

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

Mikrosatelliteninstabilität
beim
duktalen Adenokarzinom des Pankreas

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marika Miriam Rehbein

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Stoecklein

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Graf

Zusammenfassung

Hintergrund: In Deutschland erkranken pro Jahr knapp 13.000 Menschen an einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas, welches mit schlechter Prognose verbunden ist. Bisher gelten Merkmale wie lokale Tumorexpanansion und Tumorstadium nach UICC-Kriterien als aussagekräftige prognostische Marker. Der Einfluss molekularer Merkmale wie die genetische Instabilität, darunter auch die Mikrosatelliteninstabilität (MSI), ist Gegenstand aktueller Diskussion und Forschung.

Methode: In dieser Studie wurde ein Tumorkollektiv von 37 Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom (PDAC) nach dem HNPCC-Bethesda-Schema mit den Markern BAT25, BAT26, D2S123, D17S250 und D5S346 auf MSI untersucht. Des Weiteren wurden die Tumoren immunhistochemisch bezüglich der Expression der MMR-Reparaturproteine MLH1 und MSH2 analysiert. Der bereits bekannte Ploidiestatus der Tumore sollte mit der gemessenen MSI korreliert werden, insbesondere mit der Frage ob MSI-Tumore vom diploiden Typ sind.

Ergebnisse: Von den 37 untersuchten Tumoren wiesen sechs (16,2%) eine MSI (MSI(1)) auf. Bei zwei der 37 Tumoren (5,4%) konnte an jeweils zwei (MSI(2)) Mikrosatellitenmarkern eine Längenveränderung gefunden werden. Bei allen acht Tumoren fand sich immunhistochemisch ein Verlust der Proteinexpression beider Reparaturgene MLH1 und MSH2. Einen vollständigen Expressionsverlust zeigten die beiden Proben mit Längenveränderung an jeweils zwei Markern (MSI-H). Bei 21 untersuchten Loci (56,8%) wurden Allelverluste (LOH) gefunden und in vier Fällen (10,8 %) bestand eine Kombination mit einer MSI. Weiterhin zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen MSI und diploidem Chromosomensatz. Jedoch wiesen beide MSI-H Fälle einen diploiden Chromosomensatz auf.

Fazit: Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die bisherigen Publikationen, nach denen eine MSI-H in Pankreaskarzinomen vom Typ PDAC sehr selten auftritt. Insgesamt scheint MSI auch bei aneuploiden, chromosomal instabilen PDAC vorzukommen und geht mit einem Expressionsverlust der DNA Reparaturgene MLH1 und MSH2 einher.

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatöse Polyposis des Colons
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BRCA	Breast cancer type 2
CA	Carbohydrat Antigen
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CIN	Chromosomale Instabilität
DAB	Diaminobenzidintetrachlorid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DPC4	Deleted in pancreatic cancer locus 4
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
FAMM-PC	Familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic cancer
FSP	Frameshift-Peptide
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hMLH1	human mutL homologue 1
hMSH2	human mutS homologue 2
hMSH6	human mutS homologue 6
HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal cancer
IPMC	Intraductal papillary-mucinous carcinoma
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LOH	Loss of Heterozygosity
MCN	Muzinös zystische Neoplasie
MD-CT	Multidetektor-Computertomografie
MMR	Mismatchrepair
MRT	Magnetresonanztomografie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	Mikrosatelliteninstabilität-high
MSI-L	Mikrosatelliteninstabilität-low
MSS	Mikrosatellitenstabilität
NCI	National Cancer Institute
PanIN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	Ductal adeno carcinoma of the pancreas
PRSS	Protease, Serine, Trypsin
RKI	Robert Koch-Institut
STK11	Serine/threonine kinase 11
TGF	Tumor growth factor
TMA	Tissue-Micro-Array
TNM	T(umor)N(odes)M(etastases)
UICC	Union for International Cancer Control

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung I

Abkürzungsverzeichnis II

Abbildungsverzeichnis V

Tabellenverzeichnis V

1 Einleitung 1

1.1 Einführung in die Thematik und Zielsetzung 1

1.1.1 Problemstellung 1

1.1.2 Zielsetzung und Fragestellung 2

1.2 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas 3

1.2.1 Epidemiologie und Klassifikation..... 3

1.2.2 Ätiologie..... 6

1.2.3 Pathogenese..... 7

1.2.4 Klinik und Diagnostik..... 8

1.2.5 Therapie und Prognose..... 9

1.3 Genetische Veränderungen im duktales Pankreaskarzinom 10

1.3.1 Onkogene und Tumorsuppressorgene..... 10

1.3.2 Das Mismatch-Reparatursystem (MMR)..... 12

1.3.3 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)..... 13

1.3.4 HNPCC (Hereditary non-polyposis colorectal cancer)..... 14

1.3.5 Mikrosatelliteninstabilität beim Pankreaskarzinom..... 17

2 Material und Methoden 19

2.1 Patientenkollektiv 19

2.2 Histopathologische Untersuchung 21

2.3 Manuelle Mikrodissektion 21

2.4 DNA-Extraktion 22

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur MSI-Detektion 22

2.6 PCR-Kontrolle mittels Gelelektrophorese 23

2.7 Mikrosatellitenanalyse 24

2.8 Tissue-Micro-Array (TMA) 25

2.8.1 Präparation der TMA 25

2.8.2 Immunhistochemische Analyse 26

2.8.3 Auswertung der Expression von MLH1 und MSH2..... 27

2.8.4 Puffer..... 27

2.8.5 Primer..... 28

2.9 Statistische Methodik 28

3 Ergebnisse 30

3.1	<i>Beschreibung des Patientenkollektivs</i>	30
3.2	<i>Messergebnisse und Prä-Analysen</i>	32
3.2.1	Daten zur DNA-Extraktion und zum PCR-Erfolg	32
3.2.2	Prävalenz der Mikrosatelliteninstabilität und Allelverluste.....	33
3.2.3	Daten der Expression der DNA-Reparaturgene hMLH1 und hMSH2	35
3.3	<i>Statistische Auswertung der Korrelation von MSI und anderen Parametern</i>	38
3.3.1	Zusammenhang von MSI und Expression von MLH1 und MSH2.....	38
3.3.2	Zusammenhang von MSI und Ploidie-Status.....	43
3.4	<i>Zusätzliche Analysen</i>	44
3.5	<i>Fallbeschreibung der MSI-Fälle</i>	45
4	<i>Diskussion</i>	48
4.1	<i>Mikrosatelliteninstabilität im PDAC</i>	48
4.1.1	Prävalenz einer MSI im PDAC	48
4.1.2	Zusammenhang zwischen MSI-Status und MMR-System	50
4.1.3	Zusammenhang zwischen LOH und MSI.....	52
4.1.4	Zusammenhang zwischen MSI und Ploidie-Status.....	53
4.1.5	Diskussion der beiden MSI-high-Fälle	54
4.2	<i>Analyse der Mikrosatelliteninstabilität beim Pankreaskarzinom</i>	55
4.2.1	Problematik der Auswahl der MSI Marker	
4.2.2	Mögliche Ursachen und Zusammenhänge der Mikrosatelliteninstabilität beim Pankreaskarzinom	57
5	<i>Fazit und Ausblick</i>	59
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	
7	Danksagung	
8	Eidesstattliche Versicherung	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Produktlänge	23
Abbildung 2: Altersklassenverteilung der Patientenstichprobe	31
Abbildung 3: A:Immunhistochemie:normale Expression von hMLH1im Pankreas- gewebe. B: Immunhistochemie: fehlende Expression von hMLH1 im Karzinomge- webe.....	37
Abbildung 4: Elektropherogramme des Markers D17S250 des Patienten 1F1.	46
Abbildung 5: Elektropherogramme des Markers BAT25 des Patienten 1F1.	46
Abbildung 6: Elektropherogramm des Markers D17S250 des Patienten 1E4.....	47
Abbildung 7: Elektropherogramm des Markers BAT26 des Patienten 1E4.....	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadien-Einteilung des duktales Pankreaskarzinoms	4
Tabelle 2: TNM-Klassifikation des duktales Pankreaskarzinoms.....	5
(UICC-TNM stage classification, 5. Edition)	5
Tabelle 3: Familiäre Syndrome und Keimbahnmutationen, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für ein Pankreaskarzinom einhergehen (Hruban et al. 2010)	7
Tabelle 4 a: Amsterdam-Kriterien zur Diagnostik von Patienten mit Verdacht auf HNPCC	15
Tabelle 4 b: Erweiterte Amsterdam-Kriterien zur Diagnostik von Patienten mit Verdacht auf HNPCC.....	16
Tabelle 5: Bethesda-Kriterien zur Diagnostik von Patienten mit Verdacht auf Vorliegen eines MSI-Tumors.....	16
Tabelle 6: Patientendaten; Infiltrationstiefe bzw. Ausdehnung des Tumors (pT- Kategorie), Lymphknotenbefall (pN-Kategorie), Metastasen (pM-Kategorie), Diffe- renzierungsgrad der Tumoren (Grading).....	19
Tabelle 7: Produktgröße der DNA-Fragmente.....	23
Tabelle 8: Untersuchte Mikrosatelliten-Loci	25
Tabelle 9: Score der MLH1- und MSH2-Expression.....	27
Tabelle 10: Verwendete Puffer	27
Tabelle 11: Verwendete Primer (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland).....	28
Tabelle 12: Statistiken der Altersverteilung.....	30
Tabelle 13: Altersklassenverteilung.....	31
Tabelle 14: DNA-Gehalt der Proben.....	32
Tabelle 15: Auftreten von MSI und LOH bei 37 Pankreaskarzinomen bei den fünf untersuchten Markern. MSI: Mikrosatelliteninstabilität; 34	
Tabelle 16: Häufigkeiten der Fälle mit MSI und LOH bei den verschiedenen Markern	35
Tabelle 17: MLH1- und MSH2-Expression und Gesamtwertung	36

Tabelle 18: Verteilung untersuchter Größen.....	38
Tabelle 19: Zusammenhang zwischen MSI (1) und MLH1-Verlust (> 50%)	39
Tabelle 20: Zusammenhang zwischen MSI (2) und MLH1-Verlust (> 50%)	39
Tabelle 21: Zusammenhang zwischen MSI (1) und MSH2-Verlust (> 50%)	40
Tabelle 22: Zusammenhang zwischen MSI (2) und MSH2-Verlust (> 50%)	40
Tabelle 23: Mann-Whitney-U-Test auf Expressionsunterschied zwischen „MSI ja“ und „MSI nein“	41
Tabelle 24: Deskriptive Statistiken zu dem Mann-Whitney-U-Test zu unterschiedlichem Expressionsverlust auf „MSI ja" versus „MSI nein" (bezogen auf Tabelle 20).	42
Tabelle 25: Zusammenhang zwischen MSI(1) und Ploidiestatus diploid.....	43
Tabelle 26: Zusammenhang zwischen MSI(2) und Ploidiestatus diploid.....	43
Tabelle 27: Übersicht der bisher durchgeführten Studien zur Mikrosatelliteninstabili- tät beim Pankreaskarzinom	49

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik und Zielsetzung

1.1.1 Problemstellung

Die Relevanz der Forschung im Bereich der Biologie der Pankreaskarzinome ergibt sich aus dem Problem, dass sich diese Tumoren äußerst aggressiv verhalten und trotz bestehender kurativer Therapieansätze die Prognose in den meisten Fällen als infaust bezeichnet werden kann (Zalatnai et al. 2003). Laut Statistik des Robert Koch-Instituts erkrankten in Deutschland im Jahr 2008 15.000 Männer und Frauen an bösartigen Veränderungen des Pankreas (Kaatsch et al. 2012, Krebsbroschüre des Robert Koch-Instituts, 2012). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt acht Prozent für Männer und sieben Prozent für Frauen. Demnach stellen Tumoren des Pankreas drei Prozent aller Krebserkrankungen sowie fünf Prozent aller Krebstodesfälle dar und sind bei beiden Geschlechtern die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland.

Ein wichtiger Grund für die geringen Heilungschancen bei Pankreaskarzinomen ist, dass die Diagnose oft zu spät erfolgt und daher den Patienten keine kurativen Behandlungen angeboten werden können. Der Schlüssel zur Verbesserung der Heilungschancen bzw. einer Lebensverlängerung für Betroffene liegt daher in einem verbesserten Verständnis der Entstehung und Progression dieser Krebserkrankung, um geeignete Screening-Methoden entwickeln zu können, damit Patienten frühzeitig einer Therapie zugeführt werden können (Sievert et al. 2010).

Bisher gelten Merkmale wie lokale Tumorexpansion und Tumorstadium nach UICC-Kriterien (Bomme et al. 1998; Klöppel 2011; Lüttges 2011) als aussagekräftige prognostische Marker. Der prognostische Einfluss molekularer Merkmale, wie beispielsweise die genetische Instabilität, ist weiterhin Gegenstand aktueller Diskussion und Forschung.

Bei Tumorentstehung und Progression von Pankreaskarzinomen, spielt die genetische Instabilität sowohl auf chromosomaler als auch auf Nukleotid-Ebene eine entscheidende Rolle (Tannapfel 2010).

Bei den Pankreaskarzinomen ist die so genannte chromosomale Instabilität (CIN) führend, doch scheint auch die MSI offenbar eine Rolle beim Pankreaskarzinom zu spielen (Strand et al. 1993; Rindi et al. 2005; Bartram 2010). Ähnliche Charakteristika sind beim Kolonkarzinom bekannt (Hruban et al. 2008; Baldus et al. 2010), wobei 1993 erstmals für das HNPCC eine Instabilität der Mikrosatelliten beschrieben wurde und mittlerweile für diagnostische Zwecke genutzt wird (Ionov et al. 1993; Thibodeau et al. 1993; Aaltonen et al. 1993; Klein et al. 2002; Friedrichs et al. 2012). Interessanterweise zeigen gerade die MSI-positiven Kolonkarzinome trotz aggressiver histopathologischer Charakteristika insgesamt vergleichsweise günstigere Prognosen. Daher wird ein ähnliches Phänomen beim Pankreaskarzinom erwogen. Die Pankreaskarzinome gelten als chromosomal instabil und zeigen gehäuft auftretende genetische Veränderungen (Griffin et al. 1995; van Heek et al. 2002; Harada et al. 2002; Moskovitz et al. 2003; Stoecklein et al. 2004; Baumgart et al. 2010).

1.1.2 Zielsetzung und Fragestellung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, die Prävalenz der MSI bei Pankreaskarzinomen eines bereits auf chromosomale Instabilität untersuchten Tumorkollektivs (Stoecklein et al. 2004) zu analysieren. Die MSI sollte dazu in einem definierten Patientenkollektiv mit einem pathologisch gesicherten duktalem Adenokarzinom des Pankreas über PCR ermittelt werden.

Es stellte sich die Frage, ob eine Korrelation zwischen der Expression der Reparaturgene und einer MSI besteht. Zu deren Beantwortung sollte die Expression der Reparaturgene MLH1 und MSH2 analysiert werden.

Die Daten der Analyse der MSI sollen nach Möglichkeit mit weiteren klinischen und histopathologischen Daten, wie Tumorstadium und histologische Differenzierung, korreliert werden.

1.2 Das duktale Adenokarzinom des Pankreas

1.2.1 Epidemiologie und Klassifikation

In Deutschland machen Pankreaskarzinome drei Prozent aller Neoplasien aus und gehören damit nicht zu den häufigen Krebserkrankungen (RKI 2012). Die Inzidenz lag im Jahr 2008 bei 12,7/100.000 Männer und 9,4/100.000 Frauen. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Lebensalter, sodass der Erkrankungsgipfel zwischen der siebten und achten Lebensdekade liegt (RKI 2012). Trotz intensiver Forschung gehört das duktale Pankreaskarzinom zu den Tumorerkrankungen mit der schlechtesten Prognose. Die mittlere Überlebenszeit nach Erstdiagnose beträgt durchschnittlich fünf bis acht Monate. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei circa acht Prozent mit einer Gesamtletalität von nahezu 100 Prozent (RKI 2012). Aufgrund dessen sind derzeit fünf Prozent aller Krebstodesfälle durch das Pankreaskarzinom bedingt, das damit an vierter Stelle der tumorbedingten Todesfälle in Deutschland rangiert (RKI 2012).

Das Pankreaskarzinom wird entsprechend der Invasivität, des Lymphknotenstatus und Fernmetastasen durch das TNM-System des American Joint Committee on Cancer (AJCC) / Union International Contre le Cancer (Klöppel et al. 2011) klassifiziert und in vier Stadien eingeteilt (Tabelle 1 und Tabelle 2). Die genaue Einordnung der jeweiligen Patienten in dieses Schema ist von besonderer Bedeutung hinsichtlich der möglichen kurativ chirurgischen oder palliativen Therapieoptionen. Mit 92 Prozent ist das duktale Adenokarzinom (PDAC, ductal adeno carcinoma of the pancreas) der häufigste maligne Tumor des exokrinen Pankreas.

