersuchung von miR-21* anstelle von miR-21

Die vorliegende Untersuchung konzentrierte sich auf miR-21* (= hsa-miR-21-3p), die „Minor“-Variante der MicroRNA-21-Familie. Diese gilt im Vergleich zu ihrem Pedant miR-21 (= hsa-miR-21-5p) als untergeordnete Form, die in den meisten Zellen in

geringerer Konzentration vorliegt und somit als biologisch weniger wirksam erachtet wird. Die im Allgemeinen geringere Expression von miR-21* könnte der Grund dafür sein, dass eine miR-21-Überexpression des Pankreaskarzinoms in dieser Studie nicht nachgewiesen werden konnte. Obwohl nicht signifikant überexprimiert, konnten erhöhte Konzentrationen von miR-21* gegenüber der chronische Pankreatitis und dem Normalgewebe in 5 von 9 Pankreaskarzinomen beobachtet werden. Dies weist daraufhin, dass miR-21* ebenfalls eine wichtige, wenn auch im Vergleich zu miR-21 geringer bedeutende Rolle im duktalem Adenokarzinom des Pankreas zukommt. Für ihre Zielgene Bcl-2 und CDK6 wurde jedenfalls eine Beteiligung am Pankreaskarzinom bereits nachgewiesen [1, 49, 130].

2.) Fehlende Signifikanz aufgrund der geringen Fallzahl

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden 9 Pankreaskarzinome, 7 Gewebe mit histologisch-gesicherter chronischer Pankreatitis sowie 3 gesunde Pankreasproben analysiert. Diese relativ geringe Fallzahl könnte die Ursache dafür sein, dass eine mit dem Pankreaskarzinom assoziierte Überexpression von miR-21* in dieser Studie nicht beobachtet wurde. Um signifikante Unterschiede in Untersuchungen mit geringem Probenumfang herausstellen zu können, müssen diese von erheblichem Ausmaß sein. Für miR-21* konnte lediglich eine Überexpression in 5 von 9 Pankreaskarzinomen gefunden werden – entsprechend einer Überexpression in 56% der Fälle. Es kann darüber spekuliert werden, ob Untersuchungen mit größerer Fallzahl nicht dennoch einen signifikanten Unterschied in der Expression von miR-21* zwischen Pankreaskarzinom einerseits und chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas andererseits aufzeigen können. Die relativ niedrigen Signifikanzwerte von $p = 0,091$ zwischen PDAC und chronischer Pankreatitis und $p = 0,209$ zwischen PDAC und gesundem Pankreas weisen darauf hin, dass eine Steigerung der Fallzahl womöglich doch zu dem Ergebnis einer miR-21*-Überexpression des Pankreaskarzinoms führen kann.

3.) Ausschluss azinärer Zellen

Während zwischen PDAC und gesunden duktalem Zellen kein signifikanter miR-21*-Expressionsunterschied beobachtet werden konnte, ließ sich ein solcher jedoch

zwischen PDAC und gesunden azinären Zellen ($p = 0,036$) nachweisen. Dies mag eine Erklärung dafür darstellen, dass in Untersuchungen, in denen Pankreasparenchymsdissektate einschließlich Azinuszellen als gesunde Kontrollen verwendet wurden, eine Überexpression von miR-21 im Pankreaskarzinom aufgezeigt werden konnte.

4.) Hypothese einer stromalen Herkunft von miR-21 und miR-21*

Der Fokus dieser Untersuchung lag auf den dukталen Epithelzellen des Pankreas sowie auf den Tumorzellen des PDAC. Damit grenzt sich diese Studie deutlich von anderen Untersuchungen ab, bei denen die Analyse der MicroRNA-Expression lediglich aus Gewebeständen des Pankreaskarzinoms, einschließlich stromaler Komponenten, erfolgte. Die im Rahmen dieser Untersuchung ermittelten Expressionswerte lassen sich somit ausschließlich auf die Karzinom- und Duktuszellen beziehen. Zellen stromaler Herkunft wurden in dieser Studie explizit ausgeschlossen. Dass miR-21* nicht in der Weise überexprimiert vorlag, wie es andere Studien für miR-21 postulieren, kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass miR-21* sowie evtl. auch miR-21 überwiegend im Stroma des Pankreaskarzinoms exprimiert werden. Diese Hypothese lässt sich hierbei durch zwei wesentliche Argumente stützen: Das erste Argument für eine stromale Herkunft von miR-21/miR-21* ist die durch zahlreiche Publikationen belegte Förderung der Metastasierung durch miR-21 [263]. In den Metastasierungsprozess wiederum ist in erheblichem Maße das Tumorstroma eingebunden: Fibroblasten und Myofibroblasten scheinen hierbei eine wichtige Position einzunehmen. Eine Überexpression von miR-21 / miR-21* in stromalen Zellen könnte somit entscheidende Prozesse in Gang setzen, die eine Invasion von Karzinomzellen beflügeln und letztlich die Metastasierung vorantreiben. Als zweites Argument für eine stromale Herkunft von miR-21 / miR-21* lassen sich mehrere Studien anführen, in denen eine deutlich erhöhte miR-21-Expression im Stroma verschiedener Tumoren nachgewiesen werden konnte. So bestimmten *Nielsen et al.* [173] hohe Expressionswerte von miR-21 im Stroma kolorektaler Karzinome, die im Durchschnitt 6fach über den gemessenen Werten der Karzinomzellen und des gesunden Gewebes lagen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch *Rask et al.* [194], welche die miR-21-Expression im Stroma von

Mammakarzinomen untersuchten. Auch hier konnte eine starke Expression von miR-21 in stromalen, Fibroblasten-ähnlichen Zellen beobachtet werden, während die eigentlichen Tumorzellen keine übermäßige miR-21-Expression aufwiesen. Einen maßgeblichen Einfluss auf das Tumorstroma attestierten auch *Yao et al.* [255] der MicroRNA miR-21. Nach Stimulation mit TGF- β , einem Wachstumsfaktor, der maßgeblich die Differenzierung von Zellen beeinflusst, insbesondere die Umwandlung in Myofibroblasten, verzeichneten *Yao et al.* einen signifikanten Anstieg der miR-21-Expression in Fibroblasten. Zugleich gelang ihnen der Nachweis, dass mit ansteigender, durch TGF- β induzierter miR-21-Expression das Tumorsuppressor-Gen PDCD4 in Fibroblasten zunehmend inhibiert wird. *Yao et al.* schlossen hieraus, dass die MicroRNA miR-21 über eine negative Regulation von PDCD4 einen starken Einfluss auf die TGF- β -induzierte Umwandlung von Zellen in Myofibroblasten ausübt. Die stromalen Myofibroblasten wiederum seien ausschlaggebend für die Invasion und Angiogenese von Malignomen, so dass ein mehrstufiger Prozess von stromaler miR-21-Überexpression über PDCD4-Inhibition und Myofibroblastenvermehrung zu einer zunehmenden Ausbreitung der Karzinomzellen vermutet werden kann [255] (*Abbildung 32*). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass zahlreiche Evidenzen für einen stromalen Ursprung der miR-21-Überexpression in Tumoren, einschließlich des Pankreaskarzinoms, vorliegen. Dies indes kann der Grund dafür sein, dass in der vorliegenden Untersuchung bei alleiniger Betrachtung der Tumorzellen bzw. der duktaalen Epithelzellen eine miR-21-Überexpression nicht nachgewiesen werden konnte.

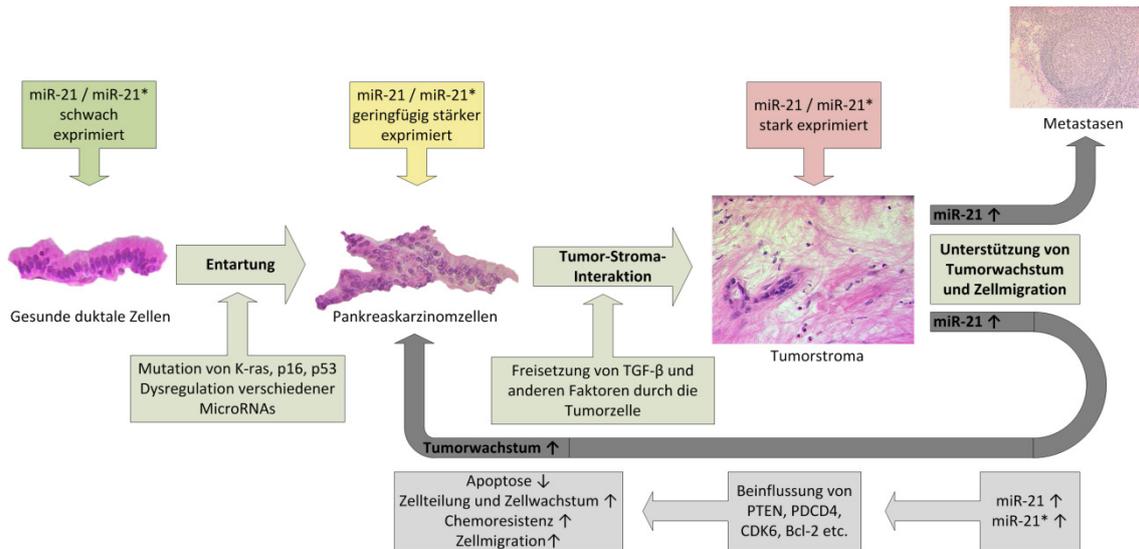


Abbildung 32: Hypothetisches Modell einer miR-21 / miR-21* vermittelten Tumor-Stroma-Interaktion

In der hier vorliegenden Untersuchung konnte eine Überexpression von miR-21* in den Karzinomzellen nicht nachgewiesen werden. Zahlreiche andere Studien belegen hingegen eine Überexpression von miR-21 im Tumorstroma. Fasst man die Ergebnisse dieser und anderer Studien zusammen, so lässt sich folgende Hypothese formulieren: Im Rahmen der neoplastischen Entdifferenzierung setzt die Tumorzelle Faktoren (z.B. TGF-β) frei, die in den stromalen Zellen eine verstärkte Expression von miR-21 / miR-21* bewirken und hierüber zu einer verstärkten Bildung von Myofibroblasten und anderen stromalen Komponenten führen. Dies wiederum fördert die Metastasierung, Angiogenese und lokale Invasion des Pancreaskarzinoms. Folgt man dieser Hypothese, so stellt die stromale Überexpression von miR-21 / miR-21* eine Schlüsselposition der Tumor-Stroma-Interaktion dar.

Die Expression von miR-21* korrelierte signifikant mit der von miR-196a und der von miR-141 – jedoch auf einem sehr niedrigen Niveau ($r < 0,5$). Es ist somit fraglich, ob diesem Zusammenhang eine Bedeutung beigemessen werden sollte oder es sich lediglich um eine dem Zufall geschuldete Beobachtung handelt. Eine Korrelation der miR-21- / miR-21*-Expression und der miR-196a-Expression erscheint hierbei als noch am meisten wahrscheinlich, da beide MicroRNAs als onkogen gelten und eine gemeinsame Überexpression in mehreren Untersuchungen bereits nachgewiesen werden konnte [26, 115]. Ein Zusammenhang zwischen der Expression von miR-21* und miR-141 ist hingegen stark in Zweifel zu ziehen, da für die jeweiligen MicroRNAs ein

gegenteiliger Effekt geltend gemacht wird: Während miR-21 / miR-21* als förderlicher Faktor der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) angesehen wird, ist für miR-141 als Vertreter der MicroRNA-200-Familie ein inhibierender Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) belegt [18, 34].

Mit einer, im Rahmen der ROC-Analyse ermittelten und auf den Nachweis von Pankreaskarzinomen bezogenen AUC (= area under the curve) von 0,803 ist miR-21* als potentieller Biomarker des Pankreaskarzinoms zu betrachten ($p = 0,018$). Allerdings ist die diagnostische Leistungsfähigkeit von miR-21* stark begrenzt, da diese nur bei sehr hohen Konzentrationen zum Tragen kommt. Dennoch kann eine hohe, in pankreatischen Zellen duktaler Morphologie nachgewiesene Konzentration an miR-21* als Hinweis auf das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms verstanden werden. Dem Pendant miR-21 schrieben bereits *Dillhoff et al.* [48] einen differentialdiagnostischen Nutzen hinsichtlich der Abgrenzung des Pankreaskarzinoms von der chronischen Pankreatitis und dem gesunden Pankreas zu. Mit dem Nachweis erhöhter miR-21-Konzentrationen in intraepithelialen Neoplasien des Pankreas (PanIN) gingen *du Rieu et al.* [50] sogar einen Schritt weiter und zogen miR-21 als möglichen Biomarker zur Früherkennung von Pankreaskarzinomen in Betracht. Auch in intraduktalen papillären muzinösen Neoplasien (IPMN), die ebenfalls als Vorläufer des Pankreaskarzinoms gelten, konnten *Ryu et al.* [200] sowie *Caponi et al.* [38] eine miR-21-Überexpression nachweisen und unterstrichen damit das diagnostische Potential dieser MicroRNA. Die Befähigung zur Früherkennung von Pankreaskarzinomen kann miR-21* durch diese Untersuchung hingegen nicht zugesprochen werden, da sowohl PanINs, als auch IPMNs nicht Gegenstand dieser Studie waren.

Weder auf die rezidivfreie, noch auf die gesamte Überlebenszeit konnte in dieser Untersuchung ein Einfluss von miR-21* festgestellt werden. Dies ist opponierend zu vielen anderen Studien, die der MicroRNA miR-21 einen prognostisch ungünstigen Einfluss zuschreiben. Angefangen bei *Dillhoff et al.* [48], die bei hohen miR-21-Konzentrationen in nodal-negativen Pankreaskarzinomen eine herabgesetzte Überlebenszeit beobachteten, weisen zahlreiche Studien darauf hin, dass die miR-21-

Überexpression mit einem schlechteren Outcome vergesellschaftet ist [48, 100, 101]. Ein wesentliches Element, das zu diesem prognostisch ungünstigen Einfluss von miR-21 auf das Überleben beitragen könnte, ist die durch miR-21 vermittelte Chemoresistenz. Letztere ist durch mehrere Publikationen – darunter den eingangs genannten Studien von *Park et al.* [183] und *Giovannetti et al.* [68] – gut belegt. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass miR-21 auch als Verlaufsp Parameter taugt: So ermittelten *Tavano et al.* [229] eine Korrelation zwischen miR-21-Expression und der präoperativen Konzentration an CA 19-9. Das Carbohydrate-Antigen 19-9 wiederum stellt den aktuell vorherrschenden Biomarker des Pankreaskarzinoms dar, der zur serologischen Verlaufskontrolle des Tumorleidens genutzt wird. Ob und in welchem Maß miR-21 ein äquivalent guter Verlaufsp Parameter darstellt, ist derzeit Gegenstand aktueller Forschung. Der fehlende Nachweis eines Einflusses von miR-21* auf Rezidivfreiheit und Überlebenszeit kann in der hier vorliegenden Analyse auf mehrere Faktoren zurückzuführen sein: Zum einen ist es gut möglich, dass der prognostische Nutzen von miR-21* (Minor-Variante) anders zu bewerten ist, als der von miR-21 (Major-Variante), zum anderen ist aber auch denkbar, dass ein möglicher prognostischer Wert von miR-21* aufgrund der geringen Fallzahl und der damit verbundenen Insignifikanz nicht zu erkennen war.

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich miR-21* als eine, in den Karzinomzellen des PDAC variabel exprimierte, MicroRNA werten, die diagnostische Bedeutung bei hohen Konzentrationen erlangt, da letztere auf das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms hindeuten. Eine prognostische Relevanz kann aus den hier vorliegenden Daten für miR-21* jedoch nicht abgeleitet werden.

6.3.3 *miR-155 im dukta len Adenokarzinom des Pankreas*

Eine weitere MicroRNA mit mutmaßlich onkogener Wirkung ist miR-155. Auch diese bildete den Gegenstand der hier vorliegenden Untersuchung. Die dem B-cell Integration Cluster (BIC) des Chromosoms 21 entstammende miR-155 ist hierbei eine MicroRNA, die – gemessen an der noch relativ jungen Wissenschaftsgeschichte der OncomiRs – schon früh in Zusammenhang mit Malignomen genannt wurde: Bereits 2005 berichteten

Eis et al. [54] über die Akkumulation von miR-155 in B-Zell-Lymphomen und schrieben dieser eine onkogene Wirkung zu. Nach derzeitigem Stand der Forschung weisen zahlreiche Malignome eine Überexpression von miR-155 auf: Hierbei sind sowohl solide Tumoren wie Bronchial-, Mamma-, Pankreas-, Schilddrüsen- und Zervixkarzinome, als auch Leukämien und Lymphome zu nennen [59].

Lee et al. [129] wiesen als erste Arbeitsgruppe weltweit eine miR-155-Überexpression im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) nach. Mithilfe von Realtime-PCR und Northern Blots arbeiteten *Lee et al.* die 20 am stärksten aberrant exprimierten MicroRNAs des Pankreaskarzinoms in der zugrundeliegenden Untersuchungsgruppe heraus. Die MicroRNA miR-155 stellte sich hierbei im PDAC als deutlich überexprimiert dar, landete aber in Bezug auf die Ausprägung der aberranten Expression lediglich auf den 14. Platz. Verglichen mit miR-155 zeigten 13 andere MicroRNAs eine noch stärkere Überexpression im Pankreaskarzinom [129]. Im Gegensatz zu *Lee et al.*, die lediglich gesund erscheinendes, in direkter Nachbarschaft zum Tumor gelegenes Pankreasgewebe als Normalkontrollen verwendeten, nutzten *Szafrańska et al.* [226] zum direkten Vergleich auch Gewebe von pankreatitischen und histopathologisch einwandfrei gesunden Bauchspeicheldrüsen. Aber auch hier zeigte sich eine übermäßige Expression von miR-155, die im Durchschnitt 10fach über den im Normalgewebe bestimmten Werten lag. Ausgehend von FFPE-Geweben bestätigten im Folgenden auch *Bloomston et al.* [26] die Überexpression von miR-155 im PDAC. Eine besondere Rolle scheint der MicroRNA miR-155 in der Entstehung des Pankreaskarzinoms aus dysplastischen Vorstufen – pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) und intraduktalen papillären muzinösen Neoplasien (IPMN) – zuzukommen: Gegenüber gesundem Pankreasgewebe konnte sowohl für die PanIN's, als auch für die IPMN's erhöhte Konzentrationen an miR-155 nachgewiesen werden [38, 83, 199, 259]. Von besonderem Interesse ist hierbei, dass die Überexpression von miR-155 mit dem Entdifferenzierungsgrad der pankreatischen intraepithelialen Neoplasien zunimmt. So weist eine PanIN-3 einen durchschnittlich höheren Gehalt an miR-155 auf, als eine PanIN-2. Die PanIN-1 hingegen entspricht hinsichtlich der miR-155-Expression dem pankreatischen Normalgewebe. Zu diesen Resultaten gelangten jedenfalls *Ryu et al.* [199], die unter Nutzung der Laser-Mikrodissektion

isoliert die MicroRNA-Expression von PanIN's analysierten. Die zunehmende Deregulation von miR-155 scheint somit zumindest eine Begleiterscheinung, wenn nicht gar die Triebkraft der schrittweisen Entartung der dukталen Zellen hin zu einem Pankreaskarzinom zu sein.

Der Schlüssel zum Verständnis der malignomassoziierten Überexpression von miR-155 liegt im genomischen Kontext der MicroRNA. Bei ihrer Untersuchung des proapoptischen Proteins TP53INP1 in Pankreaskarzinomzellen stießen *Gironella et al.* [69] auf ein im PDAC deutlich herabgesetztes TP53INP1 bei gleichzeitig signifikant erhöhtem miR-155. Diesen Zusammenhang weiter untersuchend, fanden *Gironella et al.* heraus, dass TP53INP1 ein Zielprotein von miR-155 ist und dass eine Unterdrückung von miR-155 mittels AntagomiR's über eine Restauration von TP53INP1 zu einer gesteigerten Apoptoserate führt [69]. Letzteres könnte ein therapeutischer Ansatzpunkt in der Behandlung von Pankreaskarzinomen darstellen. Kombiniert man die Ergebnisse von *Gironella et al.* mit denen von *Habbe et al.* [83], *Ryu et al.* [199], *Caponi et al.* [38] und *Yu et al.* [259], die eine Überexpression von miR-155 in Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms ausmachten, so erhält die Hypothese einer Dysplasie-Karzinom-Sequenz, in der miR-155 eine zentrale Rolle spielt, neue Nahrung. Als Ursache der sukzessiven Überexpression von miR-155 im Rahmen der Entartung sind zahlreiche Genmutationen denkbar: Mutationen im MicroRNA-Biosyntheseapparat, Mutationen des miR-155-Host-Gens (MIR155HG) oder Mutationen im p53-Gen (TP53). In letzterem sahen *Neilsen et al.* [169] den Ursprung der miR-155-Überexpression von Mammakarzinom-Zellen, da in diesem gleichermaßen hohe Konzentrationen an miR-155 und mutiertem p53 nachgewiesen werden konnte, während ein Knockdown der p53-Mutation zu einer verminderten miR-155-Expression führte. Auch für das PDAC kann ein derartiges Zusammenspiel von p53 und miR-155 in Betracht gezogen werden.