	Tumor	Regionale Lymphknoten	Fernmetastasen	
Stadium 0	Tis	N0	M0	Carcinoma in situ
Stadium IA	T1	N0	M0	Auf Pankreas beschränkt
Stadium IB	T2	N0	M0	Auf Pankreas beschränkt
Stadium IIA	T3	N0	M0	Lokal invasives Wachstum
Stadium IIB	T1-T3	N1	M0	Lokal invasives Wachstum, Befall der regionären Lymphknoten
Stadium III	T4	jedes N	M0	Lokal invasives Wachstum
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: Stadien-Einteilung des duktaalen Pankreaskarzinoms

pT	Primärtumor
pTx	Primärtumor kann nicht untersucht werden
pT0	Kein Primärtumor nachweisbar
ptis	Carcinoma in situ
pT1	Größter Durchmesser < 2 cm/innerhalb des Pankreas
pT2	Größter Durchmesser >2 cm/ innerhalb des Pankreas
pT3	Primärtumor wächst in ein peripankreatisches Gewebe
pT4	Primärtumor wächst ein in angrenzende große Gefäße
pN	Regionäre Lymphknoten
pNx	Die regionären Lymphknoten können nicht untersucht werden
pN0	Keine nachweisbaren regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
pM	Fernmetastasen
pMx	Fernmetastasen können nicht untersucht werden
pM0	Keine nachweisbaren Fernmetastasen
pM1	Nachweisbare Fernmetastasen

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des duktales Pankreaskarzinoms
(UICC-TNM stage classification, 5. Edition)

1.2.2 Ätiologie

Die genaue Ätiologie des duktales Pankreaskarzinoms ist weiterhin unklar und die Studienlage widersprüchlich. Es gibt Studien zu exogenen Faktoren wie zum Beispiel Nikotinabusus (Lynch et al. 2009), fettreiche Ernährung (Berrington et al. 2003) oder übermäßiger Verzehr von rotem Fleisch (Nöthlings et al. 2005), wobei Letzteres in einer kürzlich erschienenen großen Kohortenstudie von 865 Fällen als nicht korrelierbar erklärt wurde (Rohrman et al. 2012), sowie die Exposition chemischer Kanzerogene wie Nitrosamine, beispielsweise durch Passiv-Rauchen (Sponiello-Wang et al. 2008). Da der Erkrankungsgipfel in so hohem Alter liegt und zudem die Symptome unspezifisch sind, ist eine Korrelation mit prädisponierenden Faktoren bisher schwierig. Im hohen Alter liegen in den meisten Fällen diverse Komorbiditäten vor, sodass sich die bisherigen Studien widersprechen. In Studien der 60er und 70er Jahre wurde bei Fabrikarbeitern ein Zusammenhang mit der Exposition von Benzidin und β -Naphthylamin dokumentiert (Mancuso et al. 1967; Fraumeni et al. 1975; Pietri et al. 1991).

Neben diesen exogenen Noxen prädisponieren chronische Pankreatitiden und Diabetes mellitus sowie hereditäre Faktoren in der Karzinogenese des duktales Pankreaskarzinoms (Li et al. 2009; Krejs 2010; Huggett et al. 2011). Dieser Anteil der auf ererbten genetischen Defekten basierenden Pankreaskarzinome wird auf fünf bis zehn Prozent geschätzt (Vitone et al. 2006; Hruban et al. 2010).

Es gibt Studien, die belegen, dass Verwandte ersten Grades von Patienten mit sporadischem Pankreaskarzinom ein erhöhtes Risiko haben, ebenfalls an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Grocock et al. 2007).

Menschen mit genetischen Prädispositionen haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko für ein Pankreaskarzinom, dazu gehört beispielsweise das Peutz-Jeghers-Syndrom - hier besteht ein 130-fach erhöhtes Risiko (Latchford et al. 2006; Hruban et al. 2010). Ein circa 50-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko ergibt sich für Patienten mit einer hereditären Pankreatitis (Huggett et al. 2011). Des Weiteren gibt es Studien, die belegen, dass Keimbahnmutationen des BRCA2-Gens mit einem drei- bis fünffach erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen und Keimbahnmutationen in p16/CDKN2A ein 13- bis 37-faches Risiko beinhalten (Hahn et al. 2003; Hruban et al. 2010; siehe auch Kapitel 1.3.1).

Als Risikofaktoren gelten schließlich das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) mit Keimbahnmutationen im APC-Gen oder in Mismatch-Repair-Genen (hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2) sowie die Ataxia teleangiectasia mit Keimbahnmutationen im ATM-Gen (Oettle 2010; siehe Kapitel 1.3.4). Eine Aufstellung der hier beschriebenen Syndrome und Mutationen zeigt Tabelle 3.

Syndrom	Gen	Erkrankungsrisiko
Peutz-Jeghers-Syndrom	STK11	130-fach
Hereditäre Pankreatitis	PRSS1	50-fach
FAMM-Syndrom	p16/CDKN2A	9- bis 47-fach
Brust- und Ovarialkrebs-Syndrom	BRCA2	3-bis 10-fach

Tabelle 3: Familiäre Syndrome und Keimbahnmutationen, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für ein Pankreaskarzinom einhergehen (Hruban et al. 2010)

1.2.3 Pathogenese

90 Prozent der Karzinome des Pankreas stellen eine maligne Entartung der Zellen des einschichtigen Gangepithels (Ductus) dar (duktales Adenokarzinom), in zehn Prozent der Fälle sind die sekretorischen Zellen des Azinusepithels ursächlich für die Entstehung des azinären Adenokarzinoms des Pankreas (Klöppel et al. 2001). Zu 70 Prozent finden sich Karzinome im Pankreaskopf. Als Präkanzerosen sind die muzinös-zystische Neoplasie (MCN), intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien (IPMN) und die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) bekannt.

Unter den malignen morphologischen Vorläuferstadien sind die PanIN Grad 1 bis 3 am häufigsten und mittlerweile am besten untersucht (Hruban et al. 2008). PanINs beschreiben die Tumorprogression von geringer Entartung über eine Dyplasie bis zum invasiven Karzinom (Hruban et al. 2008). Entsprechend den Ergebnissen zahlreicher Studien werden PanINs überwiegend in Karzinomen mit begleitender Pankreatitis gefunden. So zeigt PanIN-Grad3 bereits Mutationsprofile, die vergleichbar mit solchen von duktalem Adenokarzinomen des Pankreas sind, in erster Linie

KRAS2-Mutationen (Almoguera et al. 1988; Lühr et al. 2005). Die Anzahl der betroffenen Gene erhöht sich mit zunehmender Progression (Lühr et al. 2005; Koorstra et al. 2008). Dieser Thematik wird sich Kapitel 1.3 detailliert annehmen.

Bei bereits deutlicher Expansion des Tumors findet sich zu 90 Prozent eine Nervenscheideninfiltration und zu 70 Prozent eine regionäre Lymphknotenmetastasierung. Die Fernmetastasierung erfolgt in Leber, Lunge, Gehirn und Knochen.

1.2.4 Klinik und Diagnostik

Die Klinik des Pankreaskarzinoms ist je nach Lokalisation im Pankreas und Expansion des Tumors sehr variabel. Gemein ist allen Symptomen, dass sie erst zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Erkrankung auftreten, wodurch die Karzinome oft zu spät diagnostiziert werden und damit die schlechte Prognose bedingt wird. Häufige klinische Symptome sind Gewichtsabnahme, in den Rücken ausstrahlende Schmerzen, eine neu aufgetretene Glukoseintoleranz und Ikterus. Der Ikterus ist vor allem für das Pankreaskopfkarcinom typisch (Gerok et al. 2007).

Hier findet sich typischerweise auch das Courvoisier-Zeichen (eine tastbar vergrößerte Gallenblase). Der Ikterus wird durch die Stenose des distalen Anteils des Ductus choledochus verursacht und ist in der Regel schmerzlos und progredient. Ein Verschluss des Pankreasganges kann im Weiteren zur Pankreatitis und damit zu einer Organdysfunktion führen. Folgen sind Gewichtsverlust durch Maldigestion, Diabetes und krankheitsbezogene Laborveränderungen, vor allem erhöhte Werte der pankreaspezifischen Enzyme wie Amylase und Lipase. Bei Lokalisation des Tumors im Pankreaskörper oder im Pankreasschwanz liegen die organspezifischen Laborwerte allerdings charakteristischerweise im Normbereich (Büchler et al. 2004; Gerok et al. 2007).

Werden diese Enzyme in hoher Konzentration in die Blutbahn ausgeschüttet, können Thrombophlebitiden und Thrombosen die Folge sein. Der mechanische Ikterus führt unbehandelt zur Leberinsuffizienz. Die lokale Tumorausbreitung kann ebenfalls die Entstehung einer Duodenalstenose und/oder einen Aszites bei Peritonealkarzinose begünstigen (Schoppmeyer et al. 2005).

Die Pankreastumoren können die Tumormarker CEA (Carcinoembryonales Antigen), CA50, CA195, CA242 und CA 19-9 exprimieren. Diese Tumormarker eignen

sich jedoch nicht zur Diagnosestellung, allenfalls zur Verlaufskontrolle (Oettle et al. 2007). Nach kurativer oder palliativer Therapie ist der Tumormarker CA 19-9 geeignet (Oettle et al. 2007).

Die Diagnosestellung im Anfangsstadium der Tumorerkrankung ist prognostisch entscheidend. Entsprechend ist bei Verdacht auf Vorliegen eines Pankreaskarzinoms die unverzügliche Abklärung indiziert. Hierzu eignen sich die bildgebenden Verfahren wie Nativ Radiologische Röntgendiagnostik, Abdomen-Sonografie, Magnet-Resonanz-Tomografie, ERCP und Computertomografie. Letztere wird entsprechend den Leitlinien für Staging und Diagnose empfohlen (www.awmf.org Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie). Zur weiterführenden Diagnostik eignen sich die Multidetektor-Computertomografie (MD-CT), die Endosonografie und die MRT, um Tumoren im Anfangsstadium und/oder den Grad der Metastasierung zu erkennen (Adler et al. 2007; Oettle et al. 2010). Zur weiteren Diagnosesicherung durch Gewebeentnahme eignen sich endoskopische Verfahren oder die Laparoskopie. Weiterhin können Biopsien auch mittels Feinnadelpunktion unter CT-Kontrolle entnommen werden.

1.2.5 Therapie und Prognose

Für die Therapie gilt seit 2007 die S3-Richtlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, entstanden aus einer groß angelegten interdisziplinären Kooperation, basierend unter anderem auf den Leitlinien der AWMF (Adler et al. 2007; Oettle et al. 2010). Dabei ist das Staging von besonderer Bedeutung. Aufgrund einer im Tumoranfangsstadium bestehenden Asymptomatik stellen sich die meisten Patienten erst mit deutlichem Tumorprogress vor (bereits als T3 einzustufen). Entsprechend haben nur 20 Prozent der Patienten mit Pankreaskarzinom bei Erstdiagnose ein Stadium T1 oder T2.

Hier ist eine operative Tumoresektion die Therapie der Wahl, wobei heute 5-Jahres-Überlebensraten von 18 bis 25 Prozent erreicht werden können (Holzmann 2010). Trotz Ausschöpfen präoperativer Diagnostik ist die endgültige Entscheidung über die Tumoresektabilität oft erst intraoperativ möglich. Im Falle eines chirurgischen Eingriffs wird in den meisten Fällen eine Operation nach Whipple durchgeführt, wobei Pankreaskopf, Duodenum, Gallenblase, Teile der Gallenwege und ein Teil des Magens entfernt werden (www.awmf.de, Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Allgemein und Viszeralchirurgie, 2008).

Aufgrund der verzögerten Latenz bis zur Erstdiagnose des Pankreaskarzinoms ist der Therapieansatz in den meisten Fällen palliativ. Dabei stehen vor allem symptomatische Maßnahmen wie Schmerztherapie, parenterale Ernährung, Stenteinlage und ggf. eine Chemo- oder Radiochemotherapie im Vordergrund. Die Standardchemotherapie für sowohl lokal begrenzte, als auch für bereits fortgeschrittene Pankreaskarzinome besteht aus Gemcitabine, alternativ aus FOLFIRINOX, einer Kombination von Fluorouracil, Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin (Oettle et al. 2010).

Der entscheidende Vorteil der Chemotherapie bleibt umstritten, da die mittlere Überlebenszeit mit Chemotherapie bei weniger als sechs Monaten liegt, was in etwa der Rate ohne Einsatz von Gemcitabine entspricht (Burris et al. 2008; Oettle et al. 2010).

1.3 Genetische Veränderungen im duktalem Pankreaskarzinom

1.3.1 Onkogene und Tumorsuppressorgene

Mutationen stellen eine wesentliche Basis für das multifaktorielle Geschehen der Tumorgenese von Pankreaskarzinomen dar. Wichtig sind hierbei insbesondere genetische Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, die mit verstärkter Expression der onkogenen Proteine einerseits und verminderter Expression tumorprotektiver Proteine andererseits (Fearon et al. 1990) einhergehen. Der Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity, LOH) ist dabei ein wichtiger Mechanismus bei Karzinomen, um Tumorsuppressorgene dauerhaft auszuschalten.

Beim duktalem Pankreaskarzinom werden dabei besonders häufig sich wiederholende Mutationen im KRAS-Onkogen sowie inaktivierende Mutationen der Tumorsuppressorgene p16INK4A/CDKN2A, p53, BRCA2, PRSS1, STK11 und SMAD4/DPC4 gefunden (Caldas et al. 1994; DiGiuseppe et al. 1994; Rozenblum et al. 1997; Hruban et al. 2008).

Die aktivierenden Mutationen des KRAS-Onkogens nehmen hierbei eine besondere Rolle ein und können bei 90 Prozent aller Pankreaskarzinome gefunden werden (Almoguera et al. 1988; Moskaluk et al. 1997; Hruban et al. 2008). Die Mutationen des KRAS-Onkogens treten als ein sehr frühes Ereignis innerhalb der pankreatischen Tumorentstehung auf, da sie zu einer permanenten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und zur Induktion diverser Signaltransduktionswege führen sowie Tu-

morsuppressorgene beeinflussen, und werden bereits in den PanIN-1 gefunden (Serrano et al. 1997; Moskaluk et al. 1997; Löhr et al. 2005; Schubbert et al. 2007; Hruban et al. 2008; Baldus et al. 2010; Herner et al. 2011; Kelber et al. 2012). Die meisten Punktmutationen des KRAS sind auf Codon 12 lokalisiert (Wilentz et al. 1998; Lüttges et al. 2002; Baldus et al. 2010). Inaktivierungen der Tumorsuppressorgene p16/INK4A und p53 sowie SMAD4/DPC4 finden sich erst ab PanIN-2 und PanIN-3, (Yamano et al. 2000; Wilentz et al. 2000; Koorstra et al. 2008), insbesondere homozygote Mutationen in p53 (Baumgart et al. 2010).

Zur Inaktivierung der Tumorsuppressorgene und der Ausprägung der Mutationen gibt es eine Vielzahl an Untersuchungen von denen hier nur einige beispielhaft genannt werden sollen. Inhibierung von p16/INK4A, einem der Kontrollgene des Zellzyklus, führt zu einer unkontrollierten Zellzyklusregulation und ist von kritischer Bedeutung für die Tumorgenese des Pankreaskarzinoms (Serrano et al. 1997). Veränderungen in p16/INK4A entstehen zum Teil durch Punktmutationen, aber auch durch homozygote Deletionen und durch Hypermethylierung in der Promotorregion (Caldas et al. 1994; Rozenblum et al. 1997; Wilentz et al. 1998; Gerdes et al. 2002). Bei bis zu 80 Prozent aller Pankreaskarzinome konnten Mutationen von p16 nachgewiesen werden, wobei Hypermethylierungen im Promotorbereich am häufigsten detektiert wurden (Caldas et al. 1994; Goggins et al. 1998; Wilentz et al. 1998; Attri et al. 2005). In einigen Studien wurde eine Korrelation zwischen einer p16-Inhibierung und einer ungünstigen Tumorprognose beobachtet (Gerdes et al. 2002).

Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 sind bestätigte Progressionsfaktoren in der Genese unterschiedlichster Tumoren. Eine damit verbundene Überexpression des Proteins p53 findet sich bei bis zu 75 Prozent aller Pankreaskarzinome (Rozenblum et al. 1997). Als viertes wichtiges Gen in der Onkogenese des Pankreaskarzinoms wurde das Tumorsuppressorgen DPC4 (deleted in pancreatic cancer locus 4) identifiziert (Hahn et al. 1996). Das durch DPC4 kodierte zytoplasmatische Protein SMAD4 ist Bestandteil der TGF- β -Signaltransduktionskaskade und wirkt als Transkriptionsfaktor (Lagna et al. 1996; Goggins et al. 1998a; Bardeesy et al. 2006). Im Zusammenspiel mit TGF- β wird die SMAD4-Expression als essenziell für eine gute Prognose nach Resektion des Pankreaskarzinoms angesehen (Tascilar et al. 2001). SMAD4-Minderexpression scheint auch KRAS-Mutationen zu verstärken und die INK4A-Expression zu hemmen (Bardeesy et al. 2006). Eine homozygote Deletion

des DPC4 konnte in etwa 50 Prozent aller Pankreaskarzinome beobachtet werden. Loss of heterozygosity wird für bis zu 90 Prozent aller Tumoren vermutet (Hahn et al. 1996; Izeradjene et al. 2007).

Neben diesen klassischen Veränderungen wird immer häufiger auch eine genetische Veränderung im Bereich der postreplikativen DNA-Reparaturmechanismen gefunden, das heißt der Gene, die Fehlpaarungen (Mismatch) reparieren (Goggins et al. 1998b; Wilentz et al. 2000; Yamamoto et al. 2001). Das Mismatch-Reparatursystem und die damit zusammenhängende MSI betrachten die beiden folgenden Abschnitte. Bezüglich der genetischen Instabilität kann grundsätzlich festgehalten werden, dass PDAC zu den chromosomal instabilen Tumoren gehören und häufig durch Aneuploidien und starke strukturelle Chromosomenveränderungen geprägt sind (Stoecklein et al. 2004). Nach der bisherigen Datenlage scheinen PDAC, die eine ausgeprägte Aneuploidisierung aufweisen ein aggressiveres Verhalten zu haben, was sich in früherer Metastasierung oder kürzeren Überlebenszeiten äußern kann (Stoecklein et al. 2004)

1.3.2 Das Mismatch-Reparatursystem (MMR)

Das Mismatch-Reparatursystem (MMR) umfasst sechs Gene, die für Enzyme kodieren, welche Replikationsfehler aus Basenfehlpaarungen, kleineren nicht-gepaarten DNA-Schleifen (loops) und die Rekombination nicht-homologer DNA-Stränge reparieren und damit die Mutationsrate gering halten: hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6, hMSH3 (Goggins et al. 1998b; Peltomäki 2001; Modrich 1996).