Von *Faraoni et al.* [59] als multifunktionale MicroRNA tituliert, beschränkt sich die Bedeutung von miR-155 nicht allein auf die Onkogenese. Vielmehr ist miR-155 in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen des menschlichen

Organismus involviert. Exemplarisch hierfür sind Hämatopoese, spezifische Immunabwehr, entzündliche Reaktionen und kardiovaskuläre Erkrankungen zu nennen [59]. Insbesondere die Beteiligung von miR-155 an inflammatorischen Prozessen verdient Aufmerksamkeit, zumal die chronische Pankreatitis als ein ätiologischer Faktor des Pankreaskarzinoms gilt. In der Tat konnten *Svrcek et al.* [225] am Beispiel kolorektaler Karzinome sowie von chronischen Darmerkrankungen zeigen, dass beide Erkrankungen mit einer miR-155-Überexpression einhergehen. Eine besonders hohe Konzentration an zellulärer miR-155 verzeichneten *Svrcek et al.* hierbei für Mikrosatelliten-Instabilitäten. Als eine der Ersten, die in der MicroRNA miR-155 ein Bindeglied zwischen Inflammation und Malignomen sahen, äußerten *Tili et al.* [232] die Vermutung, dass weniger die absolute Höhe der miR-155-Überexpression für die Karzinogenese entscheidend ist, als vielmehr die Dauer der miR-155-Überexpression. So beobachteten sie, dass hohe, jedoch zeitlich limitierte Konzentrationen an miR-155, wie sie im Rahmen immunologischer Prozesse oder akuter Entzündungen auftreten, eine eher apoptotische und antiproliferative Wirkung erzielen, während eine dauerhafte, mittelgradige miR-155-Überexpression, die charakteristisch für chronische Entzündungen und Malignomen ist, eher proliferationsfördernd wirkt. Vorstellbar ist somit, dass schon bei der chronischen Pankreatitis die Weichen für eine dauerhafte miR-155-Überexpression gestellt werden und diese über Vorläuferläsionen – PanIN und IPMN – zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms beiträgt (*Abbildung 33*).

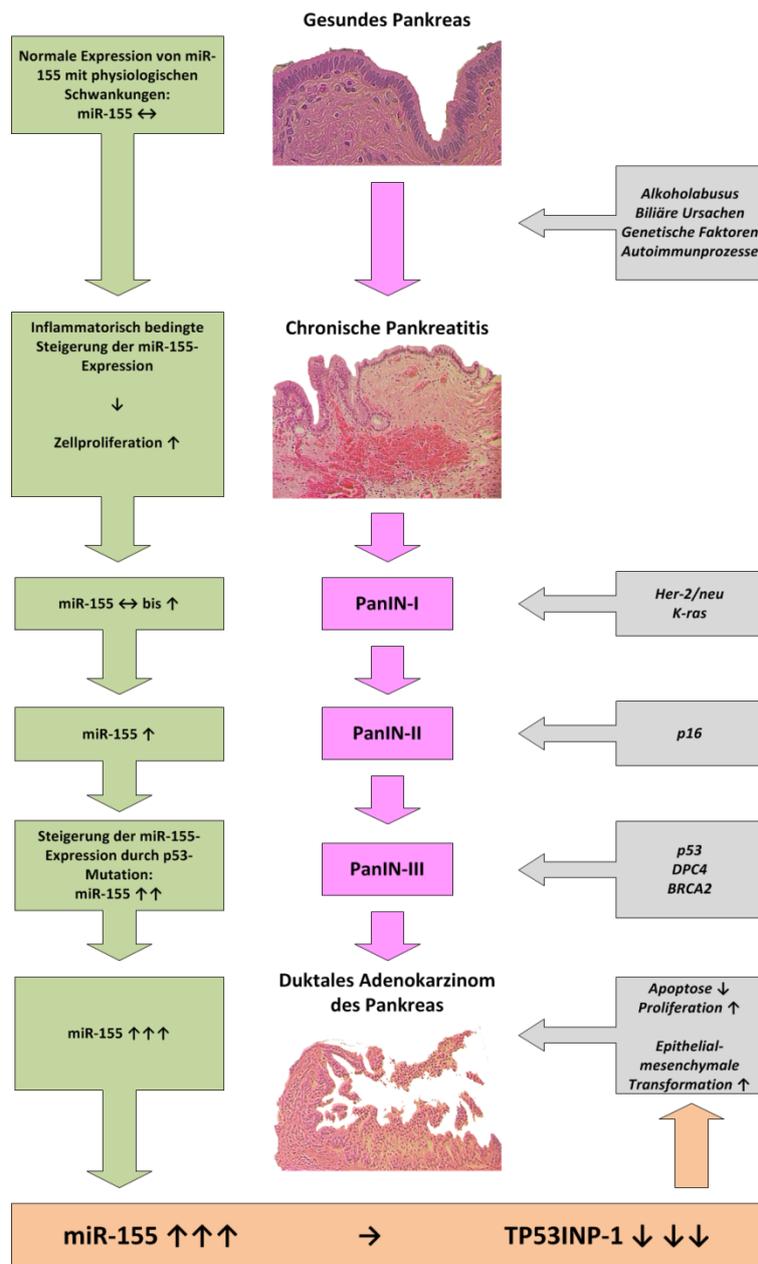


Abbildung 33: Hypothese einer miR-155 vermittelten Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Pankreaskarzinoms

Zahlreichen Studien zufolge steigt die Expression von miR-155 mit zunehmender Entartung pankreatischer Zellen an. So nimmt die Expression von miR-155 in den Vorläuferläsionen PanIN I – III kontinuierlich zu und erreicht im PDAC ihr Maximum. Zugleich finden parallel multiple Mutationsvorgänge statt (u.a. K-ras, p16, p53), deren Zusammenhang mit einer miR-155-Deregulation bislang weitgehend ungeklärt ist. Sicher ist jedoch, dass miR-155 sowohl im Rahmen inflammatorischer Prozesse, als auch mittels TP53INP-1 bei proliferationsfördernden Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Denkbar ist somit eine miR-155-vermittelte, schrittweise Entartung, die, angefangen bei der chronischen Pankreatitis, sich über PanIN I – III bis zum Pankreaskarzinom erstreckt.

Auch wenn die Überexpression von miR-155 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas allgemein als unstrittig gilt, so muss an dieser Stelle jedoch darauf hingewiesen werden, dass diese in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden konnte. Weder zwischen PDAC und chronischer Pankreatitis ($p = 0,174$), noch zwischen PDAC und gesunder Kontrolle ($p = 0,373$) wurde ein signifikanter Unterschied bezüglich der miR-155-Expression ermittelt. Dieser deutliche Widerspruch zu anderen Studien, in denen eine miR-155-Überexpression im PDAC zweifelsfrei nachgewiesen wurde, kann zahlreichen Faktoren geschuldet sein, von denen zwei hier exemplarisch genannt werden sollen:

1.) Fehlende Signifikanz aufgrund der geringen Fallzahl

In Analogie zu miR-21, deren Überexpression ebenfalls in dieser Studie nicht beobachtet werden konnte, kann die geringe Fallzahl (9 Pankreaskarzinompräparate, 7 Präparate der chronischen Pankreatitis, 3 gesunde Kontrollpräparate) und die damit verbundene Nicht-Signifikanz auch in Bezug auf miR-155 etwaige Unterschiede zwischen PDAC, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreasgewebe maskieren. Es sind somit nachfolgende Analysen mit größeren Fallzahlen notwendig, um diesen Sachverhalt abschließend zu klären.

2.) Fehlendes „miR-155-Umgebungsrauschen“

Mit Ausnahme von *Habbe et al.* [83], *Ryu et al.* [199], *Caponi et al.* [38] und *Yu et al.* [259], die spezifisch die MicroRNA-Expression von PDAC-Vorläuferläsionen (PanIN, IPMN) untersuchten und in diesen eine miR-155-Überexpression nachwiesen, gibt es bislang keine Studie, die eine vergleichende Analyse der miR-155-Expression zwischen den neoplastischen Zellen des PDAC sowie den duktalem Zellen der chronischen Pankreatitis und des gesunden Pankreasgewebes zum Inhalt hat. Zwar verglichen schon *Szafirska et al.* [226] und *Bloomston et al.* [26] die miR-155-Expression von PDAC, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreasgewebe, wobei sie hierfür jedoch größere Gewebeareale nutzten, so dass eine Kontamination mit weiteren Zelltypen – darunter (Myo-)Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und Erythrozyten – als sehr wahrscheinlich anzusehen ist. Somit kann in Betracht gezogen

werden, dass die miR-155-Überexpression, die zahlreiche Untersuchungen dem PDAC attestierten, weniger von den neoplastischen Zellen, als vielmehr von den in unmittelbarer Umgebung befindlichen Zellen ihren Ursprung nimmt. Letztere flossen aufgrund der Dissektatgröße sicherlich mit einem nicht zu vernachlässigen Anteil in die jeweiligen Analysen mit ein. Nach derzeitigem Kenntnisstand spielt miR-155 insbesondere in inflammatorischen und immunologischen Prozessen eine herausragende Rolle. So wird die Expression von miR-155 u.a. von NF-κB beeinflusst, während miR-155 wiederum auf zahlreiche Entzündungszellen, darunter T- und B-Lymphozyten, wirkt [55, 139, 232]. Es ist durchaus vorstellbar, dass die beim PDAC festgestellte miR-155-Überexpression auf derartige Entzündungszellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Karzinomzellen zurückzuführen ist. Hierbei könnte sowohl die Anwesenheit maligner Zellen selbst, als auch die häufig beim PDAC anzutreffende Begleitpankreatitis eine Aktivierung benachbarter Immunzellen hervorrufen und damit eine erhöhte miR-155-Expression bedingen. In dieser Studie wurden hingegen isoliert die duktales Epithelien sowie die neoplastischen Zellen analysiert, so dass ein durch umliegende Zellen ausgelöstes „miR-155-Umgebungsrauschen“ ausgeschlossen werden kann. Dieser Unterschied zu anderen Studien kann eine Erklärung dafür sein, dass eine Überexpression von miR-155 im PDAC gegenüber der chronischen Pankreatitis und dem gesunden Pankreasgewebe hier nicht beobachtet wurde.

Zusammenhänge zwischen der Expression von miR-155 und denen der anderen untersuchten MicroRNAs (miR-21, miR-196a, MicroRNA-200-Familie) ergaben sich nicht. Lediglich zwischen miR-155 und miR-196a lag ein schwacher signifikanter Zusammenhang ($r = 0,471$; $p = 0,027$) vor, der aufgrund der geringen Korrelationsstärke jedoch als unbedeutend eingestuft wurde.

Anders als für miR-21 oder im Folgenden für miR-196a zeigte sich kein diagnostisches Potential für miR-155. In der ROC-Analyse konnte für miR-155 eine AUC von 0,701 ermittelt werden. Dies entspricht weitgehend den Daten aus serumbasierten MicroRNA-Analysen. *Wang et al.* [245] bezifferten die AUC von aus Serum gewonnenem miR-155 auf 0,67 hinsichtlich der Diskriminierung zwischen PDAC und gesundem Pankreas.

Für gewebebasierte Studien liegen derzeit nur ungenügend statistisch aufbereitete Daten vor, so dass aktuell ein Vergleich mit jenen leider nicht möglich ist. Auch wenn die AUC von 0,701 prinzipiell die Möglichkeit einer diagnostischen Verwendung von miR-155 impliziert, ist angesichts der fehlenden Signifikanz ($p = 0,117$) ein diagnostisches Potential von miR-155 in dieser Studie nicht zu erkennen. Von einer Verwendung von miR-155 als Biomarker in der Primärdiagnostik des Pankreaskarzinoms ist – ausgehend von den hier vorliegenden Daten – somit abzuraten. Der geringe diagnostische Nutzen, der in dieser Untersuchung miR-155 unterstellt wird, ist hierbei in Zusammenhang mit der fehlenden miR-155-Überexpression zu sehen. Andere Studien, die eine übermäßige Expression von miR-155 im PDAC nachwiesen, räumen miR-155 jedoch einen höheren Stellenwert hinsichtlich der Primärdiagnostik des PDAC ein: So beobachteten *Szafranska et al.* [226] einen Anstieg der miR-155-Expression von gesundem Pankreas (Durchschnitt: 3,25) über die chronische Pankreatitis (Durchschnitt: 4,22) bis hin zum Pankreaskarzinom (Durchschnitt: 5,59). Auch *Bloomston et al.* [26] wiesen eine, gegenüber gesundem Pankreas und der chronischen Pankreatitis erhöhte Expression von miR-155 im PDAC nach. Neuere Studien von *Greither et al.* [77] und *Panarelli et al.* [181] deuten ebenfalls auf eine im Vergleich zu Pankreas-Normalgewebe übermäßige miR-155-Expression im Pankreaskarzinom hin. Dennoch sehen die meisten Studien miR-155 lediglich in Zusammenspiel mit anderen MicroRNAs in der Lage, als Biomarker Bedeutung in der Primärdiagnostik des Pankreaskarzinoms zu erlangen. So empfahlen *Wang et al.* [245] für eine MicroRNA-basierte serologische Primärdiagnostik des Pankreaskarzinoms die kombinierte Nutzung von miR-155, miR-21, miR-210 und miR-196a (AUC von 0,82). Dies entspricht somit durchaus den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie, die miR-155 als alleinigen Marker eine Tauglichkeit zur korrekten Identifikation des Pankreaskarzinoms abspricht. Der diagnostische Nutzen von miR-155 in Kombination mit den anderen MicroRNAs dieser Studie (miR-21, miR-196a, MicroRNA-200-Familie) wurde hier jedoch nicht untersucht.

Einen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben (HR: 1,153; $p = 0,588$) sowie auf das Gesamtüberleben (HR: 1,181; $p = 0,432$) ließ sich für miR-155 nicht beobachten. Auch dies steht in Kontrast zu anderen Studien, die eine Überexpression von miR-155 mit

einer deutlich schlechteren Prognose verbanden. So sahen sowohl *Greither et al.* [77], als auch *Papaconstantinou et al.* [182] die Höhe der miR-155-Expression als einen Prädiktor für ein verringerten Überlebens an.

Insgesamt lässt sich miR-155 als eine MicroRNA werten, die zweifelsohne einen nicht unwesentlichen Stellenwert in der Entwicklung und Ausbreitung des Pankreaskarzinoms besitzt. Dennoch sollte die Überexpression von miR-155 im Pankreaskarzinom überdacht werden, da diese in der hier vorliegenden Untersuchung nicht nachgewiesen werden konnte. Freilich kann dies auf die geringe Fallzahl der vorliegenden Studie zurückzuführen sein, jedoch sollte auch eine extraneoplastische Bildung von miR-155, z.B. in tumorumgebenden Entzündungszellen (Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten etc.) in Erwägung gezogen werden. Spätestens seit dem Nachweis einer verringerten Expression von miR-155 in Magenkarzinomzellen durch *Li et al.* [134] muss von der Vorstellung, dass miR-155 als onkogene MicroRNA in nahezu allen Karzinomen überexprimiert vorliegt, abgerückt werden.

6.3.4 *miR-196a: Ein potentieller Biomarker des Pankreaskarzinoms*

Mit miR-196a wurde in dieser Studie eine weitere, als „OncomiR“ einzustufende, MicroRNA untersucht.

Der miR-196-Familie gehören zwei verschiedene MicroRNAs an: miR-196a und miR-196b [42]. Beide MicroRNAs unterscheiden sich hierbei lediglich in einem Nukleotid (Uridin statt Adenosin) und differieren ebenfalls nur gering bezüglich ihrer Zielgene (siehe <http://www.mirbase.org>) [2]. Die Transkription von miR-196a kann wiederum von zwei verschiedenen Genen – dem miR-196a-1-Gen, welches auf Chromosom 17 (17q21.32) lokalisiert ist, und dem miR-196a-2-Gen, das dem Chromosom 12 (12q13.13) entspringt – ausgehen, wobei das Endprodukt immer dasselbe ist [42]. In dieser Studie erfolgte ausschließlich die Untersuchung von miR-196a, während miR-196b unberücksichtigt blieb.

Als bedeutendste Zielmoleküle von miR-196a gelten nach aktuellem Wissensstand die mRNAs der HOX-Gene. Insbesondere die mRNA von HOXB8 stellt aufgrund einer nahezu perfekten Komplementarität zu miR-196a eine wichtige Zielstruktur selbiger dar [256]. Bei den HOX-Genen handelt es sich um regulative Gene, die an der Regulation von Zellteilung, -differenzierung sowie Apoptose beteiligt sind. Während der Embryonalperiode tragen die HOX-Gene wesentlich zur Entwicklung der segmentalen Körpergliederung bei. Mit ihrem Einfluss auf Zellteilung, -differenzierung und Apoptose stellen die HOX-Gene zudem wichtige Faktoren der Onkogenese dar, woraus sich u.a. auch die Bedeutung von miR-196a bezüglich Tumorentstehung und -verbreitung ableiten lässt [145, 162]. Die HOX-Gene sind jedoch nicht die einzigen Zielstrukturen, über die miR-196a einen onkogenen Effekt ausübt. Auch High Mobility Group- Proteine (HMGA) stehen im Verdacht von miR-196a reguliert zu werden. Zahlreiche Studien schreiben den HMGA-Proteinen hierbei eine karzinomfördernde Wirkung zu [46]. Ein weiteres wichtiges Zielmolekül von miR-196a, welches ebenfalls in Zusammenhang mit Malignomen steht, ist Annexin 1 – ein Protein, das als Mediator der Apoptose und somit als Inhibitor der Zellproliferation gilt. *Luthra et al.* [152] beobachteten ausgehend von Ösophaguskarzinom-, Mammakarzinom- und Endometriumkarzinomzelllinien, dass miR-196a die Expression von Annexin A1 hemmt und über diesen Mechanismus zu einer gesteigerten Zellproliferation beiträgt. Von diesem, auch in anderen Karzinomen nachgewiesenen, Mechanismus scheint das Pankreaskarzinom jedoch abzuweichen, da hier neben einer Überexpression von miR-196a auch eine Überexpression von Annexin A1 beobachtet werden konnte [14, 226]. Mit p27^{kip1} stellten *Sun et al.* [224] ein weiteres Zielprotein von miR-196a vor. Ausgehend von Zelllinien des Magenkarzinoms beobachteten *Sun et al.* hierbei eine inverse Korrelation der miR-196a- und p27^{kip1}-Expression. In weiterführenden Experimenten gelang es ihnen zu zeigen, dass miR-196a über die Inhibition von p27^{kip1} die Proliferationsrate von Karzinomzellen deutlich erhöht. Dies erscheint schlüssig, da es sich bei p27^{kip1} um ein Protein handelt, dem ein hemmender Effekt auf den Zellzyklus nachgesagt wird. Auf welche Weise miR-196a die Entstehung von Pankreaskarzinomen fördert, ist nach wie vor unklar. Berücksichtigt man den Umstand, dass eine MicroRNA zahllose Zielstrukturen besitzen kann, so ist davon auszugehen,

dass die onkogene Wirkung von dysexprimierten miR-196a über eine Vielzahl von Effektorproteinen vermittelt wird.

Einen Zusammenhang zwischen miR-196a und dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas stellten erstmalig die Studien von *Bloomston et al.* [26] und *Szafranska et al.* [226] heraus, die völlig unabhängig voneinander der MicroRNA-196a einen wichtigen Stellenwert in der Diagnostik und Prognostik des Pankreaskarzinoms einräumten. *Bloomston et al.* [26], die in 75% aller untersuchten Pankreaskarzinome eine Überexpression von miR-196a nachwiesen, unterstrichen insbesondere das prognostische Potential von miR-196a. So ermittelten *Bloomston et al.*, dass eine hohe Expression an miR-196a signifikant mit einem herabgesetzten Gesamtüberleben korreliert (14, 3 Monate in der Hochexpressions-Gruppe vs. 26,5 Monate in der Niedrigexpressions-Gruppe). Gleichwohl *Bloomston et al.* der MicroRNA-196a prognostischen Nutzen bescheinigten, konnten sie eine diagnostische Eignung von miR-196a nicht erkennen – zu gering stellten sich die Expressionsunterschiede zwischen Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas dar [26]. Zu einem anderen Ergebnis kamen hingegen *Szafranska et al.* [226], die neben Pankreasgeweben auch Zellkulturen untersuchten und hierbei eine im Durchschnitt 14fach höhere miR-196a-Expression im PDAC gegenüber dem gesunden Pankreas feststellten. Die MicroRNA-196a auf ihr diagnostisches Potential hin testend, stellten *Szafranska et al.* zudem heraus, dass miR-196a in Kombination mit miR-217 eine Diskrimination zwischen Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas erlaubt. Dieses Ergebnis bestätigten *Szafranska et al.* [227] in einer weiteren Studie, die sich mit der MicroRNA-Analyse pankreatischer Feinnadelpunktate befasste. Auch hier gelang in 9 von 10 Fällen mittels miR-196a und miR-217 die korrekte Identifikation des Pankreaskarzinoms [227]. Eine Überexpression von miR-196a in PDAC-Geweben und Zelllinien fanden auch *Zhang et al.* [261] sowie *Panarelli et al.* [181]. Ein möglicher diagnostischer Nutzen von miR-196a scheint jedoch nicht nur auf Pankreasgewebe (z.B. im Rahmen einer FNP oder eines intraoperativen Schnellschnittes) begrenzt zu sein. Vielmehr liegen Hinweise vor, dass auch ein serologisches Screening von miR-196a in der Diagnostik, zumindest aber in der Prognostik, zum Einsatz kommen könnte. *Wang et al.* [245] wiesen erhöhte Plasmaspiegel von miR-196a bei

Pankreaskarzinompatienten nach und stellten mit einem Screening von 4 MicroRNAs – miR-21, miR-155, miR-196a und miR-210 – ein laborchemisches Verfahren zur Differenzierung zwischen PDAC und gesundem Pankreas in Aussicht. Die Arbeitsgruppe um *Xiangyu Kong* [115] untersuchte zusätzlich die MicroRNA-Serumspiegel bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und verglich diese mit denen von PDAC-Patienten und gesunden Kontrollen. Hierbei gelang mittels miR-196 keine Abgrenzung zwischen PDAC und chronischer Pankreatitis, wohl aber zwischen krankhaft verändertem Pankreas (PDAC/CP) und gesundem Pankreas. Zudem stellten *Kong et al.* einen hohen prognostischen Nutzen von miR-196a heraus, da sowohl eine Korrelation der miR-196a-Serumspiegel mit dem Tumorstadium, als auch mit dem Gesamtüberleben beobachtet wurde [115]. In Kombination mit miR-16 bescheinigten *Liu et al.* [143] der MicroRNA-196a die Fähigkeit zur serologischen Abgrenzung des PDAC von chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas.