In *Escherichia coli* Bakterien umfasst das Reparatursystem die folgenden Enzyme: MutS, MutH, MutL, DNA-Helicase, SSB (Single Strand binding Protein), ExonukleaseVII (5'-3'), ExonukleaseI (3'-5'), DNA-PolymeraseIII und DNA-Ligase (Lahue et al. 1989). Fehler werden bei jeder Replikation an die Tochterzelle weitergegeben. Ohne adäquate Expression der Reparaturproteine können Fehler nicht erkannt werden. Der MutS-Komplex besteht aus den Reparaturproteinen MSH2, MSH3 und MSH6. Es gibt auch hier Untergruppen für spezifische Aufgaben, wie beispielsweise den MutS α -Komplex- bestehend aus MSH2 und MSH6 -welcher bevorzugt Fehlpaarungen einzelner Basen sowie Loops von ein bis zwei Basen bindet und als essenziell für ein funktionierendes MMR-System erkannt wurde (Acharya et al. 1996; Gu et al. 2002; Modrich et al. 2006). Der MutL-Komplex

besteht aus MLH1 und PMS 1-8 und erkennt Loops von zwei bis zehn Nukleotiden (Modrich et al. 2006; Peltomäki et al. 2001).

Beide Allele eines MMR-Gens müssen inaktiviert sein, um ein defektes MMR-System zu verursachen (Goggins et al. 1998b; Saletti et al. 2001). Wenn zum Beispiel eine inaktivierende Mutation auf einem Allel in der Keimbahn vorliegt, können somatische Mutationen auf dem korrespondierenden Allel in der Folge den Totalausfall der genetischen Information und damit auch den Verlust der Reparaturfähigkeit von längenveränderten Mikrosatelliten bewirken (siehe Kapitel 1.3.3; Ionov et al. 1993; Thibodeau et al. 1993; Friedl 2002; Goggins et al. 1998b; Peltomäki et al. 2001).

Mutationen an diesem System können angeboren oder erworben sein. In neueren Studien wurde bei zwischen 15 und 54 Prozent der untersuchten kolorektalen Karzinome ein MMR-Defekt analysiert (Müller et al. 2009; Kaur et al. 2011). MSI als Konsequenz eines defekten MMR wurde bereits in Tumoren des Dickdarms (HNPCC), des Magens, des Endometriums und des Pankreas beobachtet (Brentnall et al. 1995; Goggins et al. 1998b; Yamamoto et al. 2001).

1.3.3 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Mikrosatelliten (MS) sind Wiederholungssequenzen von einem bis fünf Nukleotidmotiven, die im gesamten menschlichen Genom zu finden sind. Sie sind interindividuell unterschiedlich und werden in konstanter Länge von Zellgeneration zu Zellgeneration repliziert. Die sich wiederholende Sequenz in einem MS besteht aus zehn bis 60 Kopien und tritt ungefähr jedes 50.000 bis 100.000ste Basenpaar auf (Saletti et al. 2001).

Meist liegen die MS in intergenischen oder intronischen DNA-Abschnitten. Vereinzelt findet man sie auch als einfache Sequenz in kodierenden Regionen genomstabilisierender DNA-Abschnitte. MS sind die häufigste Form repetitiver DNA (Modrich 2006). MSI bedeutet eine veränderte Länge repetitiver Sequenzen der MS, wobei sich im Verlauf der Replikation der neu synthetisierte gegen den abgelesenen DNA-Strang im Bereich von DNA-Repeats verschoben hat (Modrich 2006). Solche Fehler können physiologischerweise durch ein intaktes MMR erkannt und korrigiert werden.

Diese Replikationsfehler können durch die Analyse spezifischer PCR-(Polymerase Chain Reaction) Produkte nachgewiesen werden. Tumoren mit diesem Phänomen werden als mikrosatelliteninstabil bezeichnet (Ionov et al. 1993; Brentnall et al. 2005; Perucho 1996; Saletti et al. 2001; Yamamoto et al. 2001). Die Wahrscheinlichkeit zur Genese eines Tumors steigt mit der Anzahl der fehlerhaften MS, insbesondere in solchen Genen, die für Wachstumsfaktoren kodieren, und in Abhängigkeit der Funktionsfähigkeit des MMR-Systems. Umgekehrt ist die Häufigkeit von MSI ein Marker für die Tumorprogression (Pino et al. 2009).

In kolorektalen Tumoren wird MSI sowohl in sporadischen Tumoren als auch in HNPCC nachgewiesen. In sporadischen Tumoren liegt die MSI-Häufigkeit je nach Untersuchungsmethode bei 15 Prozent, in HPNCC bei 90 Prozent (Peltomäki 2001; Yamamoto et al. 2001; Pino et al. 2009).

1.3.4 HNPCC (Hereditary non-polyposis colorectal cancer)

HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer, oder auch Lynch-Syndrom) ist eines der häufigsten Tumordispositionssyndrome (Lynch et al. 1996; Rustgi et al. 2007). Betroffene Patienten entwickeln nicht nur vermehrt Karzinome, sondern auch in erheblich jüngerem Alter, verglichen mit organspezifischen sporadischen Karzinomen. Die Vererbung erfolgt autosomal dominant mit einer Penetranz von mehr als 90 Prozent (Aarnio et al. 1999; Kopciuk et al. 2009).

Meist kommt es synchron oder metachron zum Auftreten mehrerer Karzinome. Im Vergleich zur Normalbevölkerung besteht für betroffene Patienten ein etwa siebenfach erhöhtes Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (Lynch et al. 1996; Rodriguez-Bigas et al. 1997). Am häufigsten ist das proximale Kolon betroffen. Neben dem Kolon finden sich auch Karzinome des Pankreas, des Endometriums, des Magens, der Gallengänge und des Ovars überdurchschnittlich häufig bei Patienten mit HNPCC (Vasen et al. 2007).

Bei HNPCC-Patienten sind Gene, die für Wachstumsfaktoren kodieren, wie zum Beispiel für TGF- β (Lu 1998; Bian et al. 2005), und Gene des MMR-Systems durch Mutationen verändert (Aaltonen et al. 1993; Peltomäki 2001; Saletti et al. 2001). Diese Gene sind, wie bereits in Abschnitt 1.3.2 erwähnt, folgende: hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6, hMSH3. Die meisten Mutationen in Bezug auf HNPCC

wurden bisher in den Genen hMSH2, hMSH6 und hMLH1 gefunden (Miyki et al. 1999; Möslein et al. 1996; Peltomäki 2001; Saletti et al. 2001). Dabei wurde für MSI-H -Tumoren in erster Linie die Methylierung der Promotorregion von MLH1 als verantwortlich gesehen (Peltomäki 2001; Yamamoto et al. 2001). Die Tatsache, dass hierbei die MLH1- und MSH2-Gene am häufigsten betroffen sind, unterstreicht die zentrale Funktion der kodierten Proteine. Zur klinischen Diagnostik eines HNPCC wurden zunächst die Amsterdam-Kriterien etabliert (siehe Tabelle 4 a und 4 b). Im Jahr 2004 wurden aufgrund der erweiterten molekulargenetischen Forschung, angeregt durch das NCI, die so genannten Bethesda-Kriterien (siehe Tabelle 5) formuliert (Umar et al. 2004). Die Bethesda-Kriterien stellen die Basis für ein Erkennen derjenigen Patienten dar, deren Tumoren auf eine MSI untersucht werden sollten. Vom National Cancer Institute der USA wurde die Analyse von fünf Mikrosatelliten empfohlen (Thibodeau et al. 1998). Zeigt sich bei zwei oder mehreren der Markern eine MSI, so wird der Tumor als MSI-H (high) eingeordnet. Bei nur einem instabilen Marker spricht man von einem MSI-L (low). Zeigt sich kein instabiler Marker, so ist der Tumor als mikrosatellitenstabil (MSS) einzustufen. Bei Tumoren von HNPCC-Patienten, bei denen eine krankheitsrelevante Mutation im MMR-System nachgewiesen wurde, kann in nahezu 90 Prozent der Fälle eine MSI im Tumor gefunden werden. 85 bis 90 Prozent der Tumoren von Patienten aus HNPCC-Familien sind nach Amsterdam-Kriterien mikrosatelliteninstabil (Möslein et al. 1999). Daher lässt sich der Nachweis einer MSI als Screening-Verfahren nutzen.

Amsterdam-Kriterien I	
	Mindestens drei Familienangehörige mit histologisch gesichertem kolorektalem Karzinom, davon einer mit den beiden anderen erstgradig verwandt; FAP muss ausgeschlossen sein.
	Wenigstens zwei aufeinanderfolgende Generationen betroffen.
	Bei mindestens einem Patienten Diagnosestellung vor dem 50. Lebensjahr.

Tabelle 4 a: Amsterdam-Kriterien zur Diagnostik von Patienten mit Verdacht auf HNPCC

Amsterdam-Kriterien II	
	Mindestens drei Familienangehörige mit histologisch gesichertem kolorektalem Karzinom oder einem Karzinom des Endometriums, Dünndarms oder Urothels (ableitende Harnwege/Nierenbecken), davon einer mit den beiden anderen erstgradig verwandt; FAP muss ausgeschlossen sein.
	Wenigstens zwei aufeinanderfolgende Generationen betroffen.
	Bei mindestens einem Patienten Diagnosestellung vor dem 50. Lebensjahr.

Tabelle 4 b: Erweiterte Amsterdam-Kriterien zur Diagnostik von Patienten mit Verdacht auf HNPCC

Bethesda-Kriterien (Patienten, die auf MSI untersucht werden sollen)	
	Personen mit positiver Familienanamnese entsprechend den Amsterdam-Kriterien I oder II.
	Personen mit synchronen oder metachronen kolorektalen Karzinomen oder HNPCC-assoziierten Tumor-Erkrankungen (Endometrium, Ovarien, Magen, Gallengang, Dünndarm, Urothel).
	Personen mit kolorektalem Karzinom und einem erstgradig Verwandten mit kolorektalem Karzinom und/oder HNPCC-assoziiierter Tumorerkrankung (einer davon vor dem 45. Lebensjahr) und/oder kolorektalem Adenom vor dem 40. Lebensjahr.
	Personen mit Kolon-/oder Endometriumkarzinom vor dem 45. Lebensjahr.
	Personen mit rechtsseitigem, histologisch undifferenziertem kolorektalem Karzinom vor dem 45. Lebensjahr.
	Personen mit kolorektalem Karzinom vom Siegelring-Zell-Typ vor dem 45. Lebensjahr.
	Personen mit Adenom vor dem 40. Lebensjahr.

Tabelle 5: Bethesda-Kriterien zur Diagnostik von Patienten mit Verdacht auf Vorliegen eines MSI-Tumors

1.3.5 Mikrosatelliteninstabilität beim Pankreaskarzinom

Die Konsequenz der genetischen Instabilität bei MSI scheint auch eine erhöhte Mutationsanfälligkeit und erhöhte Mutationsrate anderer Gene zu sein. Aufgrund dessen wird der MSI-Phänotyp in einigen Studien auch als „mutator phenotype“ bezeichnet (Loeb et al. 2001). Das Tumorrisiko der Erkrankten liegt bei 80 bis 90 Prozent (Peltonmäki et al. 2001).

Der oben beschriebene MSI-Phänotyp ist neben dem HNPCC-Syndrom auch bei rund 13 Prozent aller sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinome zu finden. Nach bisherigen Erkenntnissen liegt eine MSI in etwa zehn Prozent der Pankreaskarzinome vor. Die MSI-phänotypischen Tumoren beim HNPCC zeichnen sich nicht nur durch ein charakteristisches molekulargenetisches Profil aus, sondern auch durch besondere histopathologische Merkmale, bevorzugt medullär oder muzinös (Rüschoff et al. 1997; Lynch et al. 1996; Thibodeau et al. 1999; Bren et al. 1999; Aaltonen et al. 2001).

Insgesamt gibt es bisher wenige Studien, die sich mit dem MSI-Phänotyp bei dem Adenokarzinom des Pankreas auseinandergesetzt haben, aber nach den bisherigen Untersuchungen manifestiert sich eine MSI beim Pankreaskarzinom ebenfalls in der histologischen Variante des medullären Typs, grundsätzlich assoziiert mit KRAS-Mutationen (Brentnall et al. 1995; Goggins et al. 1998b; Thibodeau et al. 1998; Wilentz et al. 2000; Yamamoto et al. 2001), während der muzinöse Phänotyp gemäß bisherigen Studien keine MSI aufweist (Goggins et al. 1998; Wilentz et al. 2000; Nakata et al. 2002b; Lüttges et al. 2003).

Des Weiteren wurden in MSI-H-Pankreas-Tumoren Mutationen von hMSH3, hMLH3, BRCA-2, TGF-beta type II Rezeptor und BAX entdeckt (Yamamoto et al. 2001). Zu differenzieren gilt es zwischen dem Auftreten von MSI bei sporadischem Pankreaskarzinom und in Kombination mit HNPCC. Die Prävalenz bei sporadischen Karzinomen wurde in den bisherigen Studien je nach verwendetem Marker mit drei bis 50 Prozent gefunden (Brentnall et al. 1995; Yamamoto et al. 2001). Beim HNPCC-Pankreaskarzinom liegt die Prävalenz deutlich höher mit 100 Prozent (3/3), es stellt aber eine sehr seltene Form erblicher Karzinome dar (Yamamoto et al. 2001). Zur Testung auf Vorliegen eines MSI-Tumors können verschiedene Nukleotidmarker verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde nach dem Standardprotokoll der HNPCC-Bethesda-Kriterien (Sinn et al. 2009) gearbeitet und auf fünf

verschiedene Marker zurückgegriffen (Mononukleotidmarker BAT25 und BAT26 sowie die Dinukleotidmarker D2S123, D17S250 und D5S346). Als MSI-H (high) werden Tumore bezeichnet bei denen eine MSI bei zwei oder mehr der oben genannten Marker vorliegt. MSI-L (low) sind entsprechend Tumore mit nur einem instabilen Marker. MSS (stabil) bezeichnet Tumore, die in keinem der untersuchten Marker Längenveränderungen, also Instabilitäten, aufweisen.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Für die vorliegende Arbeit wurden Tumorgewebe und Normalgewebe von zunächst 48 Patienten mit einem pathologisch gesichertem duktalem Adenokarzinom des Pankreas analysiert (das Gewebe wurde freundlicherweise durch Prof. Dr. med. Udo Helmchen zur Verfügung gestellt). Die entsprechenden klinischen und pathologischen Daten zu diesen Patienten wurden im Rahmen einer früheren Studie erhoben (Stoecklein et al. 2004) und für diese Promotionsarbeit anonymisiert verwendet. Von den 48 Patienten waren 22 weiblich und 26 männlich. Da bei einigen Tumorpräparaten für die DNA-Gewinnung das Material nicht ausreichend war, standen von den 48 Tumorproben nur 37 Proben für die Analysen dieser vorliegenden Arbeit zur Verfügung (gültige n = 37). Tabelle 6 zeigt eine Aufstellung dieser Patientendaten bezüglich Geschlecht und Alter, das jeweilige Tumorstaging, sowie den jeweiligen Ploidiestatus (D=diploid; T=triploid; H= hypertetraploid).

Fall	Geschlecht	Alter (OP)	pT	pN	pM	G	D	T	H
2B1	w	60	2	0	0	3	1	0	0
1D5	m	57	3	1	0	2	1	0	0
2F2	w	68	2	0	0	3	1	0	0
2D4	m	58	3	0	0	2	0	1	0
1B4	m	45	2	0	0	2	0	1	0
2E1	w	46	3	1	0	3	0	1	0
2C1	m	69	2	0	0	2	0	1	0
1F1	w	54	3	1	0	3	1	0	0
1E1	w	63	3	0	0	2	0	0	1
1C1	m	69	3	0	0	2	1	0	0
2B4	m	49	2	0	0	2	1	0	0
2E2	w	48	2	1	0	3	1	0	0
1F3	w	80	2	0	0	3	1	0	0
2B2	w	33	2	1	0	3	0	1	0

Fall(E-Nr.)	Geschlecht	Alter (OP)	pT	pN	pM	G	D	T	H
2E4	m	50	3	1	0	3	0	1	0
1C2	m	60	2	1	0	2	0	0	1
2F1	m	53	3	1	0	2	1	0	0
2F3	m	33	3	0	0	3	0	1	0
2C2	m	47	3	1	0	2	0	1	0
1D3	m	56	3	1	0	3	1	0	0
1B1	w	43	3	1	0	3	1	0	0
1F2	m	75	3	1	0	2	0	1	0
1B5	m	57	2	1	0	3	1	0	0
1D4	w	53	2	0	0	3	0	1	0
1C4	w	47	2	0	0	2	1	0	0
2D2	w	53	2	0	0	3	1	0	0
1E2	m	75	2	1	0	2	1	0	0
1C5	w	59	3	0	0	3	1	0	0
2D3	m	66	3	1	0	3	0	1	0
1C3	w	49	3	1	0	2	0	1	0
1B3	m	61	3	1	0	2	0	1	0
1D1	w	58	2	0	0	2	0	0	1
1E4	m	60	2	1	0	2	1	0	0
1E3	w	69	3	1	1	3	1	0	0
1E5	m	63	3	1	1	3	1	0	0
1F4	w	73	2	0	1	3	0	1	0
1F5	w	64	2	0	1	3	0	1	0

Tabelle 6: Patientendaten; Infiltrationstiefe bzw. Ausdehnung des Tumors (pT Kategorie), Lymphknotenbefall (pN-Kategorie), Metastasen (pM Kategorie), Differenzierungsgrad der Tumoren (Grading), D=diploid, T=triploid, H=hypertetraploid

2.2 Histopathologische Untersuchung

Vor der weiteren Verarbeitung der Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden zunächst von jedem Block Schnitte angefertigt und eine Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE) (Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Diese Schnitte wurden von einem Pathologen (Prof. Dr. med. Poremba, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) begutachtet. Hierbei wurden die Tumorareale eingezeichnet. Ein Anteil an Tumorzellen wurde auf diese Weise sichergestellt. Demnach konnte von jedem Patienten sowohl vom Tumor- als auch vom Normalgewebe ein geeigneter Paraffinblock ausgewählt werden. Von jedem Block wurden ein 4 μm -Schnitt und jeweils zehn 8 μm -Schnitte angefertigt. Die 8 μm -Schnitte wurden für die manuelle Mikrodisektion asserviert.