Wie eingangs bereits angedeutet, beschränkt sich die Bedeutung von miR-196a nicht allein auf das Pankreaskarzinom: Eine Überexpression von miR-196a konnte neben dem Pankreaskarzinom auch für Mamma-, Bronchial-, Ösophagus-, Magen- und Kolonkarzinom sowie für das hepatozelluläre Karzinom und für orale Plattenepithelkarzinome nachgewiesen werden [42, 91, 142, 145, 203]. Aber auch Leukämien und neuroepitheliale Tumoren wie das Glioblastom zeichnen sich durch eine Überexpression von miR-196a aus [42, 81]. Jedoch scheinen Malignome nicht zwingend mit einer Überexpression von miR-196a vergesellschaftet zu sein, wie das Beispiel des malignen Melanoms zeigt. Beim letzteren beobachteten *Mueller et al.* [162] eine deutliche Minderexpression von miR-196a.

Korrespondierend mit den Ergebnissen von *Szafrańska et al.* [226], *Zhang et al.* [261] und *Panarelli et al.* [181] konnte auch in dieser Studie eine Überexpression von miR-196a im duktalem Adenokarzinom des Pankreas nachgewiesen werden. Verglichen mit den duktalem Epithelien bei chronischer Pankreatitis zeigten die Karzinomzellen eine 1,6 bis 576,1fache Überexpression von miR-196a ($p = 0,001$). Gegenüber den duktalem Zellen des gesunden Pankreas konnte für die Karzinomzellen sogar eine

Überexpression um das 6,6 – 769,4fache verzeichnet werden ($p = 0,009$). Die Expression von miR-196a im Pankreaskarzinom betrug im Durchschnitt das 142fache von derjenigen im gesunden Pankreas ($\sum \text{PDAC}^{\text{miR-196a-Expression}} / \sum \text{Gesundes Pankreas}^{\text{miR-196a-Expression}}$). Dies entspricht weitgehend den Daten von *Zhang et al.* [261], die – verglichen mit gesunden pankreatischen Gewebe – eine 190fach erhöhte Expression von miR-196a im PDAC ausmachten. *Szafranska et al.* [226] stuften hingegen – wie oben bereits beschrieben – die Überexpression von miR-196a deutlich niedriger ein. Erstaunlich hoch imponiert in dieser Studie auch der mittlere Expressionsunterschied von miR-196a zwischen PDAC und chronischer Pankreatitis: Hier konnte immerhin ein Unterschied um den Faktor 38 ermittelt werden.

Die Expression von miR-196a korrelierte schwach ($r = 0,499$), jedoch signifikant ($p = 0,018$) mit der von miR-21*. Aufgrund des schwachen Zusammenhanges wird diesem Umstand jedoch keine größere Beachtung geschenkt.

Neben miR-21* zeigte auch miR-196a diagnostisches Potential bezüglich der Erkennung des Pankreaskarzinoms. Mit einer AUC von 0,991 in der ROC-Analyse wurde für miR-196a das mit Abstand größte diagnostische Leistungsvermögen aller hier untersuchten MicroRNAs ermittelt ($p = 0,001$). Selbst eine geringfügige Überexpression von miR-196a (Grenzwert 0,63617 $\Delta\Delta\text{Ct}$, entsprechend einer 5fachen Überexpression gegenüber den gesunden Pankreasductuli) muss hierbei als Hinweis auf das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms verstanden werden. Somit stellt aus neoplastischen bzw. duktafen Zellen gewonnenes miR-196a einen potentiellen Biomarker des PDAC mit guter Sensitivität und Spezifität dar. Anders als *Szafranska et al.* [226], die lediglich der Kombination aus miR-196a und miR-217 einen diagnostischen Nutzen in der Erkennung des Pankreaskarzinoms bescheinigten, weisen die hier vorliegenden Daten daraufhin, dass miR-196a auch isoliert als PDAC-Biomarker in pankreatischen Geweben eingesetzt werden kann. Es bleibt hierbei weiteren Studien vorbehalten, zusätzliche Kombinationen mit anderen Biomarkern (Nukleinsäuren, Proteine) herauszuarbeiten, die das diagnostische Potential von miR-196a abermals steigern.

Das von *Bloomston et al.* [26] beobachtete prognostische Potential von miR-196a konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Es zeigte sich hierbei weder ein Zusammenhang zwischen der miR-196a-Expression und dem rezidivfreien Überleben (HR: 1,154; $p = 0,686$) noch zwischen ersterer und dem Gesamtüberleben (HR: 0,838; $p = 0,597$). Nicht auszuschließen ist jedoch, dass ein derartiger Zusammenhang lediglich aufgrund der geringen Fallzahl (9 PDAC-Patienten) nicht beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass miR-196a als einzige der hier untersuchten MicroRNAs gegenüber der chronischen Pankreatitis und dem gesunden Pankreas in allen Pankreaskarzinomen (100%) überexprimiert vorlag. Das dies in der gleichen Deutlichkeit bislang nur in wenigen Studien beobachtet werden konnte, mag mit der Fokussierung dieser Untersuchung auf die duktaalen Epithelzellen des Pankreas bzw. auf die Karzinomzellen des PDAC zusammenhängen. So gibt es Hinweise darauf, dass miR-196a bevorzugt in Zellen epithelialer Morphologie exprimiert wird. *Schimanski et al.* [203] beobachteten, dass sowohl kolorektale Karzinome, als auch die Mucosa des Kolons an sich mit einer ausgeprägten miR-196a-Expression einhergehen, was auf eine epitheliale Assoziation der MicroRNA-196a hindeutet. Diese Beobachtung kann auch eine Erklärung für die Diskrepanzen der miR-196a-Expression in den verschiedenen PDAC-Studien sein: Je nach Einschluss oder Ausschluss des Stromas ist von veränderten miR-196a-Expressionsrelationen zwischen PDAC, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas auszugehen. Beschränkt man sich in den Untersuchungen auf Duktus- und Karzinomzellen, so zeigt sich ein großes diagnostisches Potential von miR-196a hinsichtlich der korrekten Identifizierung des Pankreaskarzinoms (AUC von 0,991; $p = 0,001$). So deutlich das diagnostische Leistungsvermögen von miR-196a in dieser Studie imponierte, so muss gleichermaßen das prognostische Potential, dass dieser MicroRNA von zahlreichen Studien attestiert wurde, in Frage gestellt werden. Die hier vorliegende Untersuchung konnte jedenfalls keinen Zusammenhang zwischen der miR-196a-Expression und dem Überleben bzw. der Rezidivfreiheit herstellen.

Insgesamt stützen die hier gewonnenen Ergebnisse die Studien von *Szafrańska et al.* [226, 227], *Zhang et al.* [261] und *Panarelli et al.* [181], die allesamt ebenfalls eine Überexpression von miR-196a in Gewebeproben des Pankreaskarzinoms nachwiesen. Die hier festgestellte, deutliche Überexpression von miR-196a im PDAC lassen zudem eine erhöhte Plasmakonzentration von miR-196a bei Pankreaskarzinompatienten, für die *Wang et al.* [245], *Kong et al.* [115] und *Liu et al.* [143] Indizien fanden, als sehr wahrscheinlich erachten. Ein Übertritt von zellulärem miR-196a in das Blutplasma ist dabei sowohl durch Zelltod, als auch durch exosomale Transferprozesse denkbar [239]. Der Ursprung der miR-196a-Überexpression konnte in dieser Studie einwandfrei auf die Karzinomzellen zurückgeführt werden. Somit kann vermutet werden, dass die endogene miR-196a-Expression ein bedeutendes Korrelat der Entartung von Pankreaszellen darstellt. Welche Gene und Proteine hieran beteiligt sind, gilt es in weiterführenden Studien zu klären. Eine direkte Betrachtung von HOXA-, HMGA- und Annexin-Proteinen sowie von p27^{kip1} im Pankreaskarzinom erscheint hierbei lohnenswert. Mit miR-196a ist jedenfalls für die Diagnostik des Pankreaskarzinoms ein weiterer vielversprechender Biomarker verfügbar, der zudem auch als Zielmolekül therapeutischer Ansätze dienen kann. So kann aus der hier vorliegenden Untersuchung abgeleitet werden, dass Therapien, die spezifisch auf miR-196a ausgerichtet sind, auch wirklich die neoplastischen Zellen des PDAC treffen, da letztere mit einer deutlich gesteigerten miR-196a-Expression einhergehen.

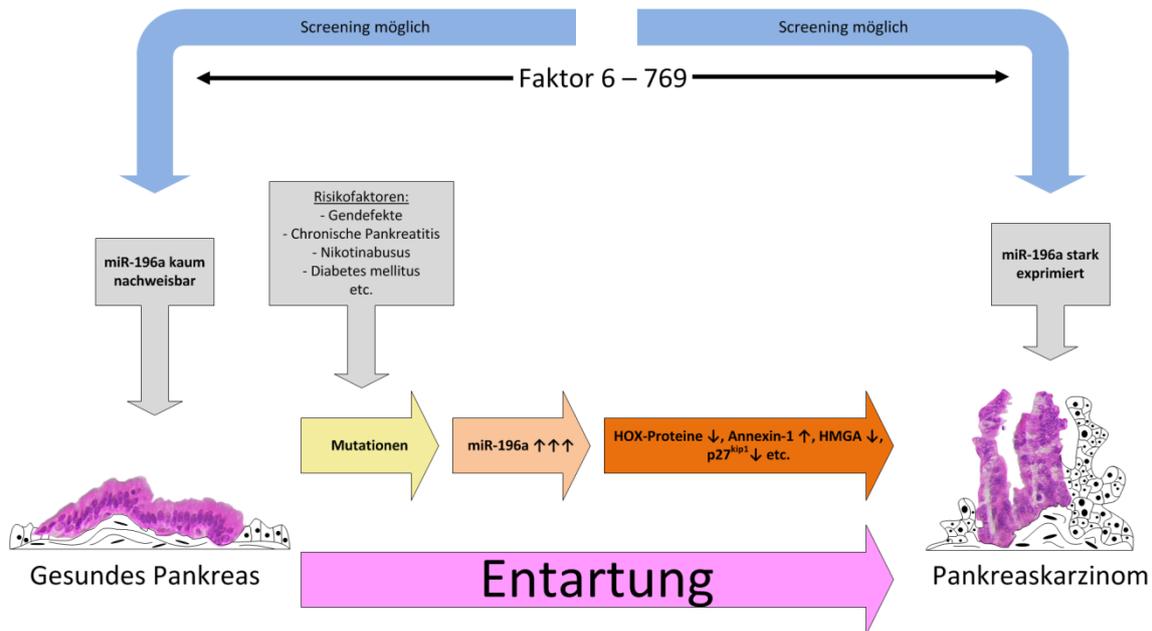


Abbildung 34: miR-196a und das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Gemäß dieser Untersuchung liegt miR-196a im PDAC um das 6-769fache überexprimiert vor. Dieser deutliche Expressionsunterschied zum gesunden Pankreas prädestiniert miR-196a zum Biomarker des PDAC. Welche Rolle miR-196a in der Entartung spielt, ist aktuell noch unklar. Denkbar ist, dass aufgrund von Mutationen überexprimiert vorliegendes miR-196a apoptotische und proliferationshemmende Proteine inhibiert und hierüber zur Entstehung des Pankreaskarzinoms beiträgt.

6.3.5 Die MicroRNA-200-Familie

Als Kontrast zu den überwiegend onkogen wirkenden MicroRNAs miR-21*, miR-155 und miR-196a, wurde in dieser Studie die MicroRNA-200-Familie, der einen überwiegend tumorsupprimierenden Effekt zugeschrieben wird, eingeschlossen. Die Einordnung als Tumorsuppressor ist jedoch nicht unumstritten: Auch eine gegenläufige, d.h. onkogene Wirkung wird für die MicroRNA-200-Familie postuliert. Dementsprechend war es ein Ziel der hier durchgeführten Expressionanalyse, den konträr zueinanderstehenden Wirkungsmodellen der MicroRNA-200-Familie auf den Grund zu gehen und neue Erkenntnisse zur vornehmlichen Wirkung der MicroRNA-200-Familie zu gewinnen.

Nachfolgend soll der aktuelle Kenntnisstand zur MicroRNA-200-Familie kurz dargelegt und im Kontext mit den hier ermittelten Ergebnissen diskutiert werden.

Die MicroRNA-200-Familie umfasst 5 Mitglieder, die auch alle Gegenstand der hier vorliegenden Untersuchung waren: miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429. Eine weitere Unterteilung der MicroRNA-200-Familie in Subgruppen ist sowohl genetisch, als auch funktionell möglich. Genetisch lässt sich die MicroRNA-200-Familie in zwei Untergruppen gliedern: miR-200a, miR-200b und miR-429 entstammen dem Chromosom 1, während miR-141 und miR-200c vom Chromosom 12 ihren Ursprung nehmen (*Abbildung 35*). Auch in funktioneller Hinsicht lässt sich eine Einteilung der MicroRNA-200-Familie in 2 Gruppen vornehmen: So weisen sowohl miR-141 und miR-200a auf der einen (Sequenz: *AACACU*), als auch miR-200b, miR-200c und miR-429 auf der anderen Seite (Sequenz: *AAUACU*) eine identische Bindungsregion für Zielmoleküle („*seed region*“, „*seed sequence*“) auf [118, 185]. Es kann daher vermutet werden, dass sich miR-141 und miR-200a einerseits sowie miR-200b, miR-200c und miR-429 andererseits die gleichen Zielstrukturen teilen und sich in ihrer Wirkung weitgehend entsprechen [75].

Zahlreichen Studien zufolge, nimmt die MicroRNA-200-Familie eine zentrale Stellung in der Regulation der epithelial-mesenchymalen Transition ein [76]. Die epithelial-mesenchymale Transition stellt einen hoch konservierten morphologischen Änderungsprozess dar, bei welchem Epithelzellen eine mesenchymale Konfiguration annehmen, um eine Migration in entferntere Gewebsregionen zu ermöglichen [231]. So kommt es im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition zu einer Umwandlung der kuboiden in eine spindelartige Zellmorphologie, zu einem Verlust der Zell-Zell-Kontakte sowie der apikal-basalen Polarität und zu einer vermehrten Expression von Vimentin bei gleichzeitiger Hemmung der E-Cadherin-Synthese [76]. Als physiologischer Prozess untrennbar mit der Embryogenese verknüpft, besitzt die epithelial-mesenchymale Transition aber auch große Bedeutung in der Entstehung und metastatischen Verbreitung von Malignomen [231]. Begünstigt durch mesenchymale Charakteristika, die die Tumorzellen nach erfolgter Transition erwirbt, ist diese nun in

der Lage, aus dem Zellverband zu emigrieren und sich an anderen Orten abzusiedeln. *Klymkowsky et al.* [114] wiesen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass nur die wenigsten Tumorzellen eine komplette epithelial-mesenchymale Transition durchmachen. Zu den wenigen Tumoren, in denen weitgehend komplett eine epithelial-mesenchymale Transition erfolgt, zählt *Klymkowsky et al.* zufolge das duktales Adenokarzinom des Pankreas. Ausgehend von renalen Hunde-Zellkulturen stellten *Gregory et al.* [75] einen Zusammenhang zwischen der epithelial-mesenchymalen Transition und der MicroRNA-200-Familie her: So fanden sie die Mitglieder der MicroRNA-200-Familie in Nierenzellen, die nach vorheriger TGF- β -Stimulation eine komplette epithelial-mesenchymale Transition durchgemacht hatten, herunterreguliert vor und schlossen daraus, dass die MicroRNA-200-Familie invers mit der epithelial-mesenchymalen Transition verknüpft ist. In der Tat konnten weitere Untersuchungen von *Gregory et al.* [75] zeigen, dass nach Zelltransfektion mit Mitgliedern der MicroRNA-200-Familie eine Umkehr der epithelial-mesenchymalen Transition (= mesenchymal-epitheliale Transition; MET) zu erreichen ist und die E-Cadherin-Expression bei gleichzeitiger Suppression des ZEB1-Proteins sprunghaft ansteigt. *Park et al.* [185], die die Beobachtungen von *Gregory et al.* nochmals bestätigten, wiesen hierbei einen direkten Zusammenhang zwischen der miR-200-Expression und der E-Cadherin-Expression nach. So zeigte sich, dass die MicroRNA-200-Familie direkt auf ZEB1 (Synonym: δ EF1) und ZEB2 (Synonym: SIP1) – zwei Proteine, die als Suppressoren der E-Cadherin-Expression fungieren – wirkt und diese negativ reguliert. Die Folge ist eine miR-200-vermittelte Synthesesteigerung von E-Cadherin, das als Zelladhäsionsmolekül integraler Bestandteil von Zell-Zell-Kontakten ist und so maßgeblich zum Aufbau eines epithelialen Gewebeverbandes beiträgt. Dass der reziproke Zusammenhang zwischen den ZEB-Proteinen (ZEB1 / ZEB2) und der MicroRNA-200-Familie nicht allein die Folge einer einseitigen Regulation, sondern vielmehr das Resultat eines Rückkopplungsmechanismus ist, stellten *Burk et al.* [34] heraus. Die Arbeitsgruppe um *Ulrike Burk* beobachtete hierbei, dass auch ZEB1 eine direkte Inhibierung der MicroRNA-200-Familie herbeizuführen vermag, hierüber die epithelial-mesenchymale Transition triggert und letztlich die Invasion von Tumorzellen fördert.

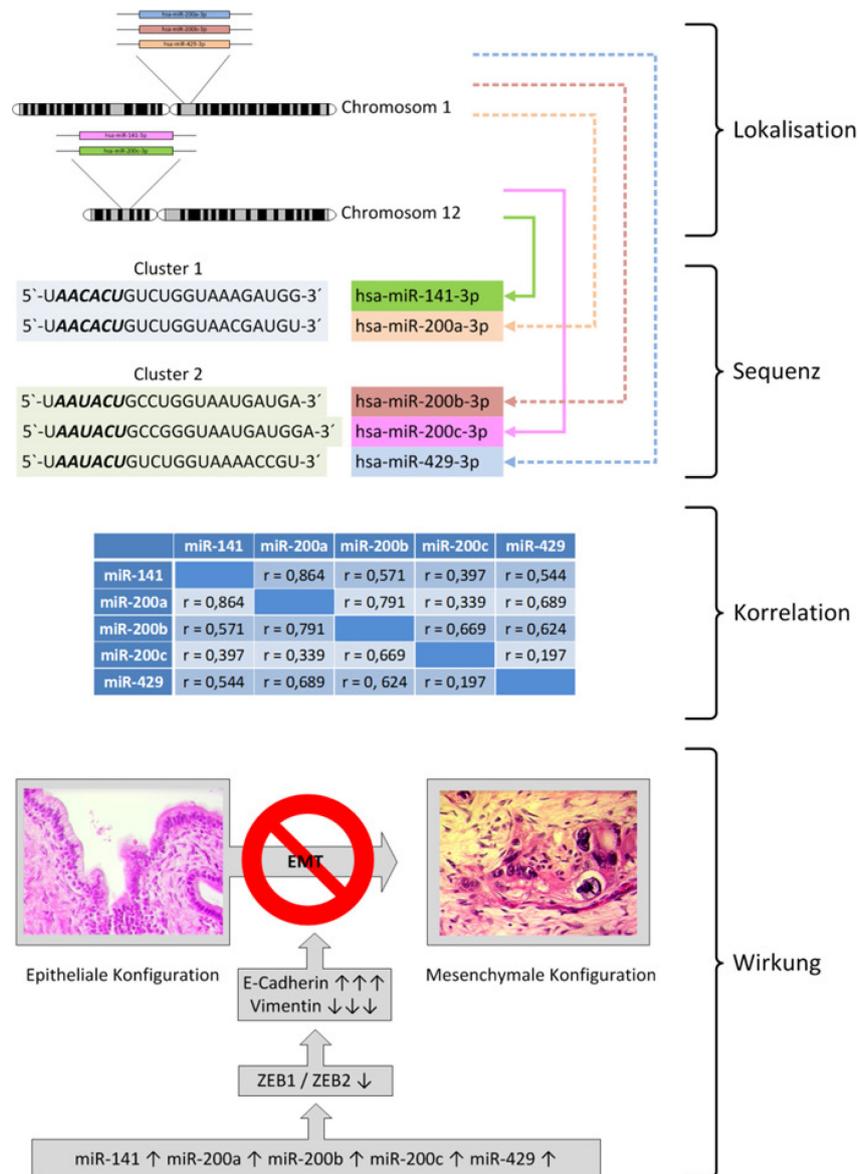


Abbildung 35: Lokalisation, Sequenzierung, Expressionsverhalten und Wirkung der MicroRNA-200-Familie

Die MicroRNA-200-Familie lässt sich sowohl genetisch, als auch funktionell in jeweils 2 Untergruppen gliedern: So entstammen miR-200a, miR-200b und miR-429 dem Chromosom 1 und miR-141 sowie miR-200c dem Chromosom 12. Auf funktionaler Ebene teilen sich miR-141 und miR-200a einerseits und miR-200b, miR-200c sowie miR-429 andererseits eine *seed sequence*. Trotz genetischer und funktionaler Subgruppierungen korreliert die Expression der MicroRNA-200-Familie in pankreatischen Geweben stark miteinander, wie eine Korrelationsanalyse zeigt. Dies weist daraufhin, dass alle Mitglieder gleichermaßen einen hemmenden Effekt auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ausüben und damit möglicherweise gemeinsam tumorsupprimierend agieren. Umgekehrt ist jedoch auch denkbar, dass die MicroRNA-200-Familie als Inhibitor der EMT über die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten die Koloniebildung von Tumorzellen fördert.