2.3 Manuelle Mikrodisektion

Für die DNA-Gewinnung wurden die bereits angefertigten 8 μm -Schnitte verwendet. Von jedem Patienten lagen also zehn 8 μm -Schnitte Normalgewebe und zehn 8 μm -Schnitte Tumorgewebe vor. Diese Schnitte wurden zunächst zweimal für 15 Minuten in Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe bis zu 70-prozentigem Alkohol (Merck, Darmstadt, Deutschland) entparaffiniert. Die entparaffinierten Schnitte wurden für 30 Sekunden in Gills-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt und anschließend in AquaB (Braun, Melsungen, Deutschland) überführt.

Um sowohl vom Normal- als auch vom jeweiligen Tumorgewebe möglichst hohe DNA-Gehalte zu erzielen, wurden die ausgewählten Areale aller zehn Schnitte einer Probe mithilfe des HE-Schnittes als Schablone und unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Kanüle abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Daraus ergaben sich für jeden Patienten jeweils ein Reaktionsgefäß mit abgekratztem Gewebe der zehn Tumorschnitte und ein Reaktionsgefäß mit dem Gewebe der zehn Normalgewebsschnitte. Die abgekratzten Objektträger wurden verschlossen und als Kontrolle aufbewahrt.

2.4 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp-Tissue-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dazu wurden die bereits angefertigten Tubes mit dem enthaltenen Gewebe mit 220 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (25 mg/ml) versetzt und für 24 Stunden bei 55 °C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde das lysierte Gewebe über das Säulensystem des Tissue-Kits mit AL-Puffer und dem Waschpuffer (AW-Puffer) aufgereinigt. Die DNA wurde bei 70 °C mithilfe von Nuklease-freiem Wasser im letzten Schritt aus den Säulen gewaschen und somit gleichzeitig in diesem gelöst. Reinheit und Konzentration der DNA wurden durch Messung mit einem Photometer geprüft und dokumentiert (s. Tabelle 14).

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur MSI-Detektion

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifizierung der gewünschten DNA-Fragmente, um diese im Bereich der jeweils untersuchten Marker auf MSI beurteilen zu können. Es wurde nach dem Standardprotokoll HNPCC-Bethesda vorgegangen (Sinn et al. 2009). Dabei wurden die Reagenzien des DNA-Polymerase-Kits der Firma Qiagen verwendet und jeweils eine Duplex PCR sowie eine Triplex PCR durchgeführt. In der Duplex PCR kamen die Primer BAT 25 und D17S250 und in der Triplex PCR die Primer BAT26, D2S123 und D5S346 zum Einsatz. Die Primer wurden entsprechend dem Protokoll bei der Firma MWG bestellt und dort synthetisiert. Jedem Reaktionsansatz wurden 2 µl DNA (10 ng/µl) zugegeben. Zusätzlich wurden bei jeder PCR eine Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser) und eine Positivkontrolle mitgeführt. Für die PCR wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt: fünfzehnminütige Denaturierungsphase bei 95 °C, anschließend 35 Zyklen mit jeweils einer Minute bei 94 °C, Annealingphase eine Minute bei 52 °C, einminütige Elongationsphase bei 72 °C und erweiterte Elongationsphase für 15 Minuten bei 72 °C. Nach Abschluss der letzten Phase bzw. des letzten Zyklus wurden die PCR-Produkte eingefroren, um sie später für die Mikrosatellitenanalyse weiterzuverwenden. Tabelle 7 enthält Informationen und Ergebnisse zum Erfolg der PCR.

Primer	Produktgröße
BAT 25	80–100 bp
BAT 26	80–100 bp
D2S123	197–227 bp
D17S250	150 bp
D5S346	96–122 bp

Tabelle 7: Produktgröße der DNA-Fragmente

2.6 PCR-Kontrolle mittels Gelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese wurde sichergestellt, dass die PCR-Produkte die korrekte Größe hatten (s. Tabelle 7). Das Gel wurde aus 2 g Agarose-Pulver (Invitrogen, Paisley, UK) und 100 ml TBS-Puffer (pH 8,3) hergestellt. 10 µl des PCR-Produkts wurden bei Raumtemperatur in ein Reagenztube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Diesem Tube wurden zusätzlich jeweils 1 µl Cybr-Gold (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und 2 µl Loading Dye Solution (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) zugeführt. Anschließend wurde die Mischung in die vorgesehene Kammer des Agarosegels pipettiert. Eine Positiv- und eine Negativkontrolle wurden jeweils mitgeführt. Die Kontrolle erfolgte unter UV-Licht und wurde durch eine Fotografie des Gels sichergestellt (s. Abbildung 1).

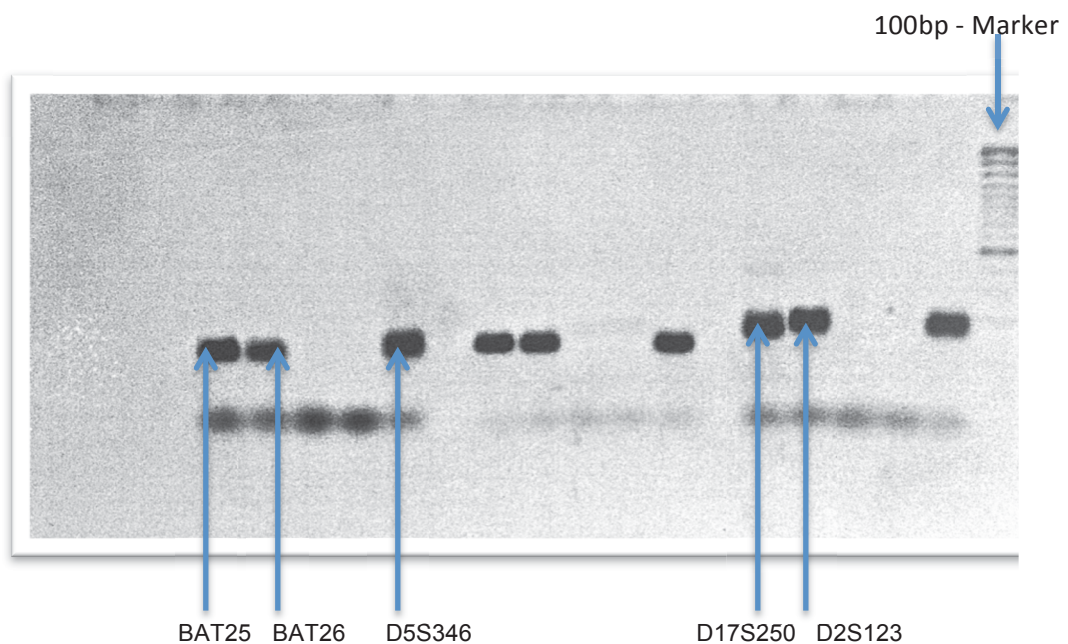


Abbildung 1: Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Produktlänge

2.7 Mikrosatellitenanalyse

Die amplifizierte DNA wurde hierfür auf dem Sequenziergerät („Genetic Analyzer ABI Prism 310“, Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland) analysiert. Dazu wurden je 1 µl PCR-Produkt mit 1 µl molekularem Marker TAMRA-500 (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland) und 12 µl Denaturierungsreagenz HI-Di Formamide (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland) versetzt und zur vollständigen Denaturierung der DNA für fünf Minuten bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Die Primersequenzen und Eigenschaften werden in untenstehender Tabelle 8 dargestellt. Vorwärtsprimer wurden mit Phosphoramidites 6-FAM (6-carboxyfluorescein), HEX (4,7,2', 4', 5',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein) und TET (4,7,2',7'-tetrachloro-6-carboxyfluorescein) fluoreszenzmarkiert.

Danach wurden die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese auf einer Polymermatrix der Größe nach aufgetrennt und durch Anregung mit Laserlicht detektiert. Länge der PCR-Produkte und Höhe der Signale („Peaks“) wurden anschließend mit dem entsprechenden Datenverarbeitungsprogramm Genescan (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland) analysiert und in Form von Elektropherogrammen dargestellt. Durch das Erscheinen neuer Banden, das Fehlen von Banden oder durch einen Bandenshift in der Tumor-DNA wurden genetische Instabilitäten kenntlich. Entsprechend dem international empfohlenen Bethesda-Markerpanel wurden fünf verschiedene Mikrosatellitenmarker untersucht: BAT 25, BAT 26, D2S123, D5S346, und D17S250 (s. Tabelle 8). Findet sich bei zwei oder mehr Markern ($\geq 40\%$) eine Längendifferenz zwischen gesundem und Tumorgewebe, spricht man von MSI. Zusätzlich lässt sich im Bereich der untersuchten Genorte ein möglicher Verlust der Heterozygotie (LOH) analysieren. Ein LOH wird als Umkehr der Peakhöhe bzw. Verlust von Signalen im Tumorgewebe im Vergleich zur DNA des Normalgewebes definiert.

Marker	Primer	Annealing (°C)	Modifizierung am 3'-Ende
BAT 25	5'tcgctccaagaatgtaagt 5'tctgcattttaactatggctc	55	FAM
BAT 26	5'tgactacttttgacttcagcc 5'aaccattcaacattttaacce	55	TET
D2S123	5'aaacaggatgcctgccttta 5'ggactttccacctatgggac	58	FAM
D17S250	5'ggaagaatcaaatagacaat 5'gctggccatataatattaaacc	55	TET
D5S346	5'actcactctagtataaatcggg 5'agcagataagacagtattactagtt	58	HEX

Tabelle 8: Untersuchte Mikrosatelliten-Loci

2.8 Tissue-Micro-Array (TMA)

2.8.1 Präparation der TMA

Zur Untersuchung der Gewebe wurde die Tissue-Micro-Array-Methode angewandt. Die Hämatoxylin-Eosin-Schnitte (HE) der Paraffinblöcke wurden durch einen Pathologen (Prof. Dr. med. Poremba, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) beurteilt. Unter mikroskopischer Kontrolle (Axioskop, Zeiss, Germany) wurde das jeweilige Tumorareal farblich auf dem Objektträger markiert und umrandet. Diese Markierungen dienten später als Schablone für das korrekte Ansetzen der Stanze. Mithilfe des Arrayers wurde zuerst aus dem gewebefreien Paraffinblock, dem so genannten Leerbloc oder Recipient-Block, eine Stanze entnommen. Dieser Schritt entspricht dem eines Platzhalters. Im nachfolgenden Arbeitsschritt wird eine Stanze derselben Größe aus dem zuvor farblich markierten Tumorareal des Donor-Blocks entnommen und in den Platzhalter des Recipient-Blocks überführt. Um möglichst viel Material beim Schneiden des TMA zu gewinnen, wurde überschüssiges Paraffin aus der Stanzsäule mit einem Skalpell entfernt und dieser Geweberest zusätzlich in das vorgestanzte Loch des Recipient-Blocks bis zu dessen vollständiger Füllung mit dem jeweiligen Tumorgewebe eingeführt.

Diese Schritte wurden für alle Proben wiederholt. Die Stanzen auf dem Recipient-Block wurden so gewählt, dass am Ende fünf Reihen mit jeweils sechs Proben vorlagen. Auf diese Weise entstanden zwei Tissue-Micro-Array-Blöcke. Von jedem der Blöcke wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Pro TMA-Block wurde jeweils bei einem der Schnitte eine HE-Färbung durchgeführt, die als Kontrollfärbung für den tatsächlichen Tumorbereich diente. Zwei weitere Schnitte pro Block galten der späteren Verwendung für die immunhistochemischen Färbungen.

2.8.2 Immunhistochemische Analyse

Die immunhistochemische Analyse der Tissue-Micro-Array wurde in Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. med. H.E. Gabbert) durchgeführt. Dabei wurde die Proteinexpression der Gene hMLH1 und hMSH2 mithilfe markierter Antikörper untersucht.

Die zuvor angefertigten Paraffinschnitte der Tissue-Micro-Array wurden über Nacht bei 60 °C inkubiert, dann mit Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Dann wurden die Objektträger für 15 Minuten in Zitratpuffer gekocht. Nach Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität mit drei prozentigem Wasserstoffperoxid wurden die Präparate zunächst 15 Minuten mit Avidin und 15 Minuten mit Biotin inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert: hMLH1 (clone G 168-728, BD PharMingen, San Diego, CA, USA; 1:60), hMSH2 16 (clone FE11, Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA; 1:80). Nach kurzem Waschen mit Aqua dest. wurden die Präparate mit dem zweiten und dritten Brückenantikörper (Ultra-Tek HRP Scytek ABN/ABL 999) für je 15 Minuten bei Raumtemperatur überschichtet.

Die Antigen-Antikörper-Reaktion wurde dann mittels Diaminobenzidintetrachlorid (DAB) visualisiert. Nach der zehnmütigen Inkubation mit DAB folgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun für fünf Minuten. Die Schnitte mussten dann mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert werden. Die angefärbten (also exprimierenden) Zellen wurden unter dem Mikroskop (Axioskop, Zeiss, Deutschland) sichtbar, sodass eine prozentuale Aussage über Expression gegenüber Expressionsausfall getroffen werden konnte.

2.8.3 Auswertung der Expression von MLH1 und MSH2

Mittels der Immunhistochemie ist das Genprodukt der Mismatch-Repair-Gene (hMLH1, hMSH2) nachweisbar. Bei positiver Expression kommt es bei den MMR-Genen zur Zellkernfärbung der Tumorzellen. Das Weglassen des Primärantikörpers diente als Negativkontrolle. Die Auswertung der Immunfärbung der MMR-Gene wurde qualitativ (positive/fehlende Expression) vorgenommen. Die Beurteilung der Färbe- und Schnittqualität erfolgte zuerst mittels lichtmikroskopischer Übersichtseinstellung des Tumors und im Vergleich mit dem Normalgewebe des Pankreas anhand eines Scores zwischen 0 und 3. Dabei wurden die Expressionsstärken 3 und 2 als erhaltene Expression und ein Verlust von mehr als 50 Prozent in einer der beiden Kategorien 0 und 1 als negativ gewertet. Ausgewertet wurden nur Bereiche mit gleichmäßiger Färbung, da ungleich starke Farbreaktionen im Tumorzentrum und in dessen Randbereichen die Beurteilung erschwerten.

Alle Schnitte wurden ebenfalls von einem Pathologen lichtmikroskopisch begutachtet und ausgewertet. Die Beurteilung der immunhistochemischen Schnitte erfolgte jeweils ohne Kenntnis der Klinik des Patienten und der histopathologischen Tumordaten. Eine detaillierte Übersicht über die Gradeinteilung zeigt Tabelle 9.

Gradeinteilung	Proteinexpression der Gene MLH1 und MSH2 im Tumor
0	keine (neg)
1	schwach (neg)
2	mäßig (pos)
3	stark (pos)

Tabelle 9: Score der MLH1- und MSH2-Expression

2.8.4 Puffer

TBE (Tris-Borat-EDTA Puffer)	Tris	89mM
	Borat	89mM
	EDTA	2mM
	pH	8,3

Tabelle 10: Verwendete Puffer

2.8.5 Primer

BAT 26-F	TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC
BAT 26-R	AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C
BAT 25-F	TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT
BAT 25-R	TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC
D2S123-F	AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA
D2S123-R	GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC
D17S250-F	GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT
D17S250-R	GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC
D5S346-F	ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG
D5S346-R	AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T

Tabelle 11: Verwendete Primer (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland)

2.9 Statistische Methodik

Vorab wurden sämtliche graduierten und kontinuierlichen Variablen bzw. Parameter der Studie, prozentuale Expressionsverluste von MLH1 und MSH2 mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest (K-S-Test) auf Übereinstimmung mit der Normalverteilung nach Gauß getestet.

Die Verteilungen der Expressionsverluste (originäre Prozentwerte) von MLH1 und MSH2 erwiesen sich als nicht kompatibel mit der Normalverteilung ($p \leq 0.10$). Als Konsequenz wurden die Zusammenhänge zwischen MSI bzw. LOH einerseits und MLH1- bzw. MSH2-Expressionsverlusten (Prozentwerte) andererseits mittels einer „verteilungsfreien“ Testmethodik berechnet. Im Einzelnen wurde hier der Mann-Whitney-U-Test (M-W-Test/U-Test) eingesetzt, welcher eine sehr teststarke Alternative zum parametrischen t-Test darstellt. (www.roland-pfister.net Methoden der Unterschiedsprüfung)

Sämtliche Zusammenhänge zwischen zweikategoriellen Nominalvariablen (z.B. zwischen MSI ja/nein und MLH1-Expressionsverlust $>/\leq 50$ Prozent, oder zwischen MSI ja/nein und diploider Zellstatus ja/nein etc.) wurden mittels zweidimensionaler Kontingenztafel dargestellt und mittels exaktem Fisher-Test berechnet. Als deskrip-

tiv-statistische Kennwerte werden absolute und relative bzw. prozentuale Häufigkeiten, arithmetischer Mittelwert nebst Standardabweichung, Median nebst Quartilabstand, Minimum und Maximum sowie die jeweilige Anzahl der gültigen Fälle (Stichprobengröße) tabellarisch berichtet. Sämtliche prüfstatistischen Tests wurden bei zweiseitiger Testung und auf Grundlage des folgenden Signifikanzstufensystems durchgeführt:

„nicht signifikant“: $p > 0.05$ (ns)

„signifikant“: Signifikanzniveau = 5 % bzw. $\alpha = 0.05$ ($p \leq .05$)

„sehr signifikant“: Signifikanzniveau = 1 % bzw. $\alpha = 0.01$ ($p \leq .01$)

„hoch signifikant“: Signifikanzniveau = 1 ‰ bzw. $\alpha = 0.001$ ($p \leq .001$)

Alle statistischen Analysen wurden unter Zugriff auf das Programm SPSS (Superior Performing Software System, IBM SPSS Statistics für Windows) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Die zugrunde liegende Studienstichprobe bestand zu 51,4 Prozent ($n = 19$) aus Männern und 48,6 Prozent ($n = 18$) aus Frauen und galt somit bezüglich des Geschlechts als gleichverteilt. Das mittlere Lebensalter der Patienten betrug 57,8 Jahre bei einer Standardabweichung von $\pm 11,6$ Jahren (Tabelle 12). Die Schwankungsweite des Kollektivs lag zwischen 33 Jahren (Min.) und 82 Jahren (Max.).

Die Altersklassenverteilung hatte ihren Häufigkeitsgipfel mit jeweils circa 30 Prozent bzw. 32 Prozent bei der Gruppe zwischen 50 und 59 Jahren bzw. 60 und 69 Jahren (Abbildung 2; Tabelle 13).

Statistik	Wert
Mittelwert	57,84
Standardabweichung	11,60
Median	58,00
Quartilabstand	18,00
Minimum	33
Maximum	82
Gültige N	37

Tabelle 12: Statistiken der Altersverteilung

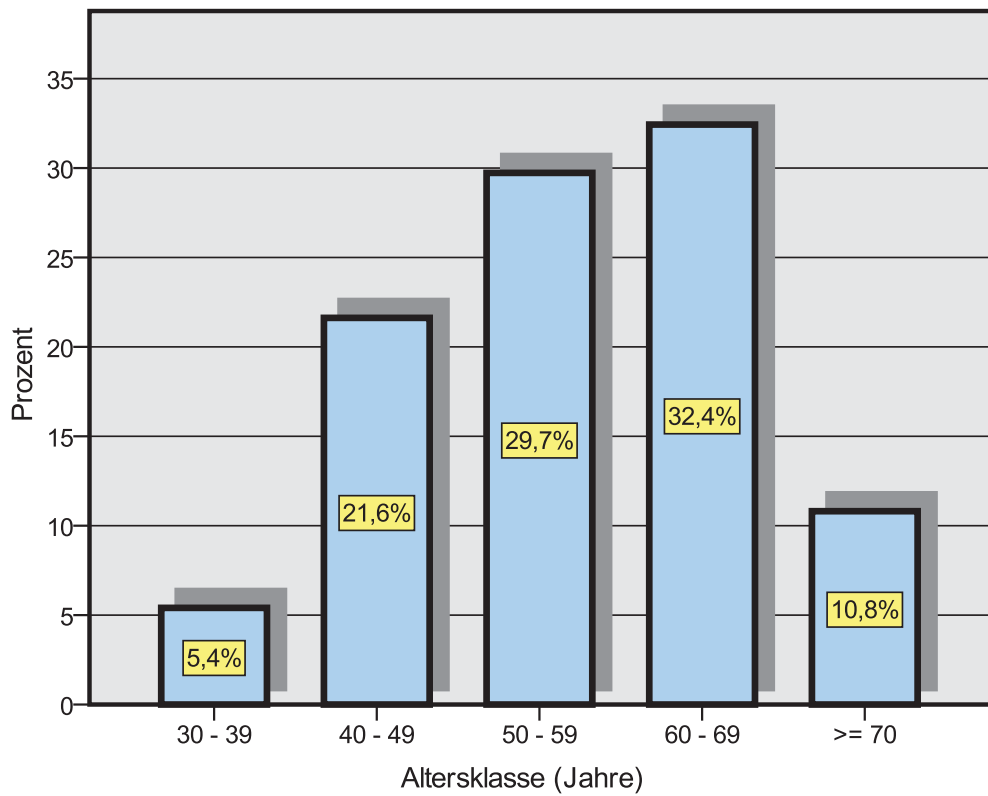


Abbildung 2: Altersklassenverteilung der Patientenstichprobe

Jahre	Häufigkeit	Prozent
30-39	2	5,4
40-49	8	21,6
50-59	11	29,7
60-69	12	32,4
≥70	4	10,8
Gesamt	37	100,0

Tabelle 13: Altersklassenverteilung

3.2 Messergebnisse und Prä-Analysen

3.2.1 Daten zur DNA-Extraktion und zum PCR-Erfolg

Um mit den DNA-Analysen beginnen zu können, wurden zunächst die Reinheit und Konzentration der extrahierten DNA durch Messung mit einem Photometer (Bio Photometer, Eppendorf, Deutschland) geprüft und dokumentiert. Tabelle 14 zeigt den DNA-Gehalt der erhobenen Proben.

Pat.ID	Normal- gewebe dsDNA ng/ μ l	Tumor- gewebe dsDNA ng/ μ l	Pat.ID	Normal- gewebe dsDNA ng/ μ l	Tumor- gewebe dsDNA ng/ μ l
2D4	87	72	1D4	121	90
2E4	76	35	2C1	75	35
1B4	445	27	2E1	282	71
1C1	249	112	2F1	73	27
1E5	106	35	1B1	357	34
2B1	79	84	1C3	214	13
1B5	70	15	2B2	266	36
1F1	157	40	1F2	152	119
2D3	45	30	2E2	259	23
1F5	72	69	1C2	118	163
2F2	204	51	1E2	250	182
1F4	97	33	1D5	214	292
2C2	174	100	1B3	170	8
1E4	54	29	1E1	175	140
2F3	103	35	1D1	54	30
2B4	151	17	1D3	190	93
1C4	324	80	1E3	186	34
1F3	109	139	2D2	104	118
1C5	65	95			

Tabelle 14: DNA-Gehalt der Proben

3.2.2 Prävalenz der Mikrosatelliteninstabilität und Allelverluste

Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse sind in Tabelle 15 aufgeführt. Diese Tabelle zeigt das Auftreten von MSI und LOH - nach Markern differenziert - im Einzelnen bei den 37 Pankreaskarzinomen; darüber hinaus enthält Tabelle 15 die markerspezifisch zusammengefassten Häufigkeiten der beiden Ereignisse.

Bei 29 der 37 Tumoren (78,4 %) war keine MSI nachweisbar. Bei sechs Tumoren (16,2 %) konnte eine MSI mit jeweils einem Marker nachgewiesen werden. Bei zwei Tumoren (5,4 %) fand sich eine MSI in zwei von fünf Markern.

Der Mononukleotidmarker BAT 25 zeigte in vier Fällen (10,8 %) eine MSI und der Marker D17S250 ebenfalls in vier Fällen (10,8 %). Außerdem wies der Marker BAT 26 in zwei Fällen (5,4 %) eine MSI auf.

Allelverluste (LOH) im Bereich der untersuchten Marker konnten bei 21 Proben (56,7 %) gefunden werden, wobei dieses Ereignis in vier Fällen (10,8 %) in Kombination mit einer MSI auftrat. Bei den Markern D2S123 und D5S346 war keine (0 %) MSI nachweisbar; allerdings LOH in insgesamt zwölf Fällen. Bei zwei Tumoren zeigte sich ein LOH gleich bei beiden Markern, so ließ sich insgesamt bei den Markern D2S123 und D5S346 bei zehn von 37 Tumoren (27 %) ein LOH aufzeigen. Auch bei den Markern BAT26 und D17S250 zeigten sich vermehrt Allelverluste. Bei BAT26 fand sich ein LOH bei sechs Tumoren (16,2 %) und bei D17S250 insgesamt bei drei Tumoren (8,1 %).

Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass weder bei dem Marker D2S123 noch bei D5S346 eine MSI auftrat.

Ergebnisse

Patient	BAT 26	D17S250	BAT 25	D2S123	D5S346
1C1	1	1	1	LOH	1
1C3	1	1	MSI	LOH	1
2C1	1	1	1	1	1
1D3	1	1	1	1	1
1B4	1	LOH	1	1	LOH
1E5	LOH	1	1	1	1
1B5	LOH	LOH	1	1	1
1C2	1	1	MSI	1	1
1C4	LOH	1	1	1	1
2D2	LOH	1	1	LOH	LOH
1F1	1	MSI	MSI	1	1
2B1	1	1	1	LOH	1
2D3	1	1	1	1	1
2E2	1	1	1	1	1
2E1	LOH	LOH	1	1	1
1F3	1	1	1	1	1
1D4	1	1	1	1	1
2C2	1	1	1	1	1
2B2	1	MSI	1	1	LOH
1F2	1	1	MSI	1	1
1F5	LOH	1	1	1	LOH
1E3	1	1	1	0	0
1E1	1	0	1	1	1
2F3	1	0	1	1	1
2B4	1	0	1	0	1
1E4	MSI	MSI	1	1	1
1B3	1	MSI	1	LOH	LOH
1C5	1	1	1	1	LOH
2F2	1	1	1	1	1
1F4	1	1	1	1	1
1D1	1	1	1	1	1
2F1	1	1	1	1	1
1D5	1	1	1	1	1
1B1	1	0	1	0	1
2D4	1	0	1	1	1
1E2	1	1	1	1	1
2E4	MSI	1	1	1	LOH

Tabelle 15: Auftreten von MSI und LOH bei 37 Pankreaskarzinomen bei den fünf untersuchten Markern.

MSI: Mikrosatelliteninstabilität; LOH: Loss of Heterozygosity; 0 = keine Analyse im Sequenzer möglich (zu wenig Material); 1 = ohne Veränderung

Locus	Informative Fälle (n)	MSI n (%)	LOH n (%)
BAT 26	37	2 (5)	6 (16)
D17S250	32	4 (12)	3 (9)
BAT 25	37	4 (10)	0 (0)
D2S123	34	0 (0)	5 (14)
D5S346	36	0 (0)	7 (19)

Tabelle 16: Häufigkeiten der Fälle mit MSI und LOH bei den verschiedenen Markern

3.2.3 Daten der Expression der DNA-Reparaturgene hMLH1 und hMSH2

Zunächst wurde die Expression im normalen Pankreasgewebe überprüft um eine Vergleichsmöglichkeit zur Auswertung des Expressionsverlustes im jeweiligen Tumorgewebe zu gewinnen. Anschließend wurde die Expression im Tumorgewebe überprüft. Dabei fand sich bei acht von 37 (21,6 %) der Karzinomproben eine deutliche Reduzierung von mehr als 70 Prozent der MLH1-Proteinexpression, in neun Fällen eine starke Reduzierung der MSH2-Expression von mehr als 70 Prozent. Eine detaillierte Aufstellung zeigt Tabelle 17.

Von den 37 untersuchten Karzinomen fand sich bei elf (29,7 %) Patienten ein mehr als 50-prozentiger Verlust der Expression in einer der beiden Kategorien 0 oder 1 sowohl von MLH1 als auch MSH2. In acht von diesen elf Fällen bei MLH1 (72,7 %) und neun Fällen bei MSH2 (81,8 %) zeigte sich ein Verlust der Expression von größer gleich 80 Prozent (Bereich 0 und 1+) das heißt, dass im Vergleich zu dem jeweiligen Normalgewebe nur noch circa 20 Prozent exprimiert wurden. In Tabelle 17 sind die Daten für die einzelnen Proben aufgeführt. Ein Tumor wurde als negativ beurteilt, wenn ein Verlust von mehr als 50 Prozent in einer der Kategorien 0 oder 1+ verzeichnet wurde. Die Werte der beiden Kategorien wurden hierzu nicht addiert, sondern einzeln betrachtet.

Ergebnisse

Patient	Wertung		MLH1 (in %)				MSH2 (in %)			
	MLH1	MSH2	3+	2+	1+	0	3+	2+	1+	0
2B1	pos	pos	0	70	0	30	10	50	0	40
2C1	pos	pos	80	0	20	0	50	30	0	0
2E1	pos	pos	10	90	0	0	90	10	0	0
2F1	pos	neg	0	80	0	20	0	20	80	0
2B2	neg	pos	40	0	0	60	0	70	0	30
2C2	pos	pos	80	0	20	0	30	30	40	0
2D2	pos	pos	80	0	20	0	60	10	30	0
2E2	pos	pos	0	80	20	0	20	80	0	0
2F2	pos	pos	0	80	20	0	10	80	10	0
2F3	pos	pos	70	30	0	0	60	20	20	0
2D3	pos	pos	80	0	20	0	60	20	20	0
2B4	pos	pos	10	50	0	40	10	40	50	0
1B1	pos	pos	0	50	20	30	0	60	40	0
1C1	neg	neg	10	10	0	80	0	20	0	80
1D1	pos	pos	80	10	10	0	80	20	0	0
1E1	pos	pos	90	10	0	0	90	10	0	0
1F1	neg	neg	0	0	0	100	0	20	0	80
1B3	neg	neg	0	20	0	80	0	0	20	80
1C2	neg	neg	0	0	20	80	0	0	20	80
2E4	pos	pos	80	20	40	0	80	20	0	0
1E2	pos	pos	70	30	0	0	90	10	0	0
1F2	neg	neg	0	0	20	80	0	0	10	90
2D4	pos	pos	0	60	40	0	10	50	40	0
1C3	neg	neg	0	0	10	90	0	0	10	90
1D3	pos	pos	60	40	0	0	40	60	0	0
1E3	pos	pos	70	20	10	0	60	20	20	0
1F3	pos	neg	70	30	0	0	0	20	80	0
1B4	pos	neg	0	50	40	10	0	40	60	0
1C4	pos	pos	30	40	30	0	20	50	30	0
1D4	pos	pos	0	60	40	0	0	50	50	0
1E4	neg	neg	0	0	10	90	0	0	10	90
1F4	neg	pos	0	40	60	0	10	40	50	0
1B5	neg	neg	10	10	80	0	10	30	60	0
1C5	pos	pos	0	60	20	20	40	40	20	0
1D5	pos	pos	60	40	0	0	80	20	0	0
1E5	pos	pos	70	10	20	0	60	10	30	0
1F5	neg	pos	0	40	0	60	0	60	0	40

Tabelle 17: MLH1- u. MSH2-Expression. Gesamtwertung (wenn in einer der beiden Kategorien 0 und 1+ein mehr als 50-prozentiger Verlust auftrat wurde ein Tumor als negativ bewertet (grau hinterlegt)) (gelb hinterlegt: MSI-L; rot hinterlegt MSI-H)

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen diese Daten. Die Abbildung 3a zeigt eine normale Expression von hMLH1 im Pankreasgewebe in der Immunhistochemie. In der Abbildung 3b ist ein deutlicher Expressionsverlust von hMLH1 im Karzinomgewebe zu sehen. Beide Aufnahmen wurden mit dem Mikroskop Leica DM IL und der dazugehörigen Kamera Leica DFC300FX gemacht.

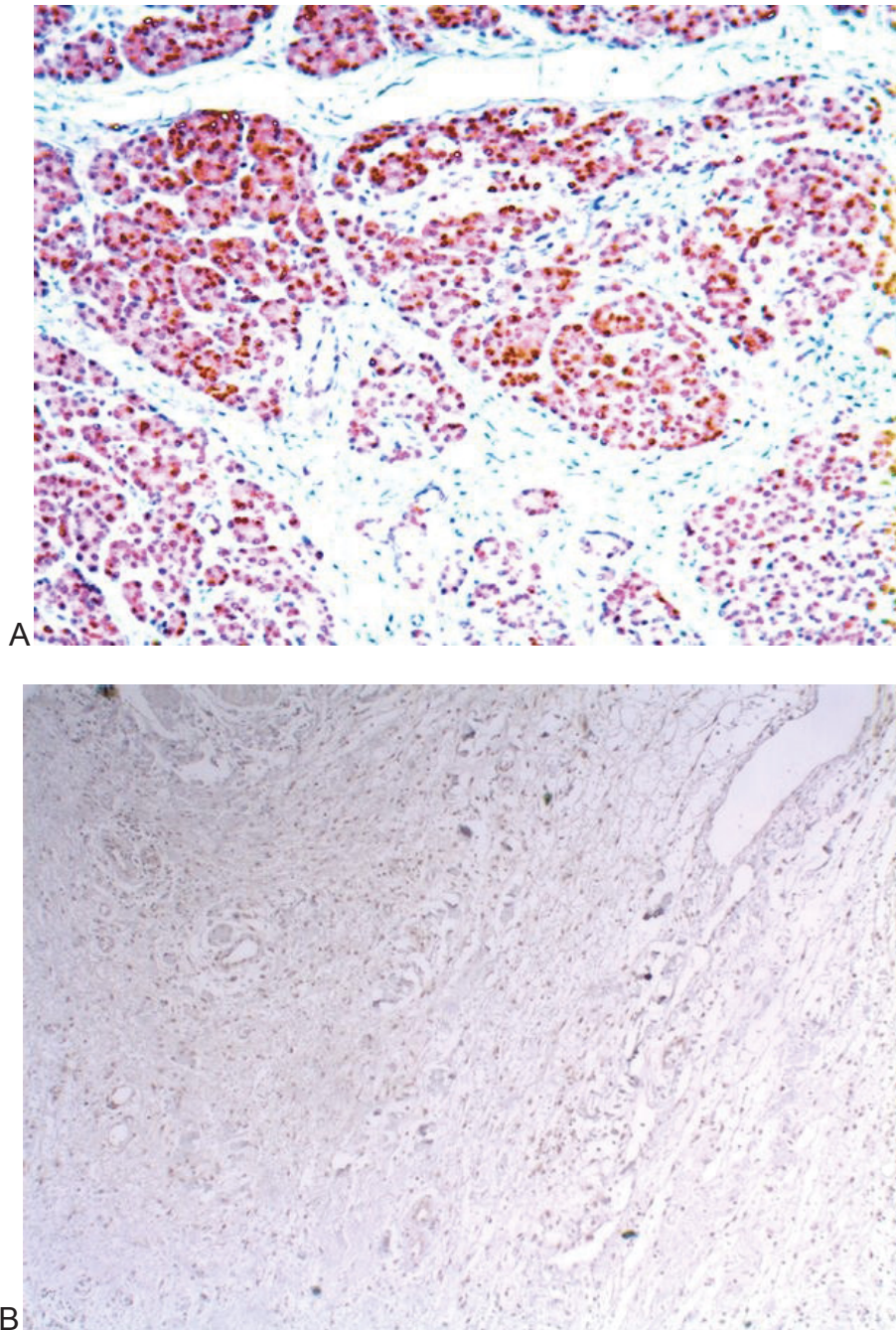


Abbildung 3: A: Immunhistochemie: normale Expression von hMLH1 im Pankreasgewebe (Mikroskop Leica DM IL 200-fache Vergrößerung; (AK: clone G 168-728); B: Immunhistochemie: fehlende Expression von hMLH1 im Karzinomgewebe (Mikroskop Leica DM IL 40-fache Vergrößerung; (AK: clone G 168-728)

3.3 Statistische Auswertung der Korrelation von MSI und anderen Parametern

3.3.1 Zusammenhang von MSI und Expression von MLH1 und MSH2

Innerhalb dieses Abschnittes wurden die untersuchten Parameter MSI(0), MSI(1), MSI(2) sowie die Expressionsverluste von MLH1 und MSH2 zur Überprüfung einer möglichen Korrelation untereinander prüfstatisch analysiert.