Die Zink-Finger-E-Box-bindenden Homeoboxproteine 1 und 2 (ZEB1 / ZEB2) stellen sicherlich die wesentlichen Zielstrukturen der MicroRNA-200-Familie dar und bilden das Bindeglied zwischen dieser und der epithelial-mesenchymalen Transition. Mit ihrem hemmenden Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transition und der Stabilisierung epithelialer Charakteristika, die wiederum einer metastatischen Aussaat der Tumorzellen entgegensteht, lässt sich die MicroRNA-200-Familie am ehesten der Gruppe der Tumorsuppressoren zuordnen, wenn auch es Hinweise auf eine onkogene Wirkung der einzelnen Mitglieder gibt [53, 76, 119, 187, 204, 258]. Die in zahlreichen Studien postulierte tumorsupprimierende Wirkung scheint jedoch nicht nur über die Zielmoleküle ZEB1 und ZEB2 zustande zu kommen, sondern über eine Vielzahl an weiteren Molekülen vermittelt zu werden. Erwähnenswert sind hierbei vor allem die Membran Typ1-Matrix-Metalloproteinase (MT1-MMP) und das PTEN-Enzym (PTEN = Phosphatase und Tensin Homolog), denen laut *Soubani et al.* [218] eine wichtige Rolle im Pankreaskarzinom zukommt. *Soubani et al.* beobachteten eine deutliche Expressionsminderung der MicroRNA-200-Familie in chemoresistenten Pankreaszelllinien, die gleichermaßen mit einem Verlust der PTEN-Expression und einer Überexpression von MT1-MMP einherging. Aus diesen Beobachtungen leiteten *Soubani et al.* ab, dass die MicroRNA-200-Familie einen regulierenden Effekt auf MT1-MMP sowie PTEN ausübt. So scheint die MicroRNA-200-Familie einen hemmenden Einfluss auf die Expression der Matrix-Metalloproteinase MT1-MMP, die nachgewiesenermaßen mit dem metastatischen Potential von Tumoren verknüpft ist, auszuüben, während die Expression von PTEN, einem Enzym, das an der Apoptose beteiligt ist, von der MicroRNA-200-Familie augenscheinlich gefördert wird. Auch wenn die einzelnen Mechanismen, die hinter der tumorsupprimierenden Wirkung der MicroRNA-200-Familie stehen, derzeit nur bruchstückhaft bekannt sind, so ist davon auszugehen, dass die MicroRNA-200-Familie ihren tumorsupprimierenden Effekt über eine Vielzahl an Zielmolekülen vermittelt und diese wiederum mit hoher Wahrscheinlichkeit stark abhängig von der jeweiligen Tumorart sind.

In Widerspruch zu den tumorsupprimierenden Eigenschaften, die der MicroRNA-200-Familie von der Mehrzahl der Studien attestiert wird, stehen Beobachtungen, in denen sich ein Zusammenhang zwischen der MicroRNA-200-Expression und einer

progredienten Metastasierung zeigte [53, 119, 187]. So wiesen *Dykxhoorn et al.* [53] eine Überexpression der MicroRNA-200-Familie in zu Metastasierung neigenden Mammakarzinom-Zelllinien nach. Umgekehrt beobachteten sie in Zelllinien mit niedrigem metastatischem Potential eine gleichsam niedrige Expression der MicroRNA-200-Familie. Im Gegensatz zu der weitläufigen Annahme, dass ein epithelialer Phänotyp der Metastasierung entgegensteht, zeigte sich hier ein insgesamt förderlicher Einfluss der epithelialen Konfiguration auf die Metastasierung. An der prometastatischen Wirkung der MicroRNA-200-Familie in Mammakarzinomen scheint dabei das Sec23a-Protein beteiligt zu sein – ein Protein, das die Bildung von Zellkolonien fördert und gleichzeitig die Migrationsfähigkeit der Zellen herabsetzt [119]. Ob dieser Mechanismus auch auf andere Malignome übertragen werden kann ist derzeit noch unklar. Analog zum Mammakarzinom konnte jedoch auch beim kolorektalen Karzinom eine verstärkte Expression der MicroRNA-200-Familie in Metastasen nachgewiesen werden [187]. Da gleichsam aber auch eine miR-200-Minderexpression im Bereich der invasiven Tumorzellzone beobachtet wurde, d.h. in dem Bereich, in welchem die Zellen die höchste Migrationsfähigkeit aufweisen und aus dem Zellverband des Primärtumors ausbrechen, erhält die Theorie eines 2-phasigen Metastasierungsprozesses neue Nahrung (*Abbildung 36*). Bereits 2006 stellten *Chaffer et al.* [39] am Beispiel des Blasenkarzinoms heraus, dass mesenchymal konfigurierte Tumorzellen durch Invasion und Migration den Grundstock für eine Metastasierung bilden, jedoch für die Entstehung stabiler Metastasenherde eine Rückumwandlung zu einem epithelialen Phänotyp notwendig ist. So könnten die Tumorzellen in einem ersten Schritt eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen, hierdurch bedingt aus dem Zellverband austreten, in Blutgefäße migrieren und in entferntere Organe verschleppt werden [187]. Nach zunächst loser Absiedlung im jeweiligen Organparenchym könnte in einem zweiten Schritt eine Restauration der epithelialen Morphologie mittels mesenchymaler-epithelialer Transition (MET) erfolgen, wodurch es den Tumorzellen nunmehr möglich ist, stabile Zellverbände auszubilden [39]. Durch die tragenden Rollen von EMT und MET wird die Bedeutung der MicroRNA-200-Familie in diesem 2-phasigen Metastasierungsmodell schnell deutlich: So ist für den Ablauf der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) zunächst einer Herunterregulierung der MicroRNA-200-Familie nötig, während die darauffolgende

mesenchymale-epitheliale Transition (MET) eine Expressionserhöhung der MicroRNA-200-Familie voraussetzt. Dies wiederum würde eine divergente Wirkung der MicroRNA-200-Familie bedeuten. Während diese in der ersten Phase der Metastasierung einen potentiellen Tumorsuppressor darstellt (= Inhibition der EMT durch eine starke Expression der MicroRNA-200-Familie), fungiert sie in der zweiten Phase als Onkogen (= Stimulation der MET und damit Förderung der Ausbildung von Tumorzellverbänden). Dieses ambivalente Verhalten würde eine therapeutische Nutzung der MicroRNA-200-Familie sehr schwierig machen, da in diesem Fall eine Vorhersage der genauen Wirkung – onkogen oder tumorsupprimierend – nicht möglich wäre. In Anbetracht der zum aktuellen Zeitpunkt nur geringen Anzahl von Studien, die diese divergente Rolle der MicroRNA-200-Familie thematisieren, muss jedoch auf den unbewiesenen Charakter dieses 2-Phasen-Tumorprogressionsmodells hingewiesen werden. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Funktion der MicroRNA-200-Familie in Tumorentstehung und -progression weiter zu beleuchten und die vorherrschende Wirkung – sofern diese benannt werden kann – herauszustellen.

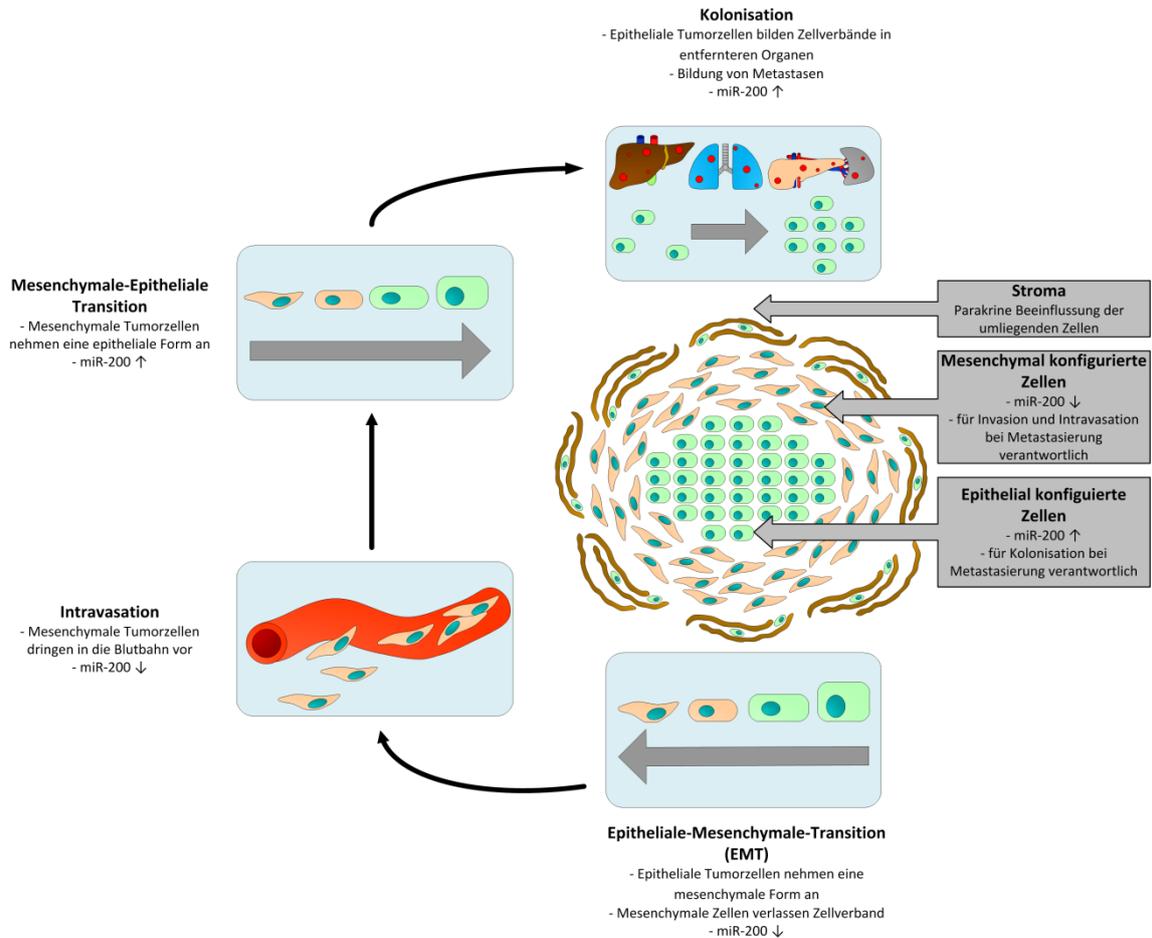


Abbildung 36: Die Rolle von EMT, MET und der MicroRNA-200-Familie im Metastasierungsprozess

Dargestellt ist ein 2-phases Metastasierungsmodell, das von einigen Studien postuliert wird [39, 187]. In der 1. Phase erfolgt hierbei die Transformation epithelial konfigurierter Tumorzellen zu solchen mit einer mesenchymalen Morphologie (= epitheliale-mesenchymale Transition). Grundbedingung für diesen Schritt ist eine Herunterregulation der MicroRNA-200-Familie, da diese andernfalls einen hemmenden Einfluss auf die EMT ausübt. Für die nun mesenchymal konfigurierten Zellen ist es jetzt möglich, den Zellverband zu verlassen und in Blutgefäße einzuwandern. Nach hämatogener Streuung und loser Absiedlung in den jeweiligen Organen kommt es nun in einer 2. Phase zur Rückumwandlung (= mesenchymale-epitheliale Transition) in epitheliale Tumorzellen. Allein diesen ist es möglich, größere Zellverbände auszubilden und damit zum Metastasenwachstum beizutragen. Als Stimulator der mesenchymalen-epithelialen Transition (MET) kommt hierbei der MicroRNA-200-Familie eine große Bedeutung zu. So könnte in der Überexpression der MicroRNA-200-Familie in Metastasen die Ursache für ein weiteres Wachstum selbiger begründet sein.

Der Einfluss, den die MicroRNA-200-Familie auf die epithelial-mesenchymale Transition ausübt, ist auch im duktalem Adenokarzinom des Pankreas von großer Bedeutung. Als eine der ersten erkannten dies *Li et al.* [137], die eine Minderexpression von miR-200b und miR-200c in Gemcitabin-resistenten Pankreaszellen nachwies und zeigen konnten, dass durch den Einsatz natürlicher Agenzien wie Isoflavone oder Diindolylmethan (DIM) eine Steigerung der Expression von miR-200b und miR-200c erzielt werden kann, woraus wiederum ein Rückgang der epithelial-mesenchymalen Transition sowie eine Verringerung der Gemcitabinresistenz resultiert. Eingehend mit der MicroRNA-200-Familie und ihrer Rolle im PDAC beschäftigten sich auch *Kent et al.* [109], die eine Überexpression der einzelnen Mitglieder – miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429 – in humanen PDAC-Zelllinien beobachteten. Darüber hinaus gelang es *Kent et al.* zu zeigen, dass die MicroRNA-200-Familie zwar das Zellwachstum positiv beeinflusst, jedoch gleichermaßen auch die Koloniebildung fördert, so dass die MicroRNA-200-Familie einen eher tumorsupprimierenden Gesamteffekt erzielt. *Zhang et al.* [261], die in ihrer Studie 95 MicroRNAs in PDAC-Zelllinien und -Resektaten analysierten, beobachteten ebenfalls eine Überexpression von miR-200b im Pankreaskarzinom und bezifferten diese auf das 6,8 - 43 fache der normalen Expressions im gesunden Pankreas. Im Gegensatz hierzu fanden *Ali et al.* [8] miR-200c als Vertreter der MicroRNA-200-Familie in nahezu allen Feinnadelbiopsaten von PDAC-Patienten in reduzierter Konzentration vor. Ebenfalls eine Überexpression der MicroRNA-200-Familie im PDAC ausmachend, führten *Li et al.* [133] diese auf eine Hypomethylierung der dazugehörigen DNA-Promoter zurück. Eine derartige Hypomethylierung konnten sie hierbei in einem Großteil der untersuchten PDAC-Zelllinien und -Gewebe nachweisen. Ein zuvor mehrfach spezulierter stabilisierender Effekt der MicroRNA-200-Familie auf die epitheliale Morphologie der PDAC-Tumorzellen konnten *Li et al.* hingegen nicht ausmachen. Vielmehr führten sie die epitheliale Konfiguration der Tumorzellen auf eine Hypermethylierung des ZEB2-Gens (SIP1) zurück, was sich in einer verstärkten E-Cadherin-Expression äußert und damit der epithelial-mesenchymalen Transition entgegenwirkt. Die MicroRNA-200-Familie scheint hieran jedoch nur wenig Anteil zu haben, da ihnen aufgrund des bereits hypermethylierten ZEB2-Gens ein wichtiger Regulationsmechanismus im PDAC fehlt. Nichtsdestoweniger hoben *Li et al.* angesichts der deutlichen Überexpression von miR-

200a und miR-200b einen möglichen diagnostischen Nutzen dieser MicroRNAs hervor. *Yu et al.* [258] hingegen schrieben der MicroRNA-200-Familie – insbesondere der MicroRNA miR-200c – prognostisches Potential zu. Sie beobachteten bei Patienten mit hoher miR-200c-Expression ein signifikant besseres Gesamtüberleben, als bei Patienten mit niedriger miR-200c-Expression. Auch wenn die gentherapeutische Anwendung der MicroRNA-200-Familie mittels Transfektion oder Transduktion für PDAC-Patienten derzeit noch nicht ausgereift ist und lediglich ein Zukunftskonzept bildet, offenbaren sich mittels Curcumin oder Curcumin-Analoga wie CDF dennoch Möglichkeiten, in die Expression der MicroRNA-200-Familie einzugreifen und dies in absehbarer Zeit auch in adjuvante und palliative Therapiekonzepte einzubinden. Dies leitet sich jedenfalls aus mehreren Untersuchungen ab, in denen gezeigt werden konnte, dass Curcumin sowie das Curcumin-Analogon CDF über eine verstärkte Expression der MicroRNA-200-Familie das Wachstum von Tumorzellen hemmen und deren Empfindlichkeit gegenüber Gemcitabin heraufsetzen kann [7, 16, 218]. Ein onkogener Einfluss der MicroRNA-200-Familie, wie er für das Mammakarzinom und das kolorektale Karzinom nachgewiesen werden konnte, wurde bislang für das Pankreaskarzinom nicht beobachtet [53, 119, 187]. Berücksichtigt man jedoch die Tatsache, dass eine auf die MicroRNA-200-Familie zurückzuführende Steigerung der Tumorzellproliferation beim Pankreaskarzinom bereits beschrieben wurde, so muss ein onkogener Effekt der MicroRNA-200-Familie auch im Hinblick auf das Pankreaskarzinom zumindest für möglich gehalten werden [258].

Neben dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) konnte eine Dysregulation der MicroRNA-200-Familie auch für zahlreiche andere Malignome, darunter Tumoren des Gastrointestinaltraktes (Ösophagus-, Magenkarzinom), gynäkologische Tumoren (Mamma-, Endometrium-, Ovarialkarzinom), Urothelkarzinome und Pleuramesotheliome, nachgewiesen werden [51, 65, 76, 215]. Je nach Art des Malignoms liegt die MicroRNA-200-Familie hierbei über- oder minderexprimiert vor: So weisen Blasen-, Endometrium-, Ovarial- und cholangiolzelluläre Karzinome typischerweise eine übermäßige Expression der MicroRNA-200-Familie auf, während Pleuramesotheliome, Ösophaguskarzinome – einschließlich Barrett-Ösophagus – und Magenkarzinome eine herabgesetzte Expression der MicroRNA-200-Familie zeigen

[51, 65, 76, 214, 215]. Das Mammakarzinom besticht laut *Sempere et al.* [208] hingegen durch eine irreguläre Expression von miR-141, miR-200b und miR-200c. Letztere lägen bei manchen Mammakarzinomen über-, bei anderen dagegen minderexprimiert vor.

Die von zahlreichen Studien nahegelegte Überexpression der MicroRNA-200-Familie oder einzelner Mitglieder selbiger im Pankreaskarzinom ließ sich in der hier vorliegenden Untersuchung nicht beobachten. Weder zwischen Pankreaskarzinom und gesundem Gewebe, noch zwischen Pankreaskarzinom und chronischer Pankreatitis bestanden signifikante Expressionsunterschiede. Alle Mitglieder der MicroRNA-200-Familie – miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429 – zeigten ein sehr variables Expressionsmuster, das zwar deutlich zwischen den einzelnen Gewebeproben differierte, nicht jedoch zwischen den untersuchten Gewebeformen (PDAC, chronische Pankreatitis, gesunde Kontrollen, Acini). Damit steht die hier ermittelte Expressionsverteilung in deutlichem Widerspruch zu vielen anderen Studien, die eine signifikante Überexpression der MicroRNA-200-Familie oder deren einzelnen Mitglieder im PDAC ausmachten [109, 133, 261]. Es ist jedoch bekannt, dass chemoresistente PDAC-Zellen hingegen die MicroRNA-200-Familie vermindert exprimieren [137]. Es kann also darüber spekuliert werden, ob die fehlende Überexpression der MicroRNA-200-Familie auf eine übermäßige Präsenz chemoresistenter PDAC-Gewebeproben in dieser Studie zurückzuführen ist. Zudem ist bekannt, dass insbesondere endokrine Drüsen, denen auch das Pankreas zuzuordnen ist, mit einer hohen miR-141- und miR-200a-Expression vergesellschaftet sind, wie es *Landgraf et al.* [125] in ihrem MicroRNA-Expressions-Atlas darlegten. Somit ist ebenfalls in Erwägung zu ziehen, dass die Expression der MicroRNA-200-Familie auch die endokrine Aktivität eines Gewebes repräsentiert und sich Expressionsunterschiede auch auf verschiedenartige endokrine Einflüsse zurückführen lassen. *Paterson et al.* [187] beobachteten eine Minderexpression der MicroRNA-200-Familie an der invasiven Front von kolorektalen Karzinomen, also in jenem Grenzbereich, in welchem sich einzelne Tumorzellen aus dem Verband lösen und die Basalmembran durchbrechen. Auch beim Pankreaskarzinom könnten randständige Tumorzellen eine niedrigere miR-200-Expression aufweisen. Die niedrige miR-200-Expression wäre dann

Ausdruck einer vollzogenen epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), mit der die Tumorzelle versucht, ihre Migrationsfähigkeit zu erhöhen. Dementsprechend könnten die zwischen den einzelnen Karzinomen ermittelten Expressionsunterschiede auf Konfigurationsunterschieden der zugrundeliegenden Tumorzellen beruhen. So wäre es möglich, dass Pankreaskarzinome mit einer geringeren MicroRNA-200-Expression einen höheren Anteil mesenchymal umgewandelter Tumorzellen beinhalten, während eine hohe MicroRNA-200-Expression auf einen hohen Anteil epithelial konfigurierter Tumorzellen hinweist. Dies wiederum würde bedeuten, dass die MicroRNA-200-Expression Rückschlüsse auf die Aggressivität des jeweiligen Pankreaskarzinoms erlaubt. Allen Hypothesen zum Trotz kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die MicroRNA-200-Familie grundsätzlich eine auf das einzelne Pankreaskarzinom bezogene, individuelle und weitgehend unabhängige Expression aufweist, wie es *Sempere et al.* [208] auch für Mammakarzinome beobachten konnten.

Eine im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung durchgeführte Korrelationsanalyse zeigte, dass die einzelnen Mitglieder der MicroRNA-200-Familie in Bezug auf ihre Expression deutlich zusammenhängen. So korrelierte die Expression der einzelnen Mitglieder in den meisten Fällen auf hohem ($r > 0,7$) oder mittlerem ($r > 0,5$) Niveau miteinander. Insbesondere zwischen miR-141 und miR-200a stellte sich ein starker Zusammenhang dar ($r = 0,864$; $p = 0,001$). Dieser erscheint plausibel, da miR-141 und miR-200a sich in ihrer Bindungsregion (*seed sequence, -region*) für die entsprechenden Ziel-mRNAs vollkommen gleichen und somit eine gleichgerichtete Wirkung unter Nutzung derselben Zielmoleküle angenommen werden kann. Dementsprechend könnten Regulationsmechanismen, die zu einer vermehrten Expression der einen MicroRNA beitragen, auch gleichermaßen die Expression der anderen MicroRNA fördern. Ein weiterer starker Zusammenhang wurde zwischen miR-200a und miR-200b ermittelt ($r = 0,971$; $p = 0,001$). Eine explizierte Erklärung fand sich hierfür jedoch nicht. Insgesamt stützen die Ergebnisse dieser Korrelationsanalyse die Zusammenfassung von miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429 unter dem Oberbegriff der MicroRNA-200-Familie. Neben genomischer Herkunft (Chromosom 1 / Chromosom 12), funktionellen Aspekten (*seed sequence*) sowie Wirkung (Steigerung der E-Cadherin-Synthese, mesenchymal-

epitheliale Transition) stellt das Expressionsmuster gemäß den hier ermittelten Ergebnissen eine weitere Gemeinsamkeit der einzelnen Mitglieder der MicroRNA-200-Familie dar.

Anders als *Li et al.* [133] die bei Pankreaskarzinompatienten erhöhte Serumkonzentrationen von miR-200a und miR-200b vorfanden und beiden MicroRNAs einen potentiellen diagnostischen Nutzen zuschrieben, konnte ein diagnostisches Potential der MicroRNA-200-Familie in der hier vorliegenden Studie nicht herausgestellt werden. Die in der ROC-Analyse ermittelten AUC-Werte variierten je nach miR-200-Mitglied von 0,368 bis 0,684, sind jedoch aufgrund der fehlenden Signifikanz kaum verwertbar. Somit ist zumindest in dieser Studie die diagnostische Leistungsfähigkeit der gesamten MicroRNA-200-Familie oder eines ihrer Mitglieder fraglich.

Analog zum diagnostischen Potential der MicroRNA-200-Familie, welches sich in der hier thematisierten Untersuchung nicht erkennen ließ, konnte auch ein prognostischer Nutzen der MicroRNA-200-Familie hier nicht nachgewiesen werden. So konnte weder ein Zusammenhang zwischen der Expression der MicroRNA-200-Familie und der rezidivfreien Zeit, noch zwischen der Expression und dem Gesamtüberleben beobachtet werden. Zu einem deutlich anderem Ergebnis kamen hingegen *Yu et al.* [258], die mit ansteigender miR-200c-Expression einen Anstieg der Überlebenszeit verzeichneten und somit miR-200c als einen möglichen Biomarker der Pankreaskarzinom-Prognostik ansahen. Dass ein prognostischer Nutzen der MicroRNA-200-Familie in dieser Studie nicht nachgewiesen werden konnte, vermag auch ein Resultat der nur geringen Fallzahl sein. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei größerem Probenumfang signifikante Ergebnisse hätten erzielt und so ein prognostisches Potential der MicroRNA-200-Familie hätte herauskristallisiert werden können. Angesichts der fehlenden Signifikanz ist eine Verwertung der hier ermittelten Hazard-Ratios jedoch nicht möglich.

Von allen hier untersuchten MicroRNAs – miR-21*, miR-155, miR-196a, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429 – zeigten sich für die Mitglieder der MicroRNA-200-Familie die geringsten Expressionsunterschiede zwischen Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas. Dementsprechend konnte auch ein diagnostisches und prognostisches Potential der MicroRNA-200-Familie nicht beobachtet werden. Auch wenn angesichts der nur geringen Fallzahl die hier ermittelten Ergebnisse kritisch zu hinterfragen sind, sollte dennoch der Stellenwert der MicroRNA-200-Familie in einer zukünftigen, MicroRNA-basierten Diagnostik, Prognostik und Therapie des Pankreaskarzinoms überdacht werden. Nichtsdestoweniger stellt die MicroRNA-200-Familie mit ihren 4 Mitgliedern eine wichtige, evolutionär stark konservierte MicroRNA-Gruppierung dar, die aufgrund ihrer genomischen und funktionellen Gemeinsamkeiten sicherlich von nicht unerheblicher Bedeutung im PDAC ist und deren Regulationsmechanismen weitergehend erforscht werden müssen. Die zwischen den einzelnen Mitgliedern nachgewiesenen Expressionszusammenhänge liefern möglicherweise einen weiteren Beitrag zur Aufdeckung des miR-200-Regulationsnetzwerkes. Ist letzteres erst einmal bekannt, so vermag der Schritt zur diagnostischen und therapeutischen Anwendung der MicroRNA-200-Familie nicht mehr groß zu sein.

6.3.6 Die azinäre MicroRNA-Expression

Die vorliegende Untersuchung fokussierte sich auf die duktaalen Epithelzellen des Pankreas, die hinsichtlich der MicroRNA-Expression mit den Tumorzellen des PDAC verglichen wurden. Grundlage hierfür bildete die Hypothese eines duktaalen Ursprungs des Pankreaskarzinoms, für den *Anne Grapin-Botton* [74] und *Ueda et al.* [237] Erklärungsmodelle formulierten. Um jedoch auch eine mögliche azinäre Genese des Pankreaskarzinoms, die von *Rooman et al.* [196] favorisiert wird, zu berücksichtigen, wurde vergleichend auch die MicroRNA-Expression azinärer Zellen analysiert.

Zwischen den duktaalen und den äzinären Epithelzellen konnte in dieser Studie kein signifikanter Unterschied in der Expression von miR-21* ($p = 0,700$), miR-155 ($p = 0,700$), miR-196a ($p = 0,400$), miR-141 ($p = 1,000$), miR-200a ($p = 0,200$), miR-200b

($p = 0,200$), miR-200c ($p = 1,000$) und miR-429 ($p = 0,700$) ermittelt werden. Dieses Ergebnis kann jedoch keinesfalls als valide gewertet werden, da es sich um einen Vergleich äußerst kleiner Stichproben (3 gesunde Duktus-Proben, 3 gesunde Azinus-Proben) handelt. Nimmt man jedoch an, dass dieses Ergebnis die realen Verhältnisse widerspiegelt, so scheinen sich duktale und azinäre Zellen in der Expression wichtiger onkogener und tumorsupprimierender MicroRNAs weitgehend zu gleichen. Dies wiederum wäre eine interessante Entdeckung, da sowohl die dukталen, als auch die azinären Zellen als Ursprungszellen des PDAC gehandelt werden [196, 221]. Vorstellbar ist, dass das PDAC sowohl von den dukталen, als auch von den azinären Epithelzellen seinen Ursprung nehmen kann. Bis heute ist jedenfalls nicht geklärt, ob das duktale Adenokarzinom des Pankreas einer Zellform entspringt oder auch mehrerer Zelltypen entstammen kann [221].

Signifikante Expressionsunterschiede zwischen PDAC und gesunden Azinuszellen konnten lediglich für miR-21* ($p = 0,036$) und für miR-196a ($p = 0,018$) beobachtet werden. Neben chronischer Pankreatitis und den gesunden Duktuszellen hebt sich die miR-196a-Expression des Pankreaskarzinoms damit auch von den gesunden Azinuszellen ab, was das diagnostische Potential von miR-196a als Biomarker des Pankreaskarzinoms unterstreicht. Überraschenderweise differierte die miR-21*-Expression des Pankreaskarzinoms signifikant von der der Azinuszellen, während duktale Epithelzellen und PDAC keinen signifikanten Expressionsunterschied aufwiesen. Betrachtet man das gesamte Pankreasparenchym, das sich beim gesunden Menschen größtenteils aus Azinus-Epithelzellen zusammensetzt, so könnte miR-21* neben miR-196a durchaus zur Erkennung des Pankreaskarzinoms herangezogen werden, da in diesem Fall signifikante Unterschiede zu verzeichnen wären. Ein fibrotisch umgebautes Pankreas, wie es bei der chronischen Pankreatitis vorliegt, könnte anhand von miR-21* hingegen nicht vom Pankreaskarzinom abgegrenzt werden, da der Mangel an Azinuszellen signifikante Expressionsunterschiede zwischen beiden Gewebeformen zunichtemachen würde.

6.4 Konklusion

Mit der Untersuchung von Tumorzellen des PDAC sowie von duktalem Epithelzellen der chronischen Pankreatitis und des gesunden Pankreas versucht die hier vorliegende Untersuchung dem Anspruch einer hohen Genauigkeit sowie einer guten Vergleichbarkeit zwischen den drei Gewebeformen gerecht zu werden. Die isolierte Betrachtung der MicroRNA-Expression von PDAC-Tumorzellen ohne den verzerrenden Einfluss des umgebenden Stromas ist hierbei keine neue Herangehensweise, sondern wurde bereits von *Dillhoff et al.* [48] praktiziert. Nutzen letztere jedoch die In-situ-Hybridisierung um gezielt die MicroRNA-Expression der Malignomzellen zu untersuchen, so bedient sich die hier vorliegende Studie der Laser-Mikrodissektion sowie der qRT-PCR und etabliert damit eine recht neue Verfahrensweise zur MicroRNA-Analyse aus pankreatischen FFPE-Geweben. Die Aussage von *Dillhoff et al.* [48], dass die qRT-PCR unfähig ist, zwischen der MicroRNA-Expression von Tumorzellen und einer stromalen Kontamination zu unterscheiden, muss nun insoweit relativiert werden, als dass die Kombination aus Laser-Mikrodissektion und qRT-PCR zu einer derartigen Differenzierung wohl in der Lage ist. Zwar wurde die stromale MicroRNA-Expression in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht, jedoch ist angesichts der erfolgreichen MicroRNA-Analyse von Tumorzellen und duktalem Zellen davon auszugehen, dass mit dieser hier vorgestellten Technik jede Zellform und jeder Gewebeabschnitt des Pankreas auch ausgehend von FFPE-Geweben isoliert analysiert werden kann. Galten bislang Zellkulturen und frisch-gefrorene Gewebe als vornehmliche Materialien für zellspezifische molekulargenetische Untersuchungen, so zeigt doch diese Studie, dass sich FFPE-Gewebe vorzüglich für MicroRNA-Analysen eignen. Mit der Laser-Mikrodissektion und der qRT-PCR stehen zudem Techniken zur Verfügung, die zell- und strukturspezifische Untersuchungen ausgehend von FFPE-Geweben ermöglichen.

Der Vergleich des MicroRNA-Expressionsmusters zwischen Malignom- und Duktus-Zellen ist ebenfalls nicht neu: Schon *Szafrańska et al.* [227] und *Ohuchida et al.* [177] – um nur einige Arbeitsgruppen zu nennen – fokussierten sich neben den PDAC-Tumorzellen auch auf die duktalem Epithelzellen des Pankreas und nutzen hierfür ebenfalls die qRT-PCR. Neu ist jedoch, eine solche Analyse unter Nutzung der Laser-

Mikrodissektion an FFPE-Geweben des Pankreas durchzuführen, wie es in der hier vorliegenden Arbeit vorgestellt wird. Aufgrund des erheblichen Aufwands, der zur Gewinnung der Vielzahl an Dissektaten, die für eine valide MicroRNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR nötig sind, betrieben wird, ist der Umfang einer solchen Studie naturgemäß stark limitiert. Mit einer Fallzahl von 19 (PDAC = 9, CP = 7, GK = 3) ist die Aussagekraft der hier vorliegenden Arbeit sicherlich begrenzt, entspricht aber dem anderer vergleichbarer Studien. Auch *Szafranska et al.* [227] und *Ohuchida et al.* [177] analysierten in einem äquivalenten Umfang (n = 16, n = 16) mikrodissektiertes Gewebe bzw. mikrodissektierte Zellen. Der Großteil aller PDAC-MicroRNA-Studien verzichtet aber nach wie vor zugunsten einer großen Fallzahl auf zellspezifische Untersuchungen (siehe *Tabelle 24*).

Tabelle 24: Vergleich der vorliegenden Arbeit mit anderen Studien

Studie:	Untersuchtes Material:	Probenanzahl:	Gruppen:	Mikrodissektion:	LCM:	Fokussierung Ductuli / Tumorzellen:	Untersuchte MicroRNAs in qRT-PCR:
Vorliegende Studie	FFPE-Präparate	19	PDAC / CP / GK*	✓	✓	✓	8 (PCR bei allen Proben)
Ali et al. [8]	FFPE-Präparate	44**	Feinnadelbiopsate PDAC / (GK)	✗	✗	✗	7 (PCR bei allen Proben)
Bloomston et al. [26]	FFPE-Präparate	107**	PDAC / CP / (GK)	✓	✗	✗	8 (PCR nur bei 16 Proben)
Greither et al. [77]	Fresh-frozen-tissue	56	PDAC	✓	✗	✗	6 (PCR bei allen Proben)
Jamieson et al. [101]	Fresh-frozen-tissue	82	PDAC / GK	✗	✗	✗	6 in 48 Proben, 2 in 24 Proben
Lee et al. [129]	Fresh-frozen-tissue und Zelllinien	62**	PDAC / CP / GK	✗	✗	✗	3 (PCR nur bei 9 Proben)
Munding et al. [164]	FFPE-Präparate und Fresh-frozen-tissue	113	PDAC / CP / GK	(✓) (bei 9 Proben)	✗	(✓) (bei 9 Proben)	10 (PCR bei allen Proben)
Nakata et al. [168]	FFPE-Präparate + Fresh-frozen-tissue + Zelllinien	145	PDAC / GK	(✓) (bei 15 Proben)	(✓) (bei 15 Proben)	(✓) (bei 15 Proben)	1 (PCR bei allen Proben)
Ohuchida et al. [177]	Zelllinien	16	PDAC / GK	✓	✓	✓	6 (PCR bei allen Proben)
Panarelli et al. [181]	FFPE-Präparate	80	PDAC / IPMN / GK / BPL	✗	✗	✗	7 (PCR bei allen Proben)
Papaconstantinou et al. [182]	FFPE-Präparate	186**	PDAC / GK	✗	✗	✗	9 (PCR bei allen Proben)
Szafranska et al. [226]	Fresh-frozen-tissue und Zelllinien	19 Gewebeprobe + 6 Zelllinien	PDAC / CP / GK	✗	✗	✗	5 (in 19 Proben)
Szafranska et al. [227]	Fresh-frozen-tissue	16 Feinnadelbiopsate +20 Fresh-frozen-tissue	Feinnadelbiopsate (PDAC / GK) + Vergleichsproben PDAC / CP / GK	(✓) (bei 16 Proben)	✗	(✓) (bei 16 Proben)	13 (PCR bei allen Proben)
Schultz et al. [206]	FFPE-Präparate	225	PDAC	✗	✗	✗	5 (PCR bei allen Proben)
Zhang et al. [261]	Pankreas-gewebe und Zelllinien	34 Gewebeproben** + 10 Zelllinien	PDAC / CP / (GK)	✗	✗	✗	95 in 14 Proben, 8 in allen Proben

*Gesunde Kontrollen, sich in duktales und azinäre Proben untergliedernd; **umfasst Proben, die den gleichen Patienten entstammen; z.B. unauffälliges Pankreasparenchym von Tumorpatienten als Kontrollproben; PDAC = Duktales Adenokarzinom des Pankreas; IPMN = Intraduktales papilläres muzinöses Neoplasie; CP = Chronische Pankreatitis; BPL = Benigne pankreatische Läsionen (Pankreatitiden, Zysten, benigne Tumoren etc.); GK = Gesunde Kontrolle = histomorphologisch unauffälliges Pankreasparenchym

Verglichen mit anderen Studien, die ebenfalls die MicroRNA-Expression im Pankreaskarzinom untersuchten, stellen sich die hier ermittelten Ergebnisse ambivalent dar: Trugen einerseits die hier erhaltenen Ergebnisse dazu bei, die Beobachtungen anderer Studien zu bestätigen, standen andererseits einige Resultate teils in deutlichem Widerspruch zu denen anderer Untersuchungen (*Tabelle 25*)

Die Überexpression von miR-196a im duktalem Adenokarzinom des Pankreas, die zuvor u.a. auch schon von *Szafrańska et al.* [226, 227] und *Panarelli et al.* [181] nachgewiesen wurde, konnte so auch im direkten Vergleich zu der chronischen Pankreatitis und zum gesundem Pankreas erneut herausgestellt werden. Genauso konnte das diagnostische Potential von miR-196a als Biomarker des Pankreaskarzinoms bekräftigt werden, wie es auch *Kong et al.* [115], *Liu et al.* [143] und *Szafrańska et al.* [226, 227] dieser MicroRNA zuschrieben. Für die von *Bloomston et al.* [26] postulierte prognostische Verwertbarkeit des Biomarkers miR-196a fanden sich hingegen keine Anhaltspunkte.

Besonders deutlich divergierten die hier gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der MicroRNAs miR-21 bzw. miR21* und miR-155 von denen anderer Studien. Die vielfach nachgewiesene Überexpression von miR-21/miR-21* und miR-155 im Pankreaskarzinom ließ sich in dieser Untersuchung nicht reproduzieren. Dennoch zeigten die hier gewonnenen Daten, dass der MicroRNA miR-21* durchaus ein diagnostischer Effekt in der Erkennung des Pankreaskarzinoms zukommt, der jedoch nicht so deutlich ausgeprägt ist, wie bei miR-196a. Anders als in den Untersuchungen von *Dillhoff et al.* [48], *Greither et al.* [77] und *Jamieson et al.* [101] zeigte sich hier kein Zusammenhang zwischen der Expression von miR-21* sowie miR-155 und dem Outcome (rezidivfreies Überleben / Gesamtüberleben).

Über die Rolle der MicroRNA-200-Familie im duktalem Adenokarzinom des Pankreas ist zurzeit noch wenig bekannt. Strittig ist insbesondere, in welcher Weise sich die Expression der MicroRNA-200-Familie im PDAC zu der des gesunden Pankreas unterscheidet. So sehen *Kent et al.* [109] und *Munding et al.* [164] die MicroRNA-200-

Familie als im Pankreaskarzinom überexprimiert an, während *Ali et al.* [8], *Jamieson et al.* [101] und *Schultz et al.* [207] eher eine Minderexpression einzelner Mitglieder im PDAC beobachten konnten. Die vorliegende Arbeit kann hingegen weder das eine, noch das andere bestätigen: Signifikante Expressionsunterschiede der einzelnen MicroRNA-200-Familienmitglieder ließen sich zwischen Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas nicht beobachten. Genauso wenig ließ sich ein diagnostisches oder prognostisches Potential der MicroRNA-200-Familie ausmachen.

Unberücksichtigt blieb in dieser sowie in den meisten der anderen Arbeiten der Einfluss von Kofaktoren auf die MicroRNA-Expression des Pankreaskarzinoms. Es ist nicht auszuschließen, dass persönliche Lebensfaktoren und Umweltfaktoren, aber auch die Einnahme von Medikamenten einen erheblichen Einfluss auf die MicroRNA-Expression der Zellen ausüben. Von Metformin beispielsweise weiß man seit der Studie von *Li et al.* [136], dass es die MicroRNA-Expression beeinflusst und zu einer verstärkten Expression einzelner MicroRNAs beitragen kann. Auch die hier beobachteten signifikanten oder nicht signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas können im wesentlichen Maße durch Kofaktoren verfälscht sein. Es ist die Aufgabe nachfolgender Arbeiten, derartige Einflüsse weitergehend zu klären und bisherige Daten aufgrund neuerer Erkenntnisse zu falsifizieren.

Mit der Untersuchung von MicroRNAs aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Pankreasgeweben und der Nennung von miR-196a als möglichen Biomarker des Pankreaskarzinoms wird hier eine neue diagnostische Methode vorgestellt, die als Ergänzung zur bisherigen histomorphologischen und immunhistochemischen Untersuchungen denkbar wäre, um sensitiv und spezifisch Pankreaskarzinome von anderen pankreatischen Läsionen in FFPE-Biopsaten herauszufiltern. Gegen eine solche Verwendung der hier vorgestellten Methodik spricht allerdings der enorme Aufwand, der betrieben werden muss, um isoliert MicroRNAs aus duktalem Zellen oder Tumorzellen zu analysieren. Dies ist im klinischen Alltag kaum zu realisieren, zumal sowohl eine schnelle, als auch kostengünstige

Ergebnisfindung erwartet wird. Dennoch kann die hier vorliegende Arbeit vielleicht dazu beitragen, neue diagnostische Konzepte zu entwickeln, die mit FFPE-Geweben als Ausgangsmaterialien eine sichere und frühzeitige Identifikation von Pankreaskarzinomen ermöglichen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse werfen weitere Fragen auf, die aktuell noch ungelöst sind. Nach fokussierter Betrachtung der Tumorzellen des PDAC ist nun eine gezielte Untersuchung der MicroRNA-Expression des Tumorstromas mit nachfolgendem direktem Vergleich zwischen diesem und den Tumorzellen notwendig. Zudem gilt es die MicroRNA miR-196a auf einen möglichen diagnostischen und evtl. auch therapeutischen Einsatz beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas nähergehend zu untersuchen. Mit miR-21 und miR-21* liegen zwei Isoformen einer onkogenen MicroRNA vor. Auch hier lohnt sich ein Vergleich der PDAC bezogenen Expression beider Varianten, um mehr über die regulatorischen Einflüsse selbiger im Pankreaskarzinom in Erfahrung zu bringen. Nicht zuletzt bleibt auch die Rolle der MicroRNA-200-Familie im Pankreaskarzinom weiterhin unklar. So konnten in dieser Untersuchung keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen dem Pankreaskarzinom, der chronischen Pankreatitis und dem gesunden Pankreas ermittelt werden. Andere Studien berichten hingegen von einer Über- oder Minderexpression der MicroRNA-200-Familie im PDAC. Auch dies gilt es in weiteren differenzierten Studien zu eruieren. Mit MicroRNA-Analysen aus FFPE-Präparaten bietet sich eine neue Möglichkeit histopathologische Diagnosen molekularbiologisch zu verifizieren und histomorphologisch nur schwer einzuordnende pankreatische Läsionen über das MicroRNA-Expressionsmuster zu identifizieren.