Diese Parameter sowie die zugehörigen zentralen Daten sind für die Gesamtstichprobe in der Tabelle 18 zusammengefasst.

Variable / Parameter	Häufigkeit (n von 37)	Prozent
MSI (0)	29	78,38
MSI (1)	6	16,22
MSI (2)	2	5,41
MLH1 Expressionsverlust >50%	11	29,73
MSH2 Expressionsverlust >50%	11	29,73

Tabelle 18: Verteilung untersuchter Größen

Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MSI (eine MSI (MSI(1) / zwei MSI(MSI(2) / MSI gesamt) und einem substanziellen, sprich mehr als 50-prozentigem, Verlust an MLH1- bzw. MSH2-Expression auf Signifikanz (Chi-Quadrat-Test) getestet (siehe Tabelle 19 bis 24).

Ergebnisse

MSI (1)	Statistik	MLH1-Verlust		Gesamt
		nein	ja	
nein	Anzahl	25	6	31
	Prozent	80,6 %	19,4 %	100,0 %
ja	Anzahl	1	5	6
	Prozent	16,7 %	83,3 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	26	11	37
	Prozent	70,3 %	29,7 %	100,0 %

Chi-Quadrat: 9,85; p = 0.002 (Exakter Fisher-Test)

Tabelle 19: Zusammenhang zwischen MSI (1) und MLH1-Verlust (> 50%)

MSI(2)	Statistik	MLH1-Verlust		Gesamt
		nein	ja	
nein	Anzahl	26	9	35
	Prozent	74,3 %	25,7 %	100,0 %
ja	Anzahl	0	2	2
	Prozent	,0 %	100,0 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	26	11	37
	Prozent	70,3 %	29,7 %	100,0 %

Chi-Quadrat: 5,00; p = 0.083 (Exakter Fisher-Test) Phi = 0,37

Tabelle 20: Zusammenhang zwischen MSI (2) und MLH1-Verlust (> 50%)

Ergebnisse

MSI (1)	Statistik	MSH2-Verlust		Gesamt
		nein	ja	
nein	Anzahl	24	7	31
	Prozent	77,4 %	22,6 %	100,0 %
ja	Anzahl	2	4	6
	Prozent	33,3 %	66,7 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	26	11	37
	Prozent	70,3 %	29,7 %	100,0 %

Chi-Quadrat: 4,68; p = 0.050 (Exakter Fisher-Test) Phi = 0,36

Tabelle 21: Zusammenhang zwischen MSI (1) und MSH2-Verlust (> 50%)

MSI (2)	Statistik	MSH2-Verlust		Gesamt
		nein	ja	
nein	Anzahl	26	9	35
	Prozent	74,3 %	25,7 %	100,0 %
ja	Anzahl	0	2	2
	Prozent	0 %	100,0 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	26	11	37
	Prozent	70,3 %	29,7 %	100,0 %

Chi-Quadrat: 5,00; p = 0.083 (Exakter Fisher-Test) Phi = 0,37

Tabelle 22: Zusammenhang zwischen MSI (2) und MSH2-Verlust (> 50%)

Bei den fünf untersuchten Markern ging somit das Auftreten eines einzelnen MSI-Ereignisses (MSI(1)) gegenüber der Bedingung MSI (0) mit einer sehr signifikant größeren Anzahl von MLH1-Expressionsverlusten (83,3 % versus 19,4 %; p = 0.002) sowie einem signifikanten Expressionsverlust von hMSH2 (66,7%, p = 0,05) einher (siehe Tabellen 19 und 20).

Mit dem Auftreten von MSI(2) stand ein nicht signifikanter vollständiger MLH1- und MSH2-Verlust in Zusammenhang (100 %; $p = 0.083$) (siehe Tabellen 21 und 22).

In einem weiteren Analyseschritt wurden die Unterschiede zwischen den Bedingungen „MSI ja“ (MSI(1), MSI(2) versus „MSI nein“ (MSI(0)) hinsichtlich der exakten prozentualen Expressionsverluste (MLH1, MSH2) auf Signifikanz geprüft (Tabelle 23 bis 24).

Kontrast/ Vergleich	Prüfstatistik	Expression	
		MLH1	MSH2
MSI(1) vs. MSI(0)	Mann-Whitney-U	25,50	22,00
	Z	-2,97	-3,12
	Signifikanz	0,003**	0,002**
MSI(2) vs. MSI(0)	Mann-Whitney-U	0,50	6,00
	Z	-2,47	-2,08
	Signifikanz	0,013*	0,038*

Tabelle 23: Mann-Whitney-U-Test auf Expressionsunterschied zwischen „MSI ja“ und „MSI nein“

Expression	Statistik	MSI-nein	MSI-ja	
		MSI (0)	MSI (1)	MSI (2)
MLH1	Mittelwert	17,93	71,67	95,00
	Standardabweichung	27,44	18,35	7,07
	Median	0,00	80,00	95,00
	Quartilabstand	40,00	20,00	10,00
	Minimum	0	40	90
	Maximum	80	90	100
	Gültige N	29	6	2
MSH2	Mittelwert	18,28	71,67	85,00
	Standardabweichung	27,53	25,63	7,07
	Median	0,00	85,00	85,00
	Quartilabstand	30,00	40,00	10,00
	Minimum	0	30	80
	Maximum	80	90	90
	Gültige N	29	6	2

Tabelle 24: Deskriptive Statistiken zu dem Mann-Whitney-U-Test zu unterschiedlichem Expressionsverlust auf „MSI ja“ versus „MSI nein“ (bezogen auf Tabelle 20)

Hier traten zusammenfassend bei allen drei Vergleichen signifikante bis hoch signifikante Differenzen des Expressionsverlustes auf, wobei „MSI ja“ versus „MSI nein“ jeweils mit einem höheren prozentualen Verlust einhergingen. Diese Feststellungen galten sowohl bezüglich MLH1 als auch MSH2. Im Einzelnen betrug bezüglich des arithmetischen Mittelwertes der Prozentwertunterschied zwischen MSI(0) versus MSI(1) 49 Prozent (MLH1) bzw. 49 Prozent (MSH2), zwischen MSI(0) versus MSI(2) 68 Prozent (MLH1) bzw. 58 Prozent (MSH2). Die höchste durchschnittliche Verlustrate der Expression von MLH1 und auch MSH2 wurde bei dem Vorkommen von MSI(2) (MLH1: 95 Prozent, MSH2: 85 Prozent) beobachtet.

3.3.2 Zusammenhang von MSI und Ploidie-Status

Im Folgenden wurde der Zusammenhang zwischen „MSI ja“ (MSI(1), MSI(2) und jeweils einem spezifischen Ploidiestatus (diploid, triploid, hypertetraploid) analysiert. Diesbezüglich wurden sämtliche Variablenkombinationen berechnet. Im Folgenden werden aber ausschließlich die signifikanten Ergebnisse tabellarisch dargestellt (Tabelle 25 und 26).

MSI (1)	Statistik	diploid		Gesamt
		nein	ja	
nein	Anzahl	12	19	31
	Prozent	38,7 %	61,3 %	100,0 %
ja	Anzahl	6	0	6
	Prozent	100,0 %	0 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	18	19	37
	Prozent	48,6 %	51,4 %	100,0 %

Chi-Quadrat: 7,56; p = 0.008 (Exakter Fisher-Test) Phi = -0,40

Tabelle 25: Zusammenhang zwischen MSI(1) und Ploidiestatus diploid

MSI (gesamt)	Statistik	diploid		Gesamt
		nein	ja	
nein	Anzahl	11	18	29
	Prozent	37,9 %	62,1 %	100,0 %
ja	Anzahl	6	2	8
	Prozent	75 %	25 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	18	19	37
	Prozent	48,6 %	51,4 %	100,0 %

Chi-Quadrat: 6,17; p = 0.019 (Exakter Fisher-Test) Phi = -0,41

Tabelle 26: Zusammenhang zwischen MSI(2) und Ploidiestatus diploid

Zwei (100 %) der MSI(2)-Tumoren zeigten einen diploiden Chromosomensatz (Tabelle 6). Grundsätzlich findet sich jeweils ein höherer Prozentanteil von Tumoren mit diploidem Zellstatus bei den MSS-Tumoren (eine MSI: 0 % (MSI) vs. 61,3 % (keine MSI); MSI generell/gesamt: 25 % (MSI) vs. 62,1 % (keine MSI)), (siehe Tabelle 26).

3.4 Zusätzliche Analysen

Als zusätzliche, sekundäre Analysen wurden insbesondere die Zusammenhänge (a) zwischen MSI und LOH, (b) zwischen LOH und Ploidiestatus sowie (c) zwischen LOH und MLH1- bzw. MSH2-Expressionsverlust nach Fishers exaktem Test berechnet, woraus kein signifikantes Ergebnis resultierte.

3.5 Fallbeschreibung der MSI-Fälle

Von den 37 vollständig untersuchten Patienten mit gesichertem duktalem Adenokarzinom des Pankreas wiesen nur zwei Fälle eine MSI-H (mindestens zwei von fünf Markern MSI) auf.

Dabei handelte es sich zum einen um eine damals 54-jährige Patientin (1F1) mit einem Tumor nach TNM-Klassifikation: pT3, pN1, pM0, pG3. Bei der Untersuchung der Ploidie mittels chromogener in situ Hybridisierung wies der Tumor einen diploiden Chromosomensatz auf. Die Längenveränderungen waren bei den Markern D17S250 und BAT25 zu finden (siehe Abbildungen 4 und 5). Nach zunächst primär kurativer Therapie mit R0-Resektion erlitt die Patientin im weiteren Krankheitsverlauf ein Tumorrezidiv und verstarb elf Monate nach Primäreingriff.

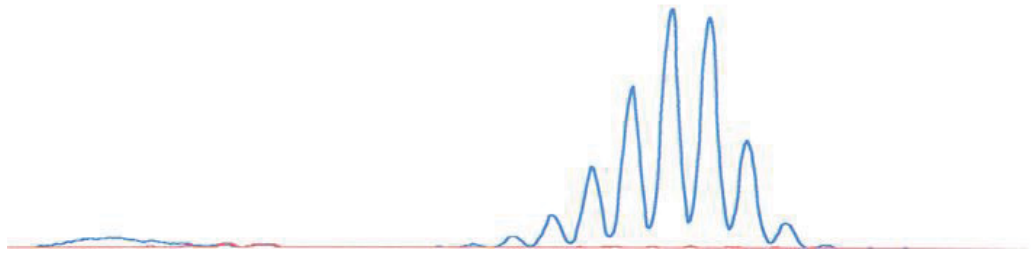
Des Weiteren handelte es sich um einen männlichen 60-jährigen Patienten (1E4) mit einem Tumor nach TNM-Klassifikation: pT2, pN1, pM0, pG2.

Die Längenveränderungen waren an den Mikrosatelliten-Markern BAT26 und ebenfalls D17S250 zu finden (siehe Abbildungen 6 und 7). Bei der Untersuchung des Ploidiestatus fand sich auch hier ein diploider Chromosomensatz. Der Mann überlebte 23 Monate postoperativ.

In den folgenden Abbildungen sind die jeweiligen Elektropherogramme der entsprechenden Patienten zusammen mit einer mikrosatellitenstabilen (MSS-) Kontrolle dargestellt.

Die Abbildungen 4A, 5A, 6A und 7A zeigen jeweils das Elektropherogramm des Normalgewebes, die Abbildungen 4B, 5B, 6B und 7B jeweils die des Tumorgewebes. Durch die Längenänderung (Peaks) im Vergleich von Normal- zu Tumorgewebe wird eine MSI ersichtlich.

A



B

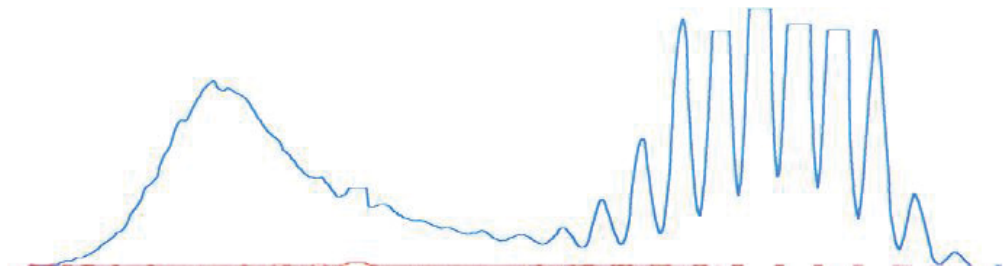
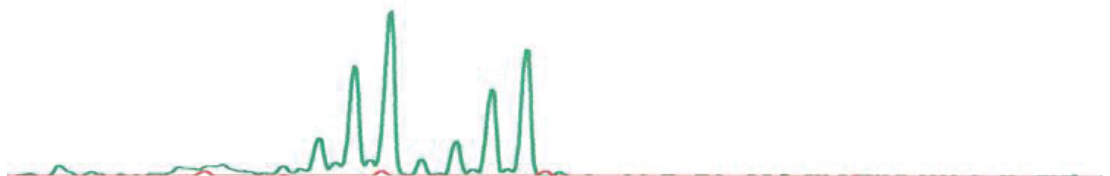


Abbildung 4: Elektropherogramme des Markers D17S250 des Patienten 1F1

Abbildung A: Normalgewebe

Abbildung B: Tumorgewebe

A



B

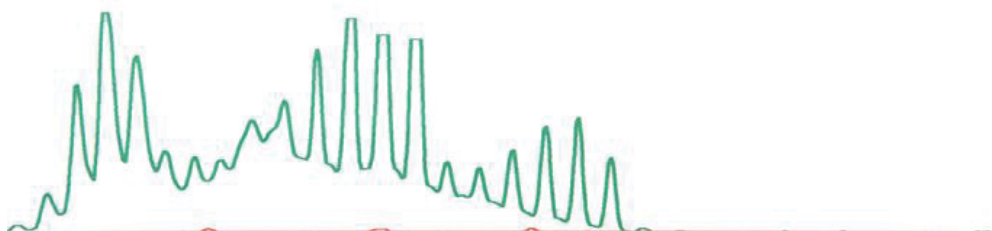
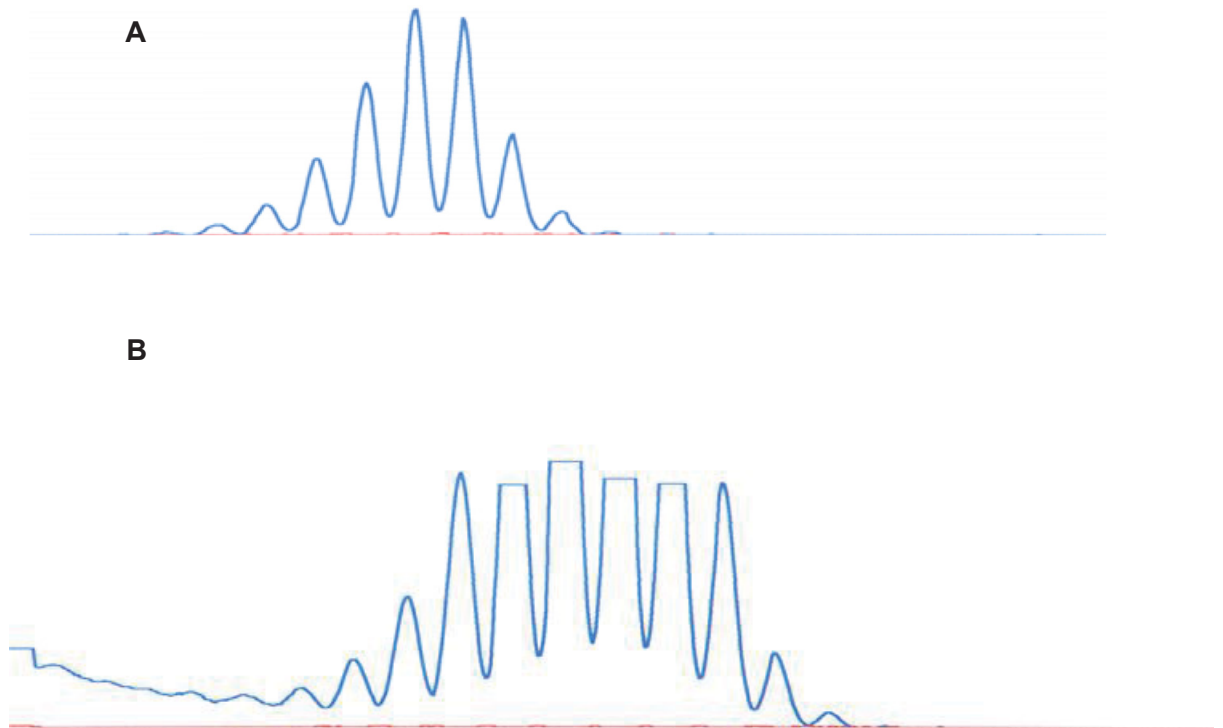


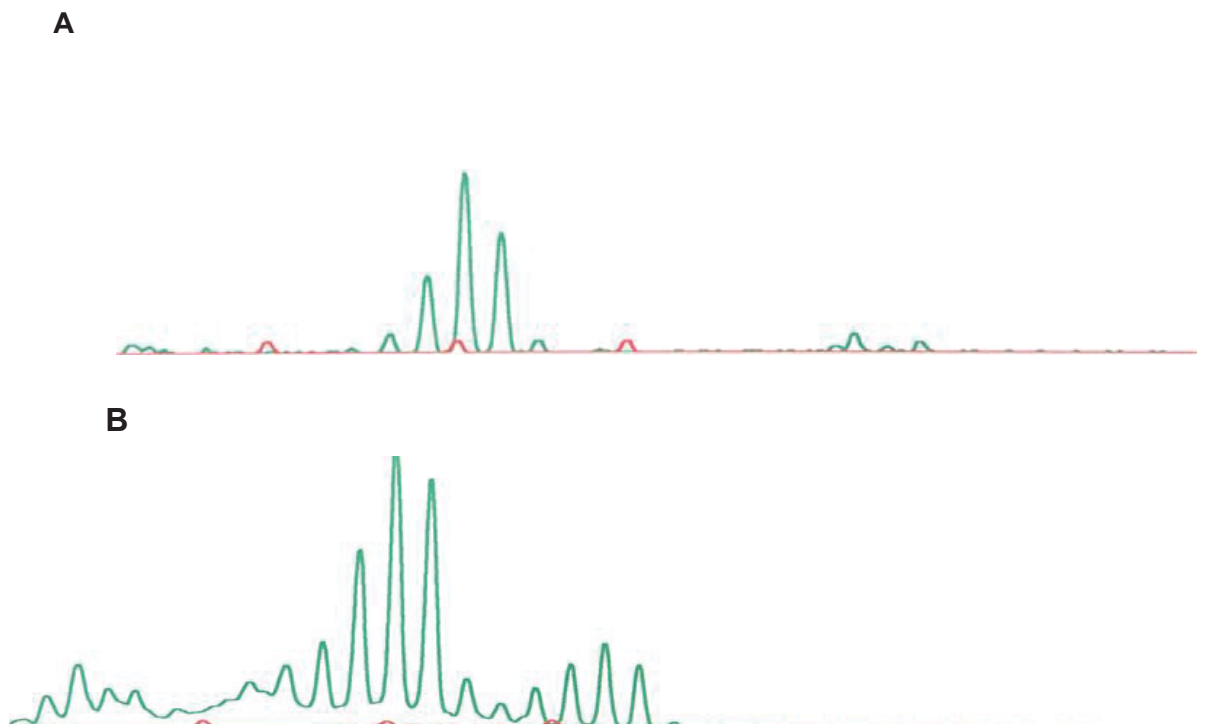
Abbildung 5: Elektropherogramme des Markers BAT25 des Patienten 1F1

Abbildung A: Normalgewebe

Abbildung B: Tumorgewebe



*Abbildung 6: Elektropherogramm des Markers D17S250 des Patienten 1E4
Abbildung A: Normalgewebe Abbildung B: Tumorgewebe*



*Abbildung 7: Elektropherogramm des Markers BAT26 des Patienten 1E4
Abbildung A: Normalgewebe Abbildung B: Tumorgewebe*

4 Diskussion

4.1 Mikrosatelliteninstabilität im PDAC

4.1.1 Prävalenz einer MSI im PDAC

In der vorliegenden Studie wurde ein bereits auf chromosomale Instabilität voruntersuchtes Patientenkollektiv ergänzend auf MSI analysiert. Dabei sollte auch die Frage beantwortet werden, ob eine Korrelation zwischen der MSI und dem Ploidie-Status der Tumore besteht. Es wurde ferner die Proteinexpression der Reparaturgene hMLH1 und hMSH2 analysiert, um eine mögliche Korrelation zum Auftreten einer MSI zu untersuchen.

Das Patientenkollektiv der vorliegenden Studie ist als typisch zu bezeichnen. Besondere Merkmale eines solchen typischen Kollektivs sind die Ausgewogenheit der Prävalenz zwischen den Geschlechtern, die Altersklassenverteilung zwischen 50 und 59 Jahren bzw. 60 und 69 Jahren und ein mittelgradiger Tumordifferenzierungsgrad (G2) nach TNM-Klassifikation (Maple et al. 2005, Nakata et al. 2002a, Goggins et al. 1998b, Yamamoto et al. 2001, Ghimenti et al. 1999).

In der vorliegenden Studie wiesen nur zwei (5 %) (1F1, 1E4) von 37 untersuchten Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas eine Längenveränderung an mehr als einem von uns untersuchten Markern auf und zeigten hier das typische Bild in der Immunhistochemie mit Expressionsverlust der DNA-Reparaturenzyme MLH1 und MSH2 (siehe Abbildung 3 b). Diese beiden Fälle waren also entsprechend den HNPCC-Bethesda-Kriterien als MSI-H zu klassifizieren. Weitere sechs Fälle zeigten eine Längenänderung an nur einem Marker und sind demnach als MSI-L zu bezeichnen.

Ein Vergleich mit Literaturdaten ergibt heterogene Ergebnisse hinsichtlich der Prävalenz einer MSI in Pankreaskarzinomen. Einerseits sind bisher nur wenige Studien zur Prüfung auf eine MSI an duktalem Adenokarzinomen des Pankreas durchgeführt worden. In diesen Studien wiederum variiert der Prozentsatz einer MSI zwischen drei und 50 Prozent. Goggins et al. (1998b) berichteten von einer Prävalenz von 3,7 Prozent (3/82). Ouyang et al. (1998) zeigten Daten mit einer angegebenen Prävalenz von 15 Prozent (9/60) einer MSI.

Wilentz et al. (2000) fanden unter Verwendung der Mononukleotidmarker BAT25 und BAT26 in 77 sporadischen Adenokarzinomen keinen MSI-positiven Fall (0/77), dagegen bei 13 medullären Karzinomen einen MSI-Fall (7 %). 2001 fanden Yamamoto et al. eine Prävalenz von 13 Prozent MSI-H-Fällen (13/100) und 13 Prozent MSI-L-Fällen in sporadischen Pankreaskarzinomen und 100 Prozent (3/3) in HNPCC-Pankreaskarzinomen. Die Studie von Nakata et al. (2002a) gab 17,4 Prozent (8/46) MSI-positive Karzinome an, die Studie von Amosenko et al. (2009) ermittelte neun Prozent MSI in den untersuchten PDAC. Tabelle 27 stellt eine Übersicht der Studien und deren Ergebnisse auf. Teilweise wurden in den Studien parallel Kollektive mit gesichertem HNPCC untersucht; eine entsprechende Aufstellung ist der Tabelle zu entnehmen

Studie	Jahr	Karzinom --	Anzahl Patienten	Prävalenz MSI-H (%n)	MMR-Defekt	CIN
Seymour et al (USA)	1994	PDAC	27	0 (0/27)	nicht durchgeführt	nicht untersucht
Bretnall et al (USA)	1995	PDAC	8	50 (4/8)	nicht durchgeführt	nicht untersucht
Ouyang et al (Japan)	1998	PDAC	60	15 (9/60)	nicht durchgeführt	nicht untersucht
Goggins et al (USA)	1998	PDAC	82	2,4 (2/82)	nicht durchgeführt	diploid
Ghimenti et al (Italien)	1999	nicht-selektiert	27	0 (0/27)	durchgeführt	nicht untersucht
Wilentz et al. (USA)	2000	Medulläres Pankreaskarzinom	13	5 (1/13)	MLH1/MSH2	nicht untersucht
Yamamoto et al (Japan)	2001	PDAC HNPCC	100	13 (13/100) 100 (3/3)	MLH1/MSH2/ MSH3	nicht untersucht
Nakata et al (Japan)	2002a	PDAC	46	17,4 (8/46)	nicht durchgeführt	nicht untersucht
Maple et al (USA)	2005	PDAC	35	(2/35)	MLH1/MSH2	nicht untersucht

Tabelle 27: Übersicht der bisher durchgeführten Studien zur Mikrosatelliteninstabilität beim Pankreaskarzinom

4.1.2 Zusammenhang zwischen MSI-Status und MMR-System

Die Zahl der Gene, die in Pankreastumoren von Mutationen betroffen sind, ist nach den Ergebnissen jüngster Studien weitaus höher als bisher angenommen (Jones et al. 2008; Vincent et al. 2011; Wang et al. 2012). Außer den Leitgenen KRAS, p16INK4A/CDKN2A, p53, BRCA2, PRSS1, STK11 und SMAD4/DPC4 wurden in den letzten Jahren zahlreiche weitere von Mutationen betroffene Gene identifiziert (Mehigan et al. 2006; Koorstra et al. 2008; Jones et al. 2008; Vincent et al. 2011; Wang et al. 2012). Wang et al. (2012) nennen in ihrer Analyse von 15 PDAC 56 Gene, die in mehr als zwei Zelllinien Mutationen aufweisen, davon 41 Gene, die bisher nicht beschrieben wurden. Jones et al. (2008) berichten von mindestens zwölf beeinträchtigten Signaltransduktionswegen, die bei 67 Prozent der von ihnen untersuchten Pankreaskarzinome gefunden wurden. Hypermethylierungen scheinen nach derzeitigem Stand der Kenntnis eine häufige Ursache einer verminderten Genexpression zu sein, wobei etwa ein Drittel die Promotorregionen betrifft. In den letzten Jahren wurden von der Arbeitsgruppe Goggins dazu umfangreiche Untersuchungen vorgenommen. Vincent et al. (2011) fanden Hypermethylierungen in 44 Genen und in mehr als 70 Prozent der untersuchten Pankreaskarzinome. Besondere Relevanz haben in diesem Zusammenhang die Reparaturgene des MMR-Systems. Interessant wäre es also, das vorliegende Patientenkollektiv ebenfalls auf Hypermethylierungen zu untersuchen und eine entsprechende Korrelation zu den vorhandenen Daten der MMR-Defekte zu finden.

Im Jahr 2011 wurde eine Studie veröffentlicht, welche die Korrelation von MMR-Defekten, insbesondere hMLH1- und hMSH2-Mutationen, und Überlebensprognose beim Pankreaskarzinom beschreibt (Dong et al. 2011). Dieser Zusammenhang wurde bereits von Yamamoto et al. (1998) angesprochen. In Tumorzellen ist die Apoptose infolge massiver Dysregulationen, so beispielsweise durch Mutationen an p53, beeinträchtigt. P53, eines der gatekeeper-Gene, reguliert im gesunden Organismus diverse Apoptose-Gene. Infolge dieser Dysregulationen in Tumorzellen, wobei das Auslösen des programmierten Zelltods gestört ist, kann ungehindertes Zellwachstum die Tumorprogression fördern (Vousden et al. 2005).

Nach heutigem Erkenntnisstand hat das MMR-System nicht nur Reparatur-, sondern auch Schutzfunktion und ist zudem in der Lage, indirekt die Apoptose zu regulieren

(Yanamadala et al. 2003). Es wird beschrieben, dass über die Expression der Proteine des MMR-Systems auch die RNA-Transkription beeinflusst werden kann.

So kann beispielsweise über die Aktivierung von MLH1 oder MSH2, welche Zielgene von p53 darstellen, der durch p53 induzierte Apoptose-Mechanismus wieder aktiviert werden (Yanamadala et al. 2003; Schuler et al. 2005). Die Mechanismen werden derzeit kontrovers diskutiert und sind noch nicht komplett verstanden.

MLH1 ist entscheidend an der Koordination des Fehlererkennungs-Dimers aus MSH2 und MSH3/MSH6 mit Reparaturenzymen wie Exonukleasen und Polymerasen beteiligt (Peltomäki 2001). Das Silencing von hMLH1 ist in erster Linie auf biallele Methylierung der Promotorregion zurückzuführen: dies ergaben zahlreiche Studien an unterschiedlichen sporadischen Karzinomen, von denen hier nur eine Auswahl genannt werden soll (Thibodeau et al. 1998 (kolorektal); Veigl et al. 1998; Fleisher et al. 2001 (gastrointestinale Tumore); Yamamoto et al. 2001a (Pankreas); Miyakura et al. 2003 (kolorektal); Omura et al. 2008 (Pankreas, siehe Vincent et al. 2011); Pointer et al. 2008 (kolorektal); Vincent et al. 2011 (Pankreas)). Gargiulo et al. berichten in ihrer Publikation aus dem Jahr 2009 von vier Pankreaskarzinom-Patienten (2,1 %), die Mutationen der Gene MLH1 und MSH2 aufwiesen. Wang et al. (2012) sehen in ihrer Arbeit Mutationen von hMLH1 als wesentlichen Auslöser der MSI bei PDAC an. In der vorliegenden Studie wurde eine Keimbahnanalyse der MMR-Gene nicht durchgeführt und somit kann dies als Ursache weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Auch zur Expression der MMR-Proteine in Zusammenhang mit einer MSI zeigt sich die Studienlage heterogen. Eine Analyse von insgesamt vier MSI-Karzinomen ergab vollständig unterdrückte MLH1-Expression in allen Fällen (Goggins et al. 1998b; Wilentz et al. 2000). Yamamoto et al. (2001) fanden in 46 Prozent der pankreatischen MSI-H-Tumoren eine Mutation (Promotormethylierung) des hMLH1-Gens, wobei in den Tumoren mit methylierten Genen eine nahezu vollständige Unterdrückung der Proteinexpression resultierte. In allen MSI-H-Tumoren war die MLH1-Expression reduziert. Tomaszewska et al. (2003) dagegen berichten von vollständiger hMLH1- und hMSH2-Expression in allen von ihnen untersuchten PDAC-Fällen, wobei über eine mögliche MSI hier keine Aussage getroffen wird.

Ein Zusammenhang zum Phänotyp wird in Studien zu IPMC (intraductal papillary-mucinous carcinoma) vermutet: Hier wurden nur zehn Prozent MSI-H und 13 Pro-

zent MSI-L bei geringen bis keinen Expressionsverlusten von hMLH1 und hMSH2 gefunden (Nakata et al. 2002b; Lüttges et al. 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene hMLH1 und hMSH2 zeigten in jeweils elf der 37 Tumoren eine verringerte Proteinexpression. 83,3 Prozent (n = 5) der MSI(1)-Tumoren und 100 Prozent der MSI(2)-Tumoren wiesen einen Expressionsverlust an hMLH1 von mehr als 50 Prozent auf. 66,2 Prozent (n = 4) der MSI(1)-Tumoren und 100 Prozent der MSI(2)-Tumoren zeigten einen Expressionsverlust an hMSH2 von mehr als 50 Prozent. Das heißt, die vorliegende Arbeit bestätigt die bisherigen Ergebnisse, dass MSI-H in erster Linie mit einem Expressionsverlust von hMLH1 einhergeht (Thibodeau et al. 1998; Kondo et al. 2000; Yamamoto et al. 2001, House et al. 2003), wobei die Steigerung des Expressionsverlustes mit erhöhter Rate an MSI signifikant ist.

4.1.3 Zusammenhang zwischen LOH und MSI

Verluste der Heterozygotie (LOH) zählen zu den entscheidenden Ereignissen in malignen Tumoren. Gemäß der so genannten „Two-Hit“-Theorie müssen bei sporadischen Tumoren beide Allele zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens verändert sein, was über verschiedene Abfolgereaktionen geschehen kann. So kann beispielsweise die biallele Inaktivierung durch eine homozygote Deletion erfolgen oder über eine ererbte (Punktmutation) und eine erworbene Inaktivierung eine Deletion zustande kommen (Fearon 1997; Sugio et al. 1997).