Tabelle 25: Ergebnisvergleich der vorliegenden Untersuchung mit anderen Studien

Studie:	miR-21 / miR-21*	miR-155	miR-196a	miR-141	miR-200a	miR-200b	miR-200c	miR-429
Vorliegende Untersuchung	↔, (D)	↔	↑, D	↔	↔	↔	↔	↔
Ali et al. [8]	nicht untersucht	↓	nicht untersucht					
Bloomston et al. [26]	↑	↑	↔, P	nicht untersucht				
Dillhoff et al. [48]	↑, P	nicht untersucht						
Greither et al. [77]	nicht untersucht	↑, P	nicht untersucht					
Jamieson et al. [101]	↑, P	↑	nicht untersucht	↓	nicht untersucht	nicht untersucht	↓	nicht untersucht
Kent et al. [109]	nicht untersucht	↑	nicht untersucht	↑	↑	↑	nicht untersucht	↑
Kong et al. [115]	↑, D	↑, D	↑, D, P	nicht untersucht				
Lee et al. [129]	↑	↑	nicht untersucht					
Liu et al. [143]	↑	↑	↑, D	nicht untersucht				
Munding et al. [164]	↑	nicht untersucht	↑	↑	↑	nicht untersucht	nicht untersucht	↑
Panarelli et al. [181]	↑	↑	↑	nicht untersucht				
Papaconstantinou et al. [182]	↑	↑	nicht untersucht					
Schultz et al. [207]	↑	nicht untersucht	miR-196b ↑, D	↓	nicht untersucht	nicht untersucht	↓	nicht untersucht
Szafranska et al. [226]	nicht untersucht	↑	↑, D	nicht untersucht				
Zhang et al. [261]	↔	↔	↑	↔	↔	↑	↔	↔

- ↑ = Signifikante Überexpression der untersuchten MicroRNA im PDAC verglichen mit gesundem Pankreas
- ↔ = Kein signifikanter Expressionsunterschied der untersuchten MicroRNA zwischen PDAC und gesundem Pankreas
- ↓ = Signifikante Minderexpression der untersuchten MicroRNA im PDAC verglichen mit gesundem Pankreas
- D = Diagnostisches Potential nachgewiesen, z.B. korrekte Identifikation von Pankreaskarzinomen anhand des MicroRNA-Expressionsmusters möglich
- P = Prognostisches Potential nachgewiesen, z.B. Einschätzungen über das Überleben anhand des MicroRNA-Expressionsmusters möglich

6.5 Ausblick

Aufgrund ihres umfassenden Regulationsnetzwerkes und der mannigfaltigen Möglichkeiten, zelluläre Prozesse zu steuern, birgen MicroRNAs großes diagnostisches und therapeutisches Potential. Dies ist vor allem in der Onkologie und onkologischen Chirurgie von großem Interesse, da trotz umfangreicher diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen die Prognose zahlreicher Malignome limitiert ist. Insbesondere das duktales Adenokarzinom des Pankreas zählt zu den aggressivsten Malignomen des Menschen mit einer sehr schlechten Prognose. MicroRNAs könnten hierbei sowohl in der Diagnostik, als auch in der Therapie des Pankreaskarzinoms zum Einsatz kommen.

Während für viele Karzinome bereits Screeninguntersuchungen etabliert sind – man denke nur an die zytologischen Untersuchungen beim Zervixkarzinom, dem PSA-Test beim Prostatakarzinom, der Mammographie beim Mammakarzinom und der Koloskopie beim kolorektalen Karzinom – existiert für das Pankreaskarzinom bis jetzt kein valides und praktikables Screeningverfahren. Dies könnte sich mit der Serum-Analyse von MicroRNAs ändern. Die Untersuchungen von *Wang et al.* [245], *Kong et al.* [115], *LaConti et al.* [123] und *Liu et al.* [144] zeigen, dass das Pankreaskarzinom mit Konzentrationsveränderungen einzelner MicroRNAs im Plasma assoziiert ist. Analog zum Prostata-spezifischen Antigen (PSA) könnten so auch MicroRNAs zu serologischen Screeningparametern des PDAC avancieren. Schenkt man *Link et al.* [140] Glauben, so könnten neben dem Serum aber auch Stuhlproben als Ausgangsmaterial für ein MicroRNA-basiertes Pankreaskarzinomscreening dienen.

Die diagnostischen Einsatzmöglichkeiten von MicroRNAs sind jedoch nicht nur auf ein Screening des PDAC beschränkt. Auch bestehende Diagnostika könnten durch eine Kombination mit MicroRNA-basierten Verfahren eine Aufwertung erfahren. Exemplarisch sei hier die (endosonographisch gesteuerte) Feinnadelpunktion genannt, die auch heute noch regelmäßig mit falsch-negativen Ergebnissen einhergeht [161]. Spezifität und Sensitivität histopathologischer Untersuchungen könnten durch Hinzunahme bestimmter MicroRNAs als PDAC-Biomarker deutlich zunehmen. Mit

miR-196a und miR-217 stellten *Szafrańska et al.* [227] zwei solcher MicroRNAs vor. In der hier vorliegenden Studie konnte hierbei gezeigt werden, dass auch miR-196a alleine ein sinnvoller Biomarker des PDAC in FFPE-Gewebe ist.

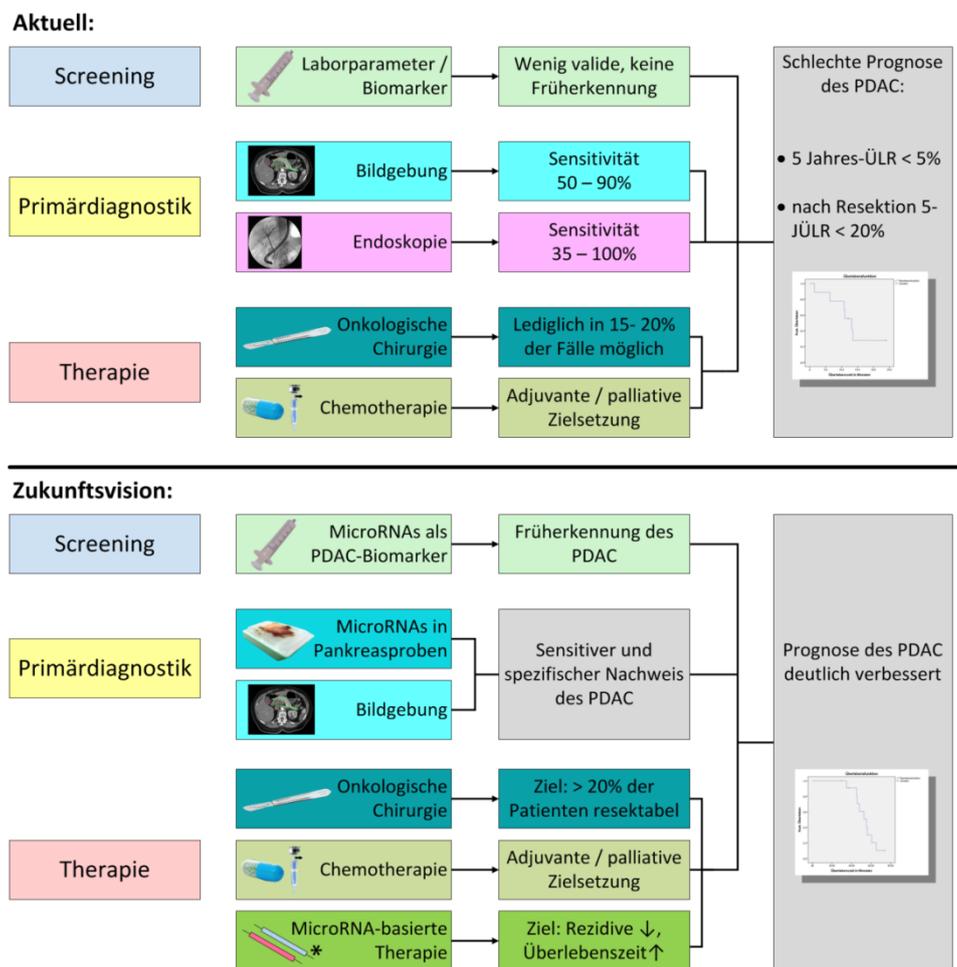
Neben der Diagnostik könnte auch die Prognostik ein weiteres Aufgabenfeld von MicroRNA-Biomarkern beim Pankreaskarzinom sein. Als Ergänzung zu CA 19-9 könnten MicroRNAs zukünftig wichtige Parameter zur Verlaufskontrolle des Pankreaskarzinoms darstellen. Denkbar ist jedoch auch, dass anhand des MicroRNA-Expressionsprofils eines jeden PDAC-Patienten schon vor Therapiebeginn Aussagen über die Gesamtprognose getroffen werden können und ausgehend von dieser die Auswahl der richtigen, individuell zugeschnittenen Therapieform erfolgen kann. Dies gilt insbesondere für die Auswahl eines geeigneten Chemotherapeutikums zur adjuvanten oder palliativen Behandlung, da einige MicroRNAs – wie u.a. von *Giovannetti et al.* [68] dargestellt – deutlich die Chemoresistenz der Karzinomzellen beeinflussen. Auch wenn sicherlich die eine oder andere MicroRNA zur Prognoseabschätzung beim Pankreaskarzinom eingesetzt werden kann, so muss erneut darauf hingewiesen werden, dass ein prognostisches Potential der hier untersuchten MicroRNAs – miR-21, miR-155, miR-196a, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429 – sich in der vorliegenden Studie nicht offenbarte.

Nicht unerwähnt bleiben sollte das therapeutische Potential, dass den MicroRNAs im Hinblick auf das Pankreaskarzinom innenwohnen könnte. So ließe sich mit AntagomiRs eventuell auch im Menschen eine Inaktivierung onkongener MicroRNAs wie miR-21, miR-155 sowie miR-196a vornehmen und hierüber eine deutliche Prognosebesserung, wenn nicht gar Heilung des Pankreaskarzinoms erzielen [122, 183]. Umgekehrt könnte durch die Restauration tumorsupprimierender MicroRNAs, wie der MicroRNA-200-Familie, ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert und Chemoresistenzen der Karzinomzellen abgebaut werden [7, 137]. Dabei müssen jedoch auch mögliche gegenläufige oder tumorindividuelle Effekte berücksichtigt werden. So wird für die MicroRNA-200-Familie nicht allein eine tumorsupprimierende Wirkung angenommen,

sondern in bestimmten Phasen der Tumorausbreitung auch ein onkogener Effekt gelten gemacht [53, 187].

Einen Überblick darüber, wie die Anwendung von MicroRNAs in Zukunft zu einer deutlichen Optimierung der Diagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms beitragen könnten, liefert die nachfolgende Grafik (*Abbildung 37*):

Abbildung 37: Zukunftsvision einer MicroRNA-basierten PDAC-Diagnostik und -Therapie



7 Zusammenfassung

Trotz zahlreicher Fortschritte in der Diagnostik und Therapie weist das Pankreaskarzinom eine nahezu unverändert schlechte Prognose auf, eine Kuration gelingt nur in den wenigsten Fällen. Dies ist vor allem der späten Diagnosestellung geschuldet. So bleibt 80 - 85 % der Patienten aufgrund des schon fortgeschrittenen Tumorleidens eine kurative Operation verwehrt.

Mit den aktuell verfügbaren diagnostischen Mitteln ist eine frühzeitige Identifikation der Pankreaskarzinome zumeist nicht möglich. Hinzu kommt, dass oftmals auch die Abgrenzung zwischen Pankreaskarzinom und benignen Läsionen – wie z.B. von Gewebeprozessen bei chronischer Pankreatitis – nicht sicher gelingt. Serologische Parameter, wie der Tumormarker CA 19-9, tragen durch ihre relativ geringe Sensitivität und Spezifität hierbei nicht zu einer Sicherung der Diagnose bei.

Um eine Früherkennung des Pankreaskarzinoms zu ermöglichen, wird intensiv an Biomarkern geforscht. In das Blickfeld gegenwärtiger Forschung sind diesbezüglich kleine Ribonukleinsäuren – die sogenannten „MicroRNAs“ – gerückt, die zwar nicht für Proteine kodieren, jedoch auf epigenetischer Ebene großen Einfluss auf die Genregulation ausüben. Zwei Umstände rufen hierbei besonderes Interesse hervor:

- 1.) Über verschiedene Zielgene vermittelt, üben einige MicroRNAs eine Funktion als Onkogene aus, während andere wiederum als Tumorsuppressoren fungieren.
- 2.) Zahlreiche Malignome weisen – verglichen mit dem gesunden Ursprungsgewebe – deutliche Veränderungen der MicroRNA-Expression auf.

Auch das Pankreaskarzinom ist zahlreichen Studien zufolge mit einer derartigen Deregulation der MicroRNA-Expression assoziiert. Diese Deregulation wiederum könnte sowohl diagnostisch, als auch therapeutisch genutzt werden.

Als mutmaßlich onkogene MicroRNAs des Pankreaskarzinoms wurden unter anderem miR-21, miR-155 und miR-196a identifiziert. Eine ambivalente Rolle hingegen nimmt die MicroRNA-200-Familie ein: Sie kann Studien zufolge sowohl als Tumorsuppressor, als auch als Onkogen fungieren. Welche Eigenschaft im Pankreaskarzinom überwiegt, ist derzeit noch unklar.

Ziel der hier vorliegenden Studie war es, die MicroRNA-Expression des Pankreaskarzinoms mit jener der chronischen Pankreatitis und des gesunden Pankreas zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurde MicroRNA aus Tumorzellen sowie aus duktalem Epithelzellen extrahiert. Die Grundlage hierfür bildeten Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Pankreaspräparate. Die Separierung der jeweiligen Zelltypen erfolgte mittels Laser-Mikrodissektion. Mittels quantitativer Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion gelang es, die Expressionsunterschiede zwischen Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas zu quantifizieren.

Die vorliegende Untersuchung konzentrierte sich hierbei auf 8 MicroRNAs: miR-21*, miR-155, miR-196a, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429. Die letztgenannten fünf MicroRNAs lassen sich hierbei zur MicroRNA-200-Familie zusammenfassen. 19 Pankreasgewebe, darunter 9 Adenokarzinom-Präparate (PDAC), 7 Pankreatitis-Präparate und 3 gesunde Pankreata, lagen dieser Studie zugrunde.

Ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen dem Pankreaskarzinom einerseits und der chronischen Pankreatitis sowie dem gesunden Pankreas andererseits konnte lediglich für miR-196a nachgewiesen werden. Diese zeigte eine 1,6 - 794 fache Überexpression im PDAC gegenüber der chronischen Pankreatitis und dem gesunden Pankreas. Für miR-21* und miR-155 sowie für die gesamte MicroRNA-200-Familie konnten zwischen den jeweiligen Geweben hingegen keine signifikanten Expressionsunterschiede ermittelt werden.

Ausgehend von ermittelten Expressionsunterschieden wurden die einzelnen MicroRNAs nachfolgend auf ihr diagnostisches und prognostisches Potential hin untersucht. Mit einer AUC von 0,991 in der ROC-Analyse präsentierte sich miR-196a als ein potentieller Biomarker der Pankreaskarzinom mit guter Sensitivität und Spezifität. Auch für miR-21* konnte ein diagnostischer Nutzen belegt werden, wenn auch dieser mit einer AUC von 0,803 deutlich geringer einzustufen ist. Für die übrigen MicroRNAs konnte ein diagnostischer Stellenwert nicht nachgewiesen werden. Genauso wenig zeigte sich ein Einfluss der MicroRNA-Expression auf das Gesamtüberleben oder die rezidivfreie Zeit.

Mit den oben genannten Ergebnissen beweist die hier vorliegende Studie, dass eine auf duktalem Zellen ausgerichtete MicroRNA-Analyse möglich ist und einen Beitrag in der Diagnostik des Pankreaskarzinoms zu leisten vermag. Aufgrund des hohen methodischen Aufwandes bleibt die hier vorgestellte Verfahrensweise jedoch lediglich speziellen Fragestellungen vorbehalten – eine klinische Alltagstauglichkeit kann derzeit nicht bescheinigt werden. Festzuhalten bleibt, dass mit der MicroRNA miR-196a ein Biomarker für das Pankreaskarzinom in Aussicht gestellt werden kann, der mit guter Sensitivität und Spezifität das Pankreaskarzinom von chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas abgrenzen kann.

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre in dieser Form ohne die Unterstützung und Mithilfe zahlreicher Personen nicht möglich gewesen. Aus diesem Grund möchte ich dieses Kapitel all denjenigen widmen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, und ihnen meinen aufrichtigen Dank aussprechen:

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern sowie meinem Bruder für die jahrelange Unterstützung, Geduld und Motivation. Frustrationen und Zweifel meinerseits wussten sie stets zu zerstreuen und durch Zuversicht zu ersetzen.

Herausragenden Dank möchte ich ebenfalls meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sören Torge Mees, zollen, der mich in die ebenso fantastische, wie auch komplexe Welt der MicroRNAs einführte und sich bereit erklärte, die mit erheblichen Mühen verbundene Betreuung der hier vorliegenden Arbeit zu übernehmen. Mich durch die Untiefen einer solchen Thematik lotsend, hatte er stets ein offenes Ohr für motivierende und gleichfalls kritisch-konstruktive Gespräche und bot dort, wo Rückschläge den Erfolg der Studie bedrohten, seine Hilfe an. Für die sorgfältige Durchsicht, den Korrekturen und die Teilhabe an seinem gewaltigen Wissensschatz über MicroRNAs möchte ich ihm ganz besonders danken.

Danken möchte ich auch dem wunderbaren Team der Arbeitsgruppe „Pankreas“ am Universitätsklinikum Münster. Herrn Dr. med. Wolf Arif Mardin danke ich für die unermüdliche Unterstützung, insbesondere für die gute Einarbeitung in LCM- und PCR-Technik sowie für die zahlreichen Kontakte, die er herstellte und auf diesen Weg zum Erfolg dieser Studie entschieden beitrug. Ich danke Herrn Dr. med. Sameer Dhayat für die unzähligen Anregungen und neuen Impulsen, die er dieser Untersuchung beisteuerte sowie für die Einblicke, die er mir in seine Analysen gewährte, wodurch mein Verständnis über MicroRNAs deutlich erweitert wurde. Großen Dank möchte ich Frau Frauke Spiecker aussprechen, die mir mit Rat und Tat bei der praktischen Durchführung

der Versuche zur Seite stand. Ferner möchte ich allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der chirurgischen Forschung des Universitätsklinikums Münster danken, die an der praktischen Umsetzung dieser Studie beteiligt waren.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich dem Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Münster für die Bereitstellung der FFPE-Präparate. Im Besonderen möchte ich hier Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Tilmann Spieker danken, der sich die Zeit nahm, mit mir jedes einzelne Präparat histopathologisch nachzuevaluieren und für die Mikrodissektion geeignete Areale ausfindig zu machen. Ebenso möchte ich ihm für die zahlreichen konstruktiven Ratschläge, die maßgeblich zur Realisierung der einzelnen Analysen beitrugen, ausdrücklich danken.

Ich danke dem Team der „Integrierten Funktionellen Genomik“ (IFG) des IZKF Münster für die Bereitstellung der PALM® MicroBeam-Arbeitsstation und des BioRad® CFX384 Real-Time PCR Detection System. Hervorheben möchte ich hierbei die Unterstützung, die ich durch Frau Kirsten Ewering und Herrn Dr. rer. nat. Jochen Seggewiß erfahren habe.

Herrn Professor Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Norbert Senninger möchte ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit an seiner Klinik durchzuführen sowie auch über diese im Rahmen der 16. Chirurgischen Forschungstage in Regensburg zu referieren, ausdrücklich danken.

Für die Koordination der onkologischen Forschung, den unzähligen Anregungen und den wertvollen Beiträgen zur Problemlösung danke ich Herrn Prof. Dr. med. Jörg Haier.

Ich danke all meinen Kolleginnen und Kollegen am Evangelischen Krankenhaus Bielefeld für die Rücksichtnahme und Motivation während des Verfassens dieser Dissertation. Ebenso möchte ich all meinen Freunden für die Geduld danken, die sie für

den gesamten Zeitraum aufbringen mussten und mir gleichsam immer ihren Rückhalt versicherten.