Rozenblum et al. (1997) analysierten in fast allen untersuchten Pankreaskarzinomen eine biallele Mutation in p53 aus einer Kombination einer intragenetischen Punktmutation des einen Allels mit einem chromosomalen Verlust (LOH) des anderen Allels als Folge. LOH kennzeichnen die Tumorentwicklung über chromosomale Instabilität und wurden auch in PDAC gefunden (Seymour et al. 1994; Hahn et al. 1995; Rozenblum et al. 1997; Yamano et al. 2000). Yamano et al. (2000) fanden in allen zehn untersuchten invasiven Tumoren des PDAC einen LOH in mindestens einem Gen/Chromosomenabschnitt; dabei befanden sich die meisten chromosomalen Verluste in Chromosom 3, welches diverse für die Kanzerogenese verantwortliche Gene enthält (Yamano et al. 2000; Wang et al. 2012). Amosenko et al. (2009) fanden LOH in 80 Prozent der untersuchten PDAC, Funel et al. (2011) in 71,4 Prozent der untersuchten PDAC. Wang et al. (2012) ermittelten einen signifikanten Zusammen-

hang zwischen Allelverlusten in MLH1 und somatischen indel-Mutationen (kombinierte Insertion/Deletion-Mutationen). Fujiwara et al. (1998) fanden eine inverse Relation zwischen LOH und MSI. Im Falle von kolorektalen Karzinomen ermittelten Matsuzaki et al. (2005) in 21,4 Prozent der untersuchten MSI-Fälle auch gleichzeitig einen LOH. Müller et al. (2009) beschrieben bei HNPCC einen von 28 MSI-H-Fällen kombiniert mit hMLH1-Mutation und LOH. Die Korrelation von LOH und MSI in Pankreaskarzinomen ist kaum untersucht und scheint nach neueren Erkenntnissen eher in Karzinomformen mit günstiger Prognose vorzuliegen. Abraham et al. (2002) beispielsweise fanden das gleichzeitige Auftreten von heterozygoten Allelverlusten und MSI bei azinären Pankreaskarzinomen. Interessant ist in diesem Zusammenhang der hohe Anteil an MSI-H, der bei Insulinomen, einer Form von endokrinen Pankreastumoren, gefunden wurde und mit einem Expressionsverlust von MLH1 sowie einem hohen Anteil an LOH korreliert (Mei et al. 2009). Wang et al. (2012) sahen keinen Zusammenhang zwischen MSI und LOH in den von ihnen untersuchten PDAC.

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten die MSI-H-Tumoren keine Allelverluste bei den untersuchten informativen Markern. Während LOH ein häufiges Ereignis in der vorliegenden Studie war (21 LOH), wurde es nur viermal in Kombination mit einem MSI-L analysiert (siehe Tabelle 15). Bei den beiden MSI-H-Fällen gab es keine Korrelation zu LOH.

4.1.4 Zusammenhang zwischen MSI und Ploidie-Status

Es ist bekannt, dass Pankreaskarzinome zu den chromosomal instabilen Tumoren mit ausgeprägter Aneuploidie gehören, wobei sowohl Verluste als auch Zugewinne genetischen Materials gefunden wurden (Griffin et al. 1995; Harada et al. 2002; Moskovitz et al. 2003; Baumgart et al. 2010, Stoecklein et al. 2004). Jedoch scheint es eine Gruppe von PDAC zu geben, welche einen diploiden oder zumindest überwiegend diploiden Chromosomensatz aufweisen. Interessanterweise war dies mit einer guten Prognose verbunden, d.h. diese Tumoren scheinen einen weniger aggressiven Phänotyp aufzuweisen (Stoecklein et al 2004). Es stellte sich nun die Frage, ob die als überwiegend diploid diagnostizierten PDAC mit einer MSI korreliert sind. Bei kolorektalen Karzinomen ermittelten beispielsweise Thibodeau et al. (1998) an einem Kollektiv von kolorektalen Karzinomen in 55 Prozent der MSI-H-Fälle und in

35 Prozent der MSI-L-Fälle eine Diploidie. Einige Studien zu kolorektalen Tumoren berichten von MSS-Tumoren, die diploides Muster zeigen und mit einer besonderen Tendenz zur Metastasierung einhergehen (Camps et al. 2006; Hawkins et al. 2001; Banerjea et al. 2009). Über die Häufigkeit einer MSI beim Pankreaskarzinom, den Zusammenhang zwischen einer MSI und dem Ploidiestatus sowie ihrer Bedeutung ist bisher nur sehr wenig bekannt. Goggins et al. (1998) und Yamamoto et al. (2001) haben zusätzlich zur Mikrosatellitenanalyse eine in situ-Hybridisierung zur Analyse des Ploidiestatus durchgeführt und fanden hierbei im Falle einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) einen diploiden Chromosomensatz. In der vorliegenden Studie konnte solch eine Korrelation von MSI mit diploidem Chromosomensatz nicht gefunden werden. Jedoch wiesen die beiden MSI-H-Fälle einen diploiden Chromosomensatz auf. Betrachtet man MSI-L (MSI(1)) isoliert, so fand sich dort kein MSI-L-Tumor mit diploidem Chromosomensatz (siehe Tabelle 25 und Tabelle 6). Es muss jedoch festgehalten werden, dass statistisch valide Aussagen bei diesen geringen Zahlen schwierig sind. Anhand der vorliegenden Daten kann jedoch ausgesagt werden, dass MSI auch bei aneuploiden Tumoren zu beobachten sind und somit beim PDAC offensichtlich Mischformen der genetischen Instabilität (CIN und MSI) vorkommen.

4.1.5 Diskussion der beiden MSI-high Fälle

In der vorliegenden Studie wurden bei den 37 untersuchten PDAC zwei Tumoren identifiziert, die eine Längenveränderung an mehr als einem Marker aufwiesen und somit als MSI-H klassifiziert werden können. Bei dem Tumor 1F1 kam es zu einer Längenveränderung der Marker D17S250 und BAT25. Bei dem PDAC-Fall 1E4 zu einer Längenveränderung des Markers BAT26 und des Markers D17S250. Interessanterweise fand sich in beiden Fällen ein Expressionsverlust der beiden untersuchten MMR-Proteine hMLH1 als auch hMSH2. Insgesamt wären diese PDAC daher nach HNPCC-Bethesda-Standardprotokoll eindeutig als MSI-H zu klassifizieren. Interessant ist dabei, dass der gleichzeitige Ausfall von zwei oder mehreren MMR-Proteinen auch bei HNPCC selten ist (Müller et al. 2009; Kaur et al. 2011). Auch bei HNPCC-Patienten geht mit MSI-H besonders häufig ein Expressionsausfall von MLH1 oder MSH2 einher. In beiden hier dargelegten MSI-H PDAC Fällen zeigte sich ein Karzinom mit invasivem Tumorwachstum (siehe Tabelle 6). Beide Fälle

zeigten diploiden Chromosomensatz, was im Widerspruch zum histopathologischen Bild stehen könnte (Tomaszewska et al. 2003). Ungeachtet der histopathologisch schlechten Prognose gibt es Studien, in denen gerade diese MSI-positive Fälle einen Überlebensvorteil gegenüber Patienten ohne MSI haben (Yamamoto et al. 2001a; Nakata et al. 2002a). In unserer Untersuchung ist ein derartiger Zusammenhang aufgrund der geringen Anzahl der MSI-positiven Fälle im untersuchten Patientenkollektiv nicht aufzustellen.

4.2 Analyse der Mikrosatelliteninstabilität beim Pankreaskarzinom

4.2.1 Problematik der Auswahl der MSI Marker

In der vorliegenden Studie wurden die Proben nach dem HNPCC-Standardprotokoll auf MSI untersucht, welches die Dinukleotidmarker D2S123, D17S250, D5S346 und die Mononukleotidmarker BAT25 und BAT26 enthält. Vier MSI-Fälle wurden jeweils mit BAT25 bzw. D17S250 erkannt, einer mit BAT26. Unsere Ergebnisse liegen mit 21,6 Prozent bzw. fünf Prozent MSI-H innerhalb der bisher publizierten Analysedaten. In den Studien von Brentnall et al. (1995) sowie Seymour et al. 1994, Ghimenti et al. 1999, Nakata et al. 2002a, die ausschließlich Dinukleotidmarker einsetzten, bewegte sich die Prävalenz zwischen null und 50 Prozent. Yamamoto et al. dokumentieren in ihrer Studie (2001a) eine Prävalenz des MSI-Genotyps im Adenokarzinom des Pankreas von 13 Prozent bei der Verwendung von Dinukleotidmarkern und der Mononukleotidmarker BAT25 und BAT26. In der Studie von Nakata et al. 2002a (17,4 % MSI) wurden weitere ergänzende Marker eingesetzt (D3S1611, D5S346, D7S501, NM23, TP53-Penta, TP-Dint und D18S35). Brentnall et al. (1995) analysierten mit D2S123, D2S136, D3S1067, D5S107, D6S87, D8S255, D10S197, D11S904, D17S261, D17S361, D17S787 und D18S34.

Eine Ursache für die Spannweite der Prävalenz des MSI-Genotyps kann in der hohen Zahl an Mikrosatelliten-Loci im menschlichen Genom begründet liegen (Nakata et al. 2002) Dinukleotidmarker weisen eine hohe Polymorphie auf und sind deshalb eher für die vergleichende Untersuchung innerhalb einer ethnischen Gruppe (Kaukasier, Asiaten) geeignet. Demgegenüber liegt insbesondere der Marker BAT26, eine Poly(A)-Sequenz mit 26 Wiederholungen, in der Regel monomorph mit nur geringen interindividuellen Längendifferenzen vor, sodass DNA-Fehlreplikationen,

auch bei Kohorten unterschiedlicher ethnischer Herkunft, sicher erkannt werden können (Parsons et al. 1995; Hoang et al. 1997; Samowitz et al. 1999). BAT26 eignet sich besonders gut, da es im Intron 5 innerhalb von hMSH2 liegt (Parsons et al. 1995; Samowitz et al. 1999). Der Nachweis von Längenveränderungen erfolgt gemäß unterschiedlichen Studien mit Mononukleotidmarkern wie BAT25, BAT26 oder BAT40 mit hoher Zuverlässigkeit (Aaltonen et al. 1993; Thibodeau et al. 1993; Ionov et al. 1993; Hoang et al. 1997; Brennetot et al. 2005; Berginc et al. 2009; Søreide et al. 2011). Es ist kritisch zu hinterfragen, ob das Bethesda-Protokoll als Standardprotokoll auch für Pankreaskarzinome geeignet ist. Dieses Protokoll gilt nicht spezifisch für das Pankreaskarzinom, sondern für das HNPCC. Hier könnte ein Grund für die in unserer Studie vorliegende geringe Anzahl der MSI-Fälle im untersuchten Patientenkollektiv liegen. Die bisherigen Studien mit unterschiedlichen Prävalenzen von MSI von null bis 50 Prozent sind aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Marker und Studienprotokolle deshalb nur unter Vorbehalt miteinander zu vergleichen (siehe Tabelle 27). Umso wichtiger ist es, für zukünftige Studien ein entsprechend einheitliches Studienprotokoll mit den ausgewiesenen Markern zu erstellen, um die Ergebnisse vergleichen und mögliche therapeutische Konsequenzen ableiten zu können (Hadziavdić et al. 2008). Um die Daten der hier vorliegenden Studie mit früheren Ergebnissen zu vergleichen, wäre es sinnvoll, das Patientenkollektiv bezüglich der Rate an MSI mit den eben erwähnten zusätzlichen Markern zu untersuchen.

4.2.2 Mögliche Ursachen und Zusammenhänge der Mikrosatelliteninstabilität beim Pankreaskarzinom

Genetische Defekte sind nach heutigen Erkenntnissen die entscheidende Ursache für die Krebsentstehung. Aus genetischer Sicht ist zu unterscheiden zwischen sporadischen und hereditären Karzinomen. Die Adenom-Karzinom-Sequenz somatischer Zellen bei sporadischen Karzinomen mit mutagener Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von Onkogenen und einer weiteren Mutationskaskade ist einer der Wege der Onkogenese. Keimbahnmutationen und Defekte im MMR-System als Auslöser von hereditären Prädispositionssyndromen und daraus folgend weitere somatische Mutationen (so genannte Mutationsakkumulation) ist ein weiterer Weg der Tumorgenese.

Chromosomale oder genetische Instabilität der Zellen begünstigen die weitere Progression und Invasivität des Tumors. Während die Genese hereditärer Tumoren bereits gut verstanden ist, stellen sich zu sporadischen Tumoren noch zahlreiche offene Fragen (Camps et al. 2006; Imai et al. 2008; Wang et al. 2012). Neuere Untersuchungen an kolorektalen Karzinomen bestätigten, dass es sich bei der Genese um einen komplexen Vorgang handelt, der durch Heterogenität der genetischen Veränderungen gekennzeichnet ist (Fujiwara et al. 1998; Miyamoto et al. 2007). Einerseits werden Tumoren heute nach dem so genannten MSI-Pfad (z. B. das HNPCC) oder dem CIN-Pfad unterschieden (Imai et al. 2008), andererseits können auch beide Manifestationen der Instabilität, sowohl chromosomale (CIN) als auch genetische (MSI) Defekte, parallel vorliegen (Camps et al. 2006; Wang et al. 2012). Die Zusammenhänge der Tumorgenese sind zu komplex, um Abgrenzungen vornehmen zu können. Im Falle des Pankreaskarzinoms scheint der morphologische Typ Hinweise darauf zu geben (Brentnall et al. 1995; Goggins et al. 1998b; Thibodeau et al. 1998; Wilentz et al. 2000; Yamamoto et al. 2001a). Da bisher insgesamt zu wenig vergleichende Daten verfügbar sind, können die Ergebnisse bisher nur allgemein als Aussage zusammengefasst werden, dass eine MSI auch beim Pankreaskarzinom auftritt und möglicherweise mit einer besseren Prognose einhergeht.

Das familiäre Pankreaskarzinom, die hereditäre Pankreatitis und das HNPCC sind gesicherte Prädispositionssyndrome, die das Risiko der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms erhöhen (Klein et al. 2013). Aufgrund der in Kapitel 4.1 dargelegten internationalen Studienlage gibt es Grund zu der Annahme, dass Tumorformen mit

guter Prognose (IPMC, azinäres Pankreaskarzinom) und endokrine Tumoren wie das Insulinom häufiger mit einer MSI einhergehen, maligne invasive, stark differenzierte Ausprägungen dagegen eher selten. Das könnte bedeuten, dass eine MSI, insbesondere MSI-H, ein prognostischer Marker für die Ausprägung und Prognose eines Pankreaskarzinoms sein könnte. Die Studienlage ist insgesamt uneinheitlich. Bezüglich der günstigeren Prognose von MSI-Pankreastumoren kann deshalb bisher nur spekuliert werden. Bei einem defekten MMR-System steigt die Mutationsrate der MMR-Gene exponentiell an. Eine Ursache der dennoch besseren Prognose derartiger Karzinome könnte in der Wechselwirkung mit p53 begründet sein. Es gibt Anlass zu der Vermutung, dass eine Mindereexpression der MMR-Proteine nur selten mit Mutationen an p53 einhergeht, wodurch Apoptose-Mechanismen aktiv bleiben können (Cottu et al. 1996; Nyiraneza et al. 2011). Bisher war auch dazu die Studienlage kontrovers (Fujiwara et al. 1998; Müller et al. 2010). Ein weiterer Vorteil könnte darin liegen, dass MSI-H-Tumoren selten mit chromosomalen Verlusten (LOH) verbunden sind, wie einige wenige Studien bisher bestätigt haben (Watanabe et al. 2001; Yamamoto et al. 2001b; Matsuzaki et al. 2005; Tsai et al. 2009; Fujiwara et al. 1998; Melcher et al. 2011; Plaschke et al. 2012).

5 Fazit und Ausblick

Das Gesamtüberleben der Patienten von Pankreaskarzinomen hängt signifikant von den histopathologischen Parametern bzw. dem Stadium nach UICC-Klassifikation ab (Han et al. 2006). So gelten eine geringe Tumorgroße ($< T2$), ein negativer Lymphknotenstatus (N0) und in vielen Studien auch die Tumorfreiheit der Resektionsränder (R0) als prognostisch anerkannte positive Indikatoren (Han et al. 2006; Jarufe et al. 2004; Westgaard et al. 2008; Ferrone et al. 2012). Da diese Faktoren häufig doch unscharf sind, scheinen molekulare Faktoren zur weiteren Klassifizierung und Prognoseabschätzung von besonderem Interesse zu sein. In diesem Zusammenhang wurden in dieser Arbeit Untersuchungen beim PDAC zum MSI-Status durchgeführt. Verschiedene Studien gaben Grund zu der Annahme, dass der MSI-H-Status ähnlich wie bei kolorektalen Karzinomen auch bei Pankreaskarzinomen mit einer günstigeren Prognose verbunden ist (Gryfe et al. 2000; Yamamoto et al. 2001a; Nakata et al. 2002b; Sinicrope et al. 2006; Camps et al. 2006). MSI-H-Tumoren werden demnach eher bei jüngeren Patienten unter 60 Jahren gefunden, zeigen geringe LOH und gehen mit günstigerer Überlebensprognose einher (Gryfe et al. 2000; Chang et al. 2006). Die hier vorliegenden Daten lassen nun keine endgültigen Schlüsse zu, ob eine MSI-Analyse eine prognostische Abschätzung erlaubt. Hierfür war letztlich das untersuchte Kollektiv zu klein, da sich, wie in einigen Studien zuvor auch (siehe Tabelle 27), gezeigt hat, dass MSI-H bei PDAC sehr selten ist. Die vorliegenden Daten zeigten aber, dass unabhängig vom Ploidiestatus MSI auch in schwächer ausgeprägter Form vorkommen kann und dies insgesamt mit ca. 20% kein seltenes Ergebnis zu sein scheint. Da eine Korrelation von MSI und Protein-Expression des MMR festgestellt wurde, kann darauf geschlossen werden, dass MSI bei der Tumorprogression durchaus eine Rolle spielt. Inwieweit dies nur modulierend oder bestimmend für die Progression des PDAC sein könnte, kann abschliessend noch nicht beurteilt werden. Zum einen müssten hierfür ein größeres Patientenkollektiv untersucht werden und begleitend dazu zellbiologische Studien durchgeführt werden, die darauf abzielen, die Bedeutung der MMR für das Pankreaskarzinom zu untersuchen. Hierfür müssten aber verschiedene PDAC-MSI-Zelllinien oder PDAC-MSI-Xenograft-Modelle etabliert werden. Ein interessanter Aspekt, der sich aus der festgestellten MSI bei PDAC ergibt, ist die Möglichkeit einer Vakzinierungstherapie. Durch die Frameshift Mutationen im Leserahmen kann

es bei der Translation zu