9 Curriculum vitae

10 Quellenverzeichnis

1. (2012) DIANA Lab - DNA Intelligent Analysis. Alexander Fleming - Biomedical Sciences Research Center
2. (2012) miRBase: the microRNA database. Faculty of Life Science, University of Manchester
3. (2013) miRTarBase: the experimentally validated microRNA-target interactions database. Department of Biological Science and Technology, Institute of Bioinformatics and Systems Biology, National Chiao Tung University, Hsinchu, Taiwan
4. Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC, Brambs HJ, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr JM, Lutz MP, Micke O, Neuhaus H, Neuhaus P, Oettle H, Schlag PM, Schmid R, Schmiegel W, Schlottmann K, Werner J, Wiedenmann B, Kopp I (2007) [S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007]. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 45:487-523
5. Adsay NV (2008) Cystic neoplasia of the pancreas: pathology and biology. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 12:401-404
6. Aichler M, Seiler C, Tost M, Siveke J, Mazur PK, Da Silva-Buttkus P, Bartsch DK, Langer P, Chiblak S, Durr A, Hofler H, Kloppel G, Muller-Decker K, Brielmeier M, Esposito I (2012) Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *The Journal of pathology* 226:723-734
7. Ali S, Ahmad A, Banerjee S, Padhye S, Dominiak K, Schaffert JM, Wang Z, Philip PA, Sarkar FH (2010) Gemcitabine sensitivity can be induced in pancreatic cancer cells through modulation of miR-200 and miR-21 expression by curcumin or its analogue CDF. *Cancer research* 70:3606-3617
8. Ali S, Saleh H, Sethi S, Sarkar FH, Philip PA (2012) MicroRNA profiling of diagnostic needle aspirates from patients with pancreatic cancer. *British journal of cancer*
9. Alsfasser G, Kittner J, Eisold S, Klar E (2012) Volume-outcome relationship in pancreatic surgery: the situation in Germany. *Surgery* 152:S50-55
10. Altman DG, Bland JM (1995) Absence of evidence is not evidence of absence. *BMJ (Clinical research ed)* 311:485
11. Ansari D, Chen BC, Dong L, Zhou MT, Andersson R (2012) Pancreatic cancer: translational research aspects and clinical implications. *World journal of gastroenterology : WJG* 18:1417-1424
12. Are C, Dhir M, Ravipati L (2011) History of pancreaticoduodenectomy: early misconceptions, initial milestones and the pioneers. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 13:377-384
13. Bachmann K, Mann O, Izbicki JR (2012) Surgery in chronic pancreatitis. *Il Giornale di chirurgia* 33:5-9
14. Bai XF, Ni XG, Zhao P, Liu SM, Wang HX, Guo B, Zhou LP, Liu F, Zhang JS, Wang K, Xie YQ, Shao YF, Zhao XH (2004) Overexpression of annexin 1 in

- pancreatic cancer and its clinical significance. *World journal of gastroenterology* : WJG 10:1466-1470
15. Ballehaninna UK, Chamberlain RS (2012) The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *Journal of gastrointestinal oncology* 3:105-119
 16. Bao B, Ali S, Kong D, Sarkar SH, Wang Z, Banerjee S, Aboukameel A, Padhye S, Philip PA, Sarkar FH (2011) Anti-tumor activity of a novel compound-CDF is mediated by regulating miR-21, miR-200, and PTEN in pancreatic cancer. *PloS one* 6:e17850
 17. Bao B, Wang Z, Li Y, Kong D, Ali S, Banerjee S, Ahmad A, Sarkar FH (2011) The complexities of obesity and diabetes with the development and progression of pancreatic cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1815:135-146
 18. Bao B, Ali S, Ahmad A, Azmi AS, Li Y, Banerjee S, Kong D, Sethi S, Aboukameel A, Padhye SB, Sarkar FH (2012) Hypoxia-Induced Aggressiveness of Pancreatic Cancer Cells Is Due to Increased Expression of VEGF, IL-6 and miR-21, Which Can Be Attenuated by CDF Treatment. *PloS one* 7:e50165
 19. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297
 20. Becker A, Reith A, Napiwotzki J, Kadenbach B (1996) A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. *Analytical biochemistry* 237:204-207
 21. Benes V, Castoldi M (2010) Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods (San Diego, Calif)* 50:244-249
 22. Bhat K, Wang F, Ma Q, Li Q, Mallik S, Hsieh TC, Wu E (2012) Advances in biomarker research for pancreatic cancer. *Current pharmaceutical design* 18:2439-2451
 23. Bhatti I, Lee A, James V, Hall RI, Lund JN, Tufarelli C, Lobo DN, Larvin M (2011) Knockdown of microRNA-21 inhibits proliferation and increases cell death by targeting programmed cell death 4 (PDCD4) in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 15:199-208
 24. Billeter AT, Druen D, Kanaan ZM, Polk HC, Jr. (2012) MicroRNAs: new helpers for surgeons? *Surgery* 151:1-5
 25. Blenkiron C, Miska EA (2007) miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Human molecular genetics* 16 Spec No 1:R106-113
 26. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM (2007) MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 297:1901-1908
 27. Blum F (1893) Der Formaldehyd als Härtungsmittel. *Z Wiss Mikrosk* 14:314-315
 28. Böcker W, Denk H, Heitz PU (2004) *Pathologie*, 3th edn. Elsevier / Urban & Fischer-Verlag, München
 29. Bohmann K, Hennig G, Rogel U, Poremba C, Mueller BM, Fritz P, Stoerkel S, Schaefer KL (2009) RNA extraction from archival formalin-fixed paraffin-

- embedded tissue: a comparison of manual, semiautomated, and fully automated purification methods. *Clinical chemistry* 55:1719-1727
30. Brauner E, Lachter J, Ben-Ishay O, Vlodavsky E, Kluger Y (2012) Autoimmune pancreatitis misdiagnosed as a tumor of the head of the pancreas. *World journal of gastrointestinal surgery* 4:185-189
 31. Brentnall TA, Chen R, Lee JG, Kimmey MB, Bronner MP, Haggitt RC, Kowdley KV, Hecker LM, Byrd DR (1995) Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. *Cancer research* 55:4264-4267
 32. Broderick JA, Zamore PD (2011) MicroRNA therapeutics. *Gene therapy* 18:1104-1110
 33. Bundesamt S (2012) Pressemitteilung Nr. 425: Todesfälle 2011 leicht rückläufig – häufigste Todesursache Herz-/Kreislaufkrankungen. Statistisches Bundesamt, Pressestelle
 34. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T (2008) A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO reports* 9:582-589
 35. Burton PR, Gurrin LC, Campbell MJ (1998) Clinical significance not statistical significance: a simple Bayesian alternative to p values. *Journal of epidemiology and community health* 52:318-323
 36. Butturini G, Stocken DD, Wenthe MN, Jeekel H, Klinkenbijnl JH, Bakkevold KE, Takada T, Amano H, Dervenis C, Bassi C, Buchler MW, Neoptolemos JP (2008) Influence of resection margins and treatment on survival in patients with pancreatic cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 143:75-83; discussion 83
 37. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine* 348:1625-1638
 38. Caponi S, Funel N, Frampton AE, Mosca F, Santarpia L, Van der Velde AG, Jiao LR, De Lio N, Falcone A, Kazemier G, Mejer GA, Verheul HM, Vasile E, Peters GJ, Boggi U, Giovannetti E (2012) The good, the bad and the ugly: a tale of miR-101, miR-21 and miR-155 in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*
 39. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED (2006) Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer research* 66:11271-11278
 40. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer research* 65:6029-6033
 41. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research* 33:e179
 42. Chen C, Zhang Y, Zhang L, Weakley SM, Yao Q (2011) MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. *Journal of cellular and molecular medicine* 15:14-23

43. Croce CM (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews Genetics* 10:704-714
44. Cubilla AL, Fitzgerald PJ (1975) Morphological patterns of primary nonendocrine human pancreas carcinoma. *Cancer research* 35:2234-2248
45. Cubilla AL, Fitzgerald PJ (1976) Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. *Cancer research* 36:2690-2698
46. De Martino I, Visone R, Fedele M, Petrocca F, Palmieri D, Martinez Hoyos J, Forzati F, Croce CM, Fusco A (2009) Regulation of microRNA expression by HMGA1 proteins. *Oncogene* 28:1432-1442
47. Delidow BC, Peluso JJ, White BA (1989) Quantitative measurement of mRNAs by polymerase chain reaction. *Gene analysis techniques* 6:120-124
48. Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M (2008) MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 12:2171-2176
49. Dong J, Zhao YP, Zhou L, Zhang TP, Chen G (2011) Bcl-2 upregulation induced by miR-21 via a direct interaction is associated with apoptosis and chemoresistance in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. *Archives of medical research* 42:8-14
50. du Rieu MC, Torrisani J, Selves J, Al Saati T, Souque A, Dufresne M, Tsongalis GJ, Suriawinata AA, Carrere N, Buscail L, Cordelier P (2010) MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clinical chemistry* 56:603-612
51. Du Y, Xu Y, Ding L, Yao H, Yu H, Zhou T, Si J (2009) Down-regulation of miR-141 in gastric cancer and its involvement in cell growth. *Journal of gastroenterology* 44:556-561
52. Dutta SK, Girotra M, Singla M, Dutta A, Otis Stephen F, Nair PP, Merchant NB (2012) Serum HSP70: a novel biomarker for early detection of pancreatic cancer. *Pancreas* 41:530-534
53. Dykxhoorn DM, Wu Y, Xie H, Yu F, Lal A, Petrocca F, Martinvalet D, Song E, Lim B, Lieberman J (2009) miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases. *PLoS one* 4:e7181
54. Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE (2005) Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:3627-3632
55. Elton TS, Selemon H, Elton SM, Parinandi NL (2012) Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene*
56. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA (1996) Laser capture microdissection. *Science (New York, NY)* 274:998-1001
57. Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews Cancer* 6:259-269
58. Fanghänel J, Pera F, Anderhuber F, Nitsch R (2003) *Waldeyer - Anatomie des Menschen*, 17th edn. Walter de Gruyter-Verlag, Berlin
59. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E (2009) miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et biophysica acta* 1792:497-505

60. Fayers PM, Machin D (1995) Sample size: how many patients are necessary? *British journal of cancer* 72:1-9
61. Ferrone CR, Pieretti-Vanmarcke R, Bloom JP, Zheng H, Szymonifka J, Wargo JA, Thayer SP, Lauwers GY, Deshpande V, Mino-Kenudson M, Fernandez-del Castillo C, Lillemoe KD, Warshaw AL (2012) Pancreatic ductal adenocarcinoma: long-term survival does not equal cure. *Surgery* 152:S43-49
62. Finks JF, Osborne NH, Birkmeyer JD (2011) Trends in hospital volume and operative mortality for high-risk surgery. *The New England journal of medicine* 364:2128-2137
63. Frankel A (2012) Formalin fixation in the '-omics' era: a primer for the surgeon-scientist. *ANZ journal of surgery* 82:395-402
64. G. L, P.E. P, P.C. H (2006) *Biochemie und Pathobiochemie*, 8th edn. Springer Verlag, Berlin
65. Gee GV, Koestler DC, Christensen BC, Sugarbaker DJ, Ugolini D, Ivaldi GP, Resnick MB, Houseman EA, Kelsey KT, Marsit CJ (2010) Downregulated microRNAs in the differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 127:2859-2869
66. Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, Patil M, Sheldon H, Betts G, Homer J, West C, Ragoussis J, Harris AL (2011) The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *British journal of cancer* 104:1168-1177
67. Ghadirian P, Lynch HT, Krewski D (2003) Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Cancer detection and prevention* 27:87-93
68. Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, Del Chiaro M, Erozenski LA, Vasile E, Leon LG, Pollina LE, Groen A, Falcone A, Danesi R, Campani D, Verheul HM, Boggi U (2010) MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer research* 70:4528-4538
69. Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Pebusque MJ, Dusetti NJ (2007) Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:16170-16175
70. Glass JM, Gilbert JM (1996) Splenectomy in a general hospital. *Journal of the Royal Society of Medicine* 89:199-201
71. Goh KL, Yoon BK (2012) Early detection of pancreatic cancer: a possibility in some cases but not a reality in most. *Journal of digestive diseases* 13:389-392
72. Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, Foley JF, Maronpot RR (1999) Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Molecular carcinogenesis* 25:86-91
73. Goodman S (2008) A dirty dozen: twelve p-value misconceptions. *Seminars in hematology* 45:135-140
74. Grapin-Botton A (2005) Ductal cells of the pancreas. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37:504-510
75. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate

- epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology* 10:593-601
76. Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ (2008) MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7:3112-3118
 77. Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschlager C, Wurl P, Taubert H (2010) Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *International journal of cancer Journal international du cancer* 126:73-80
 78. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research* 34:D140-144
 79. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research* 36:D154-158
 80. Griffiths-Jones S, Hui JH, Marco A, Ronshaugen M (2011) MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO reports* 12:172-177
 81. Guan Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Hata N, Shono T, Suzuki SO, Araki Y, Kuga D, Nakamizo A, Amano T, Ma X, Hayashi K, Sasaki T (2010) MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16:4289-4297
 82. Guay C, Roggli E, Nesca V, Jacovetti C, Regazzi R (2011) Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 157:253-264
 83. Habbe N, Koorstra JB, Mendell JT, Offerhaus GJ, Ryu JK, Feldmann G, Mullendore ME, Goggins MG, Hong SM, Maitra A (2009) MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer biology & therapy* 8:340-346
 84. Hall JS, Taylor J, Valentine HR, Irlam JJ, Eustace A, Hoskin PJ, Miller CJ, West CM (2012) Enhanced stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation. *British journal of cancer* 107:684-694
 85. He J, Edil BH, Cameron JL, Schulick RD, Hruban RH, Herman JM, Zheng L, Iacobuzio-Donahue C, Ahuja N, Pawlik TM, Wolfgang CL (2012) Young Patients Undergoing Resection of Pancreatic Cancer Fare Better than their Older Counterparts. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*
 86. Heinemann V, Haas M, Boeck S (2012) Systemic treatment of advanced pancreatic cancer. *Cancer treatment reviews* 38:843-853
 87. Heinmoller E, Bockholt A, Werther M, Ziemer M, Muller A, Ghadimi BM, Ruschoff J (2003) Laser microdissection of small tissue samples--application to chronic pancreatitis tissues. *Pathology, research and practice* 199:363-371
 88. Hernandez-Munoz I, Skoudy A, Real FX, Navarro P (2008) Pancreatic ductal adenocarcinoma: cellular origin, signaling pathways and stroma contribution. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]* 8:462-469

89. Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, Rinzel SM, Poore GA, Todd GC, Grindey GB (1990) Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer research* 50:4417-4422
90. Heyn H, Schreek S, Buurman R, Focken T, Schlegelberger B, Beger C (2012) MicroRNA miR-548d is a superior regulator in pancreatic cancer. *Pancreas* 41:218-221
91. Hoffman AE, Zheng T, Yi C, Leaderer D, Weidhaas J, Slack F, Zhang Y, Paranjape T, Zhu Y (2009) microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer research* 69:5970-5977
92. Hoffmeister A, Mayerle J, Beglinger C, Buchler MW, Bufler P, Dathe K, Folsch UR, Friess H, Izbicki J, Kahl S, Klar E, Keller J, Knoefel WT, Layer P, Loehr M, Meier R, Riemann JF, Runzi M, Schmid RM, Schreyer A, Tribl B, Werner J, Witt H, Mossner J, Lerch MM (2012) [S3-Consensus guidelines on definition, etiology, diagnosis and medical, endoscopic and surgical management of chronic pancreatitis German Society of Digestive and Metabolic Diseases (DGVS)]. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 50:1176-1224
93. Howe EN, Cochrane DR, Richer JK (2012) The miR-200 and miR-221/222 microRNA families: opposing effects on epithelial identity. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 17:65-77
94. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE (2000) Progression model for pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6:2969-2972
95. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Kloppel G, Longnecker DS, Luttges J, Offerhaus GJ (2001) Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *The American journal of surgical pathology* 25:579-586
96. Hsu SD, Lin FM, Wu WY, Liang C, Huang WC, Chan WL, Tsai WT, Chen GZ, Lee CJ, Chiu CM, Chien CH, Wu MC, Huang CY, Tsou AP, Huang HD (2011) miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic acids research* 39:D163-169
97. Huggett MT, Pereira SP (2011) Diagnosing and managing pancreatic cancer. *The Practitioner* 255:21-25, 22-23
98. Hui A, How C, Ito E, Liu FF (2011) Micro-RNAs as diagnostic or prognostic markers in human epithelial malignancies. *BMC cancer* 11:500
99. Husmann G, KP, Katalinic A., et al. (2010) Cancer in Germany 2005/2006 - Incidence and Trends. *Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut (RKI), Berlin*, pp 40 - 42
100. Hwang JH, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM, Leon LG, Kim YT, Funel N, Park JK, Kim MA, Kang GH, Kim SW, Del Chiaro M, Peters GJ, Giaccone G (2010) Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PloS one* 5:e10630
101. Jamieson NB, Morran DC, Morton JP, Ali A, Dickson EJ, Carter CR, Sansom OJ, Evans TR, McKay CJ, Oien KA (2012) MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in

- patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18:534-545
102. Janot MS, Kersting S, Belyaev O, Matuschek A, Chromik AM, Suelberg D, Uhl W, Tannapfel A, Bergmann U (2012) Can the new RCP R0/R1 classification predict the clinical outcome in ductal adenocarcinoma of the pancreatic head? *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* 397:917-925
 103. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010) Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians* 60:277-300
 104. Jerome T, Laurie P, Louis B, Pierre C (2007) Enjoy the Silence: The Story of let-7 MicroRNA and Cancer. *Current genomics* 8:229-233
 105. Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD (2005) Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic acids research* 33:5394-5403
 106. Jung M, Schaefer A, Steiner I, Kempkensteffen C, Stephan C, Erbersdobler A, Jung K (2010) Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clinical chemistry* 56:998-1006
 107. Jury RP, Thibodeau BJ, Fortier LE, Geddes TJ, Ahmed S, Pruetz BL, Farinola MA, Wilson GD (2012) Gene expression changes associated with the progression of intraductal papillary mucinous neoplasms. *Pancreas* 41:611-618
 108. Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119:1420-1428
 109. Kent OA, Mullendore M, Wentzel EA, Lopez-Romero P, Tan AC, Alvarez H, West K, Ochs MF, Hidalgo M, Arking DE, Maitra A, Mendell JT (2009) A resource for analysis of microRNA expression and function in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer biology & therapy* 8:2013-2024
 110. Kent TS, Sachs TE, Sanchez N, Vollmer CM, Jr., Callery MP (2011) Conditional survival in pancreatic cancer: better than expected. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 13:876-880
 111. Khoja L, Backen A, Sloane R, Menasce L, Ryder D, Krebs M, Board R, Clack G, Hughes A, Blackhall F, Valle JW, Dive C (2012) A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker. *British journal of cancer* 106:508-516
 112. Kisiel JB, Yab TC, Taylor WR, Chari ST, Petersen GM, Mahoney DW, Ahlquist DA (2012) Stool DNA testing for the detection of pancreatic cancer: assessment of methylation marker candidates. *Cancer* 118:2623-2631
 113. Klautke G, Brunner TB (2008) Radiotherapy in pancreatic cancer. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]* 184:557-564
 114. Klymkowsky MW, Savagner P (2009) Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *The American journal of pathology* 174:1588-1593
 115. Kong X, Du Y, Wang G, Gao J, Gong Y, Li L, Zhang Z, Zhu J, Jing Q, Qin Y, Li Z (2011) Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: miR-196a could be a potential marker for poor prognosis. *Digestive diseases and sciences* 56:602-609

116. Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M (2012) microRNAs in cancer management. *The lancet oncology* 13:e249-258
117. Korfhage C, Schröder-Stumberger I, Fisch E, Löffert D, Kang J (2003) Microarray experiments using very small amounts of RNA. *Qiagen News*.
118. Korpala M, Lee ES, Hu G, Kang Y (2008) The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *The Journal of biological chemistry* 283:14910-14914
119. Korpala M, Ell BJ, Buffa FM, Ibrahim T, Blanco MA, Celia-Terrassa T, Mercatali L, Khan Z, Goodarzi H, Hua Y, Wei Y, Hu G, Garcia BA, Ragoussis J, Amadori D, Harris AL, Kang Y (2011) Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nature medicine* 17:1101-1108
120. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research* 39:D152-157
121. Krech RL, Walsh D (1991) Symptoms of pancreatic cancer. *Journal of pain and symptom management* 6:360-367
122. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438:685-689
123. LaConti JJ, Shivapurkar N, Preet A, Deslattes Mays A, Peran I, Kim SE, Marshall JL, Riegel AT, Wellstein A (2011) Tissue and serum microRNAs in the Kras(G12D) transgenic animal model and in patients with pancreatic cancer. *PloS one* 6:e20687
124. Landgraf A, Reckmann B, Pingoud A (1991) Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye. *Analytical biochemistry* 193:231-235
125. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129:1401-1414
126. Lankisch PG, Assmus C, Maisonneuve P, Lowenfels AB (2002) Epidemiology of pancreatic diseases in Luneburg County. A study in a defined german population. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]* 2:469-477
127. Laurila EM, Sandstrom S, Rantanen LM, Autio R, Kallioniemi A (2012) Both inhibition and enhanced expression of miR-31 lead to reduced migration and invasion of pancreatic cancer cells. *Genes, chromosomes & cancer* 51:557-568
128. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology* 141:672-675

129. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD (2007) Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 120:1046-1054
130. Lee KH, Lotterman C, Karikari C, Omura N, Feldmann G, Habbe N, Goggins MG, Mendell JT, Maitra A (2009) Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al] 9:293-301
131. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23:4051-4060
132. Levenick JM, Sutton JE, Smith KD, Gordon SR, Suriawinata A, Gardner TB (2012) Pancreaticoduodenectomy for the treatment of groove pancreatitis. *Digestive diseases and sciences* 57:1954-1958
133. Li A, Omura N, Hong SM, Vincent A, Walter K, Griffith M, Borges M, Goggins M (2010) Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels. *Cancer research* 70:5226-5237
134. Li CL, Nie H, Wang M, Su LP, Li JF, Yu YY, Yan M, Qu QL, Zhu ZG, Liu BY (2012) microRNA-155 is downregulated in gastric cancer cells and involved in cell metastasis. *Oncology reports* 27:1960-1966
135. Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O (2007) Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC biotechnology* 7:36
136. Li W, Yuan Y, Huang L, Qiao M, Zhang Y (2012) Metformin alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Diabetes research and clinical practice* 96:187-195
137. Li Y, VandenBoom TG, 2nd, Kong D, Wang Z, Ali S, Philip PA, Sarkar FH (2009) Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer research* 69:6704-6712
138. Liebermann-Meffert D, Stein HJ, White H (2000) II. Vinzenz Czerny (1842-1915): grand seigneur of oncologic surgery--life, influence, and work of the Second Congress President of the ISS/SIC. *International Society of Surgery/Societe Internationale de Chirurgie. World journal of surgery* 24:1589-1598
139. Lind EF, Elford AR, Ohashi PS (2013) Micro-RNA 155 Is Required for Optimal CD8+ T Cell Responses to Acute Viral and Intracellular Bacterial Challenges. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 190:1210-1216
140. Link A, Becker V, Goel A, Wex T, Malfertheiner P (2012) Feasibility of fecal microRNAs as novel biomarkers for pancreatic cancer. *PloS one* 7:e42933
141. Liu A, Tetzlaff MT, Vanbelle P, Elder D, Feldman M, Tobias JW, Sepulveda AR, Xu X (2009) MicroRNA expression profiling outperforms mRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *International journal of clinical and experimental pathology* 2:519-527

142. Liu CJ, Tsai MM, Tu HF, Lui MT, Cheng HW, Lin SC (2012) miR-196a Overexpression and miR-196a2 Gene Polymorphism Are Prognostic Predictors of Oral Carcinomas. *Annals of surgical oncology*
143. Liu J, Gao J, Du Y, Li Z, Ren Y, Gu J, Wang X, Gong Y, Wang W, Kong X (2012) Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 131:683-691
144. Liu R, Chen X, Du Y, Yao W, Shen L, Wang C, Hu Z, Zhuang R, Ning G, Zhang C, Yuan Y, Li Z, Zen K, Ba Y, Zhang CY (2012) Serum microRNA expression profile as a biomarker in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Clinical chemistry* 58:610-618
145. Liu XH, Lu KH, Wang KM, Sun M, Zhang EB, Yang JS, Yin DD, Liu ZL, Zhou J, Liu ZJ, De W, Wang ZX (2012) MicroRNA-196a promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion through targeting HOXA5. *BMC cancer* 12:348
146. Low G, Panu A, Millo N, Leen E (2011) Multimodality imaging of neoplastic and nonneoplastic solid lesions of the pancreas. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 31:993-1015
147. Lowenfels A, Maisonneuve P (2005) Epidemiology of Chronic Pancreatitis. In: Forsmark C (ed) *Pancreatitis and Its Complications*. Humana Press, pp 137-147
148. Lowenfels AB, Maisonneuve P (2005) Risk factors for pancreatic cancer. *Journal of cellular biochemistry* 95:649-656
149. Lowenfels AB, Maisonneuve P (2006) Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 20:197-209
150. Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A (2007) Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer research* 67:6031-6043
151. Luo X, Tsai LM, Shen N, Yu D (2010) Evidence for microRNA-mediated regulation in rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases* 69 Suppl 1:i30-36
152. Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, Barkoh BA, Chen SS, Ensor J, Maru DM, Broaddus RR, Rashid A, Albarracin CT (2008) MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene* 27:6667-6678
153. Lv L, Huang F, Mao H, Li M, Li X, Yang M, Yu X (2013) MicroRNA-21 is overexpressed in renal cell carcinoma. *The International journal of biological markers* 28:e201-207
154. Maitra A, Kern SE, Hruban RH (2006) Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 20:211-226
155. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K, Vergoulis T, Koziris N, Sellis T, Tsanakas P, Hatzigeorgiou AG (2009) DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic acids research* 37:W273-276
156. McPhee JT, Hill JS, Whalen GF, Zayaruzny M, Litwin DE, Sullivan ME, Anderson FA, Tseng JF (2007) Perioperative mortality for pancreatotomy: a national perspective. *Annals of surgery* 246:246-253

157. Mees ST, Mardin WA, Wendel C, Baeumer N, Willscher E, Senninger N, Schleicher C, Colombo-Benkmann M, Haier J (2010) EP300--a miRNA-regulated metastasis suppressor gene in ductal adenocarcinomas of the pancreas. *International journal of cancer Journal international du cancer* 126:114-124
158. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T (2007) MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133:647-658
159. Menon KV, Gomez D, Smith AM, Anthony A, Verbeke CS (2009) Impact of margin status on survival following pancreatoduodenectomy for cancer: the Leeds Pathology Protocol (LEEPP). *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 11:18-24
160. Michaud DS, Liu S, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS (2002) Dietary sugar, glycemic load, and pancreatic cancer risk in a prospective study. *Journal of the National Cancer Institute* 94:1293-1300
161. Miura F, Takada T, Amano H, Yoshida M, Furui S, Takeshita K (2006) Diagnosis of pancreatic cancer. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 8:337-342
162. Mueller DW, Bosserhoff AK (2011) MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOX-C8 expression. *International journal of cancer Journal international du cancer* 129:1064-1074
163. Muller-Nordhorn J, Bruggenjurgen B, Bohmig M, Selim D, Reich A, Noesselt L, Roll S, Wiedenmann B, Willich SN (2005) Direct and indirect costs in a prospective cohort of patients with pancreatic cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 22:405-415
164. Munding JB, Adai AT, Maghnouj A, Urbanik A, Zollner H, Liffers ST, Chromik AM, Uhl W, Szafranska-Schwarzbach AE, Tannapfel A, Hahn SA (2012) Global microRNA expression profiling of microdissected tissues identifies miR-135b as a novel biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 131:E86-95
165. Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, Hruban RH, Kern SE (2002) Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer research* 62:3789-3793
166. Naidoo K, Jones R, Dmitrovic B, Wijesuriya N, Kocher H, Hart IR, Crnogorac-Jurcevic T (2012) Proteome of formalin-fixed paraffin-embedded pancreatic ductal adenocarcinoma and lymph node metastases. *The Journal of pathology* 226:756-763
167. Nakahara O, Takamori H, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Tanaka H, Chikamoto A, Horino K, Beppu T, Kanemitsu K, Honda Y, Iyama K, Baba H (2012) Carcinogenesis of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas: Loss of MicroRNA-101 Promotes Overexpression of Histone Methyltransferase EZH2. *Annals of surgical oncology* 19 Suppl 3:565-571
168. Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Kayashima T, Ikenaga N, Sakai H, Lin C, Fujita H, Otsuka T, Aishima S, Nagai E, Oda Y, Tanaka M (2011) MicroRNA-10b is overexpressed in pancreatic cancer, promotes its invasiveness, and correlates with a poor prognosis. *Surgery* 150:916-922

169. Neilsen PM, Noll JE, Mattiske S, Bracken CP, Gregory PA, Schulz RB, Lim SP, Kumar R, Suetani RJ, Goodall GJ, Callen DF (2012) Mutant p53 drives invasion in breast tumors through up-regulation of miR-155. *Oncogene*
170. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Buchler MW (2004) A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* 350:1200-1210
171. Ni XG, Bai XF, Mao YL, Shao YF, Wu JX, Shan Y, Wang CF, Wang J, Tian YT, Liu Q, Xu DK, Zhao P (2005) The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 31:164-169
172. Niederhuber JE, Brennan MF, Menck HR (1995) The National Cancer Data Base report on pancreatic cancer. *Cancer* 76:1671-1677
173. Nielsen BS, Jorgensen S, Fog JU, Sokilde R, Christensen IJ, Hansen U, Brunner N, Baker A, Moller S, Nielsen HJ (2011) High levels of microRNA-21 in the stroma of colorectal cancers predict short disease-free survival in stage II colon cancer patients. *Clinical & experimental metastasis* 28:27-38
174. Nieto J, Grossbard ML, Kozuch P (2008) Metastatic pancreatic cancer 2008: is the glass less empty? *The oncologist* 13:562-576
175. Nightingale SL (1995) From the Food and Drug Administration. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 273:982
176. Nurminen M (1997) Statistical significance--a misconstrued notion in medical research. *Scandinavian journal of work, environment & health* 23:232-235
177. Ohuchida K, Mizumoto K, Lin C, Yamaguchi H, Ohtsuka T, Sato N, Toma H, Nakamura M, Nagai E, Hashizume M, Tanaka M (2012) MicroRNA-10a is overexpressed in human pancreatic cancer and involved in its invasiveness partially via suppression of the HOXA1 gene. *Annals of surgical oncology* 19:2394-2402
178. Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC (2008) The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nature structural & molecular biology* 15:354-363
179. Ono K, Kuwabara Y, Han J (2011) MicroRNAs and cardiovascular diseases. *The FEBS journal* 278:1619-1633
180. Organization WH (2013) Fact Sheet No297 - Cancer. World Health Organization, www.who.int
181. Panarelli NC, Chen YT, Zhou XK, Kitabayashi N, Yantiss RK (2012) MicroRNA expression aids the preoperative diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 41:685-690
182. Papaconstantinou IG, Manta A, Gazouli M, Lyberopoulou A, Lykoudis PM, Polymeneas G, Voros D (2012) Expression of MicroRNAs in Patients With Pancreatic Cancer and Its Prognostic Significance. *Pancreas*
183. Park JK, Lee EJ, Esau C, Schmittgen TD (2009) Antisense inhibition of microRNA-21 or -221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 38:e190-199

184. Park JY, Helm J, Coppola D, Kim D, Malafa M, Kim SJ (2011) MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG* 17:817-827
185. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME (2008) The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & development* 22:894-907
186. Parsa I, Longnecker DS, Scarpelli DG, Pour P, Reddy JK, Lefkowitz M (1985) Ductal metaplasia of human exocrine pancreas and its association with carcinoma. *Cancer research* 45:1285-1290
187. Paterson EL, Kazenwadel J, Bert AG, Khew-Goodall Y, Ruzskiewicz A, Goodall GJ (2013) Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression. *Neoplasia (New York, NY)* 15:180-191
188. Pedrazzoli S, Pasquali C, Guzzinati S, Berselli M, Sperti C (2008) Survival rates and cause of death in 174 patients with chronic pancreatitis. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 12:1930-1937
189. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29:e45
190. Pour PM, Pandey KK, Batra SK (2003) What is the origin of pancreatic adenocarcinoma? *Molecular cancer* 2:13
191. Rachagani S, Kumar S, Batra SK (2010) MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications. *Cancer letters* 292:8-16
192. Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB (2009) Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 6:699-708
193. Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R (2010) Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 24:349-358
194. Rask L, Balslev E, Jorgensen S, Eriksen J, Flyger H, Moller S, Hogdall E, Litman T, Nielsen BS (2011) High expression of miR-21 in tumor stroma correlates with increased cancer cell proliferation in human breast cancer. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 119:663-673
195. Risch HA (2003) Etiology of pancreatic cancer, with a hypothesis concerning the role of N-nitroso compounds and excess gastric acidity. *Journal of the National Cancer Institute* 95:948-960
196. Rooman I, Real FX (2012) Pancreatic ductal adenocarcinoma and acinar cells: a matter of differentiation and development? *Gut* 61:449-458
197. Rose AT, Newman MI, Debelak J, Pinson CW, Morris JA, Jr., Harley DD, Chapman WC (2000) The incidence of splenectomy is decreasing: lessons learned from trauma experience. *The American surgeon* 66:481-486
198. Rubin E. RHM (2008) *Essentials of Rubin's Pathology*, 5th edn. Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia
199. Ryu JK, Hong SM, Karikari CA, Hruban RH, Goggins MG, Maitra A (2010) Aberrant MicroRNA-155 expression is an early event in the multistep progression of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]* 10:66-73

200. Ryu JK, Matthaei H, Dal Molin M, Hong SM, Canto MI, Schulick RD, Wolfgang C, Goggins MG, Hruban RH, Cope L, Maitra A (2011) Elevated microRNA miR-21 levels in pancreatic cyst fluid are predictive of mucinous precursor lesions of ductal adenocarcinoma. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al] 11:343-350
201. Sarkar FH, Banerjee S, Li Y (2007) Pancreatic cancer: pathogenesis, prevention and treatment. *Toxicology and applied pharmacology* 224:326-336
202. Schaefer A, Jung M, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Erbersdobler A, Jung K (2010) Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Experimental & molecular medicine* 42:749-758
203. Schimanski CC, Frerichs K, Rahman F, Berger M, Lang H, Galle PR, Moehler M, Gockel I (2009) High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. *World journal of gastroenterology : WJG* 15:2089-2096
204. Schliekelman MJ, Gibbons DL, Faca VM, Creighton CJ, Rizvi ZH, Zhang Q, Wong CH, Wang H, Ungewiss C, Ahn YH, Shin DH, Kurie JM, Hanash SM (2011) Targets of the tumor suppressor miR-200 in regulation of the epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Cancer research* 71:7670-7682
205. Schmittgen TD, Jiang J, Liu Q, Yang L (2004) A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic acids research* 32:e43
206. Schultz NA, Andersen KK, Roslind A, Willenbrock H, Wojdemann M, Johansen JS (2012) Prognostic MicroRNAs in Cancer Tissue from Patients Operated for Pancreatic Cancer-Five MicroRNAs in a Prognostic Index. *World journal of surgery*
207. Schultz NA, Werner J, Willenbrock H, Roslind A, Giese N, Horn T, Wojdemann M, Johansen JS (2012) MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*
208. Sempere LF, Christensen M, Silahatoglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, Wells W, Kauppinen S, Cole CN (2007) Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer research* 67:11612-11620
209. Shi R, Chiang VL (2005) Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *BioTechniques* 39:519-525
210. Shore S, Raraty MG, Ghaneh P, Neoptolemos JP (2003) Review article: chemotherapy for pancreatic cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 18:1049-1069
211. Siebolts U, Varnholt H, Drebber U, Dienes HP, Wickenhauser C, Odenthal M (2009) Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR. *Journal of clinical pathology* 62:84-88
212. Silverman DT, Dunn JA, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Brown LM, Greenberg RS, Hayes RB, Swanson GM, et al. (1994) Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews. *Journal of the National Cancer Institute* 86:1510-1516
213. Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA (1998) Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends in genetics : TIG* 14:272-276

214. Smith CM, Watson DI, Leong MP, Mayne GC, Michael MZ, Wijnhoven BP, Hussey DJ (2011) miR-200 family expression is downregulated upon neoplastic progression of Barrett's esophagus. *World journal of gastroenterology : WJG* 17:1036-1044
215. Snowdon J, Zhang X, Childs T, Tron VA, Feilotter H (2011) The microRNA-200 family is upregulated in endometrial carcinoma. *PloS one* 6:e22828
216. Sobin LH, Gospodarowicz MK, C. W (2009) *TNM-Classification of Malignant Tumours (uicc - International Union against Cancer)*. Wiley Blackwell, Oxford
217. Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, Ma X, Han S, Zhang Z (2012) Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Digestive diseases and sciences* 57:897-904
218. Soubani O, Ali AS, Logna F, Ali S, Philip PA, Sarkar FH (2012) Re-expression of miR-200 by novel approaches regulates the expression of PTEN and MT1-MMP in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 33:1563-1571
219. Speer AG, Thursfield VJ, Torn-Broers Y, Jefford M (2012) Pancreatic cancer: surgical management and outcomes after 6 years of follow-up. *The Medical journal of Australia* 196:511-515
220. Sperti C, Pasquali C, Piccoli A, Pedrazzoli S (1997) Recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *World journal of surgery* 21:195-200
221. Stanger BZ, Dor Y (2006) Dissecting the cellular origins of pancreatic cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 5:43-46
222. Steele CW, Oien KA, McKay CJ, Jamieson NB (2011) Clinical potential of microRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 40:1165-1171
223. Sun C, Rosendahl AH, Ansari D, Andersson R (2011) Proteome-based biomarkers in pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* 17:4845-4852
224. Sun M, Liu XH, Li JH, Yang JS, Zhang EB, Yin DD, Liu ZL, Zhou J, Ding Y, Li SQ, Wang ZX, Cao XF, De W (2012) MiR-196a is upregulated in gastric cancer and promotes cell proliferation by downregulating p27(kip1). *Molecular cancer therapeutics* 11:842-852
225. Svrcek M, El-Murr N, Wanherdrick K, Dumont S, Beaugier L, Cosnes J, Colombel JF, Tiret E, Flejou JF, Lesuffleur T, Duval A (2013) Overexpression of microRNAs-155 and 21 targeting mismatch repair proteins in inflammatory bowel diseases. *Carcinogenesis*
226. Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnoij A, Labourier E, Hahn SA (2007) MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 26:4442-4452
227. Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, Gordon S, Luttges J, Munding JB, Barth RJ, Jr., Gutmann EJ, Suriawinata AA, Marc Pipas J, Tannapfel A, Korc M, Hahn SA, Labourier E, Tsongalis GJ (2008) Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clinical chemistry* 54:1716-1724
228. Takadate T, Onogawa T, Fukuda T, Motoi F, Suzuki T, Fujii K, Kihara M, Mikami S, Bando Y, Maeda S, Ishida K, Minowa T, Hanagata N, Ohtsuka H, Katayose Y, Egawa S, Nishimura T, Unno M (2012) Novel prognostic protein markers of resectable pancreatic cancer identified by coupled shotgun and

- targeted proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *International journal of cancer Journal international du cancer*
229. Tavano F, di Mola FF, Piepoli A, Panza A, Copetti M, Burbaci FP, Latiano T, Pellegrini F, Maiello E, Andriulli A, di Sebastiano P (2012) Changes in miR-143 and miR-21 Expression and Clinicopathological Correlations in Pancreatic Cancers. *Pancreas* 41:1280-1284
 230. Tempero MA, Uchida E, Takasaki H, Burnett DA, Steplewski Z, Pour PM (1987) Relationship of carbohydrate antigen 19-9 and Lewis antigens in pancreatic cancer. *Cancer research* 47:5501-5503
 231. Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews Cancer* 2:442-454
 232. Tili E, Croce CM, Michaille JJ (2009) miR-155: on the crosstalk between inflammation and cancer. *International reviews of immunology* 28:264-284
 233. Tingstedt B, Andersson E, Flink A, Bolin K, Lindgren B, Andersson R (2011) Pancreatic cancer, healthcare cost, and loss of productivity: a register-based approach. *World journal of surgery* 35:2298-2305
 234. Torrisani J, Bournet B, du Rieu MC, Bouisson M, Souque A, Escourrou J, Buscail L, Cordelier P (2009) let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Human gene therapy* 20:831-844
 235. Triolo VA (1969) The institution for investigating the nature and cure of cancer. A study of four excerpts. *Medical history* 13:11-28
 236. Tummala P, Junaidi O, Agarwal B (2011) Imaging of pancreatic cancer: An overview. *Journal of gastrointestinal oncology* 2:168-174
 237. Ueda S, Fukamachi K, Matsuoka Y, Takasuka N, Takeshita F, Naito A, Iigo M, Alexander DB, Moore MA, Saito I, Ochiya T, Tsuda H (2006) Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human *Hras* oncogene in rat pancreas. *Carcinogenesis* 27:2497-2510
 238. Ulrich AB, Schmied BM, Standop J, Schneider MB, Pour PM (2002) Pancreatic cell lines: a review. *Pancreas* 24:111-120
 239. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* 9:654-659
 240. van Gulik TM, Moojen TM, van Geenen R, Rauws EA, Obertop H, Gouma DJ (1999) Differential diagnosis of focal pancreatitis and pancreatic cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 10 Suppl 4:85-88
 241. Verbeke CS, Menon KV (2009) Redefining resection margin status in pancreatic cancer. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 11:282-289
 242. Vogel A, Horneffer V, Lorenz K, Linz N, Huttmann G, Gebert A (2007) Principles of laser microdissection and catapulting of histologic specimens and live cells. *Methods in cell biology* 82:153-205
 243. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:2257-2261

244. Wan G, Mathur R, Hu X, Zhang X, Lu X (2011) miRNA response to DNA damage. *Trends in biochemical sciences* 36:478-484
245. Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzese JL, Frazier ML, Killary AM, Sen S (2009) MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)* 2:807-813
246. Wang X, Zhao J, Huang J, Tang H, Yu S, Chen Y (2012) The regulatory roles of miRNA and methylation on oncogene and tumor suppressor gene expression in pancreatic cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 425:51-57
247. Weiderpass E, Partanen T, Kaaks R, Vainio H, Porta M, Kauppinen T, Ojajarvi A, Boffetta P, Malats N (1998) Occurrence, trends and environment etiology of pancreatic cancer. *Scandinavian journal of work, environment & health* 24:165-174
248. Witkowski ER, Smith JK, Tseng JF (2012) Outcomes following resection of pancreatic cancer. *Journal of surgical oncology*
249. Wolpin BM, Chan AT, Hartge P, Chanock SJ, Kraft P, Hunter DJ, Giovannucci EL, Fuchs CS (2009) ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 101:424-431
250. Wotschovsky Z, Meyer HA, Jung M, Fendler A, Wagner I, Stephan C, Busch J, Erbersdobler A, Disch AC, Mollenkopf HJ, Jung K (2011) Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases. *Analytical biochemistry* 417:233-241
251. Wray CJ, Ahmad SA, Matthews JB, Lowy AM (2005) Surgery for pancreatic cancer: recent controversies and current practice. *Gastroenterology* 128:1626-1641
252. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J (2007) Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA (New York, NY)* 13:1668-1674
253. Xiong HQ, Abbruzzese JL (2002) Epidermal growth factor receptor-targeted therapy for pancreatic cancer. *Seminars in oncology* 29:31-37
254. Yang JS, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, Chen KC, Lai EC (2011) Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA (New York, NY)* 17:312-326
255. Yao Q, Cao S, Li C, Mengesha A, Kong B, Wei M (2011) Micro-RNA-21 regulates TGF-beta-induced myofibroblast differentiation by targeting PDCD4 in tumor-stroma interaction. *International journal of cancer Journal international du cancer* 128:1783-1792
256. Yekta S, Shih IH, Bartel DP (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science (New York, NY)* 304:594-596
257. Yeung ML, Jeang KT (2011) MicroRNAs and cancer therapeutics. *Pharmaceutical research* 28:3043-3049
258. Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Sato N, Kayashima T, Fujita H, Nakata K, Tanaka M (2010) MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation. *Molecular cancer* 9:169

259. Yu J, Li A, Hong SM, Hruban RH, Goggins M (2012) MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18:981-992
260. Zhang L, Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C (2011) Roles and mechanisms of microRNAs in pancreatic cancer. *World journal of surgery* 35:1725-1731
261. Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, Yao Q, Chen C (2009) Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World journal of surgery* 33:698-709
262. Zheng Z, Xiang G, Tan C, Zhang H, Liu B, Gong J, Mai G, Liu X (2012) Pancreaticoduodenectomy versus duodenum-preserving pancreatic head resection for the treatment of chronic pancreatitis. *Pancreas* 41:147-152
263. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY (2008) MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell research* 18:350-359

11 Appendix

11.1 Vortrag im Rahmen der 16. Chirurgischen Forschungstage in Regensburg

Die Inhalte der hier vorliegenden Studie wurden auszugsweise bereits auf den 16. Chirurgischen Forschungstagen präsentiert, die vom 04.10.2012 – 06.10.2012 unter der Schirmherrschaft der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DGCh) am Universitätsklinikum Regensburg stattfanden. Unter der Überschrift „MicroRNA-Screening von Laser-mikrodissektiertem Formalin-fixiertem Paraffingewebe (FFPE) zur Differenzierung zwischen Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis und gesundem Pankreas“ erfolgte im Rahmen eines ca. 10-minütigen Vortrages die Vorstellung der hier ausführlich erläuterten Ergebnisse. Letztere waren zudem Gegenstand einer ausgiebigen Diskussion, die sich dem Vortrag anschloss.

11.2 Erstellung der Dissertationsschrift

Die Erstellung der Dissertationsschrift erfolgte mit Microsoft Word 2010 (Microsoft Corporation, Redmond / USA). Bibliographische Einträge wurden mit dem Programm „EndNOTE® X6“ von Thomson Reuters (Thomson Reuters Corporation, New York City / USA) vorgenommen. Sämtliche Illustrationen sind mit Microsoft Visio 2010 oder Microsoft Word 2010 (Microsoft Corporation, Redmond / USA) generiert worden. Zur Diagrammerstellung wurden SPSS Statistics 20.0 (IBM Corporation, Armonk / USA) und Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond / USA) genutzt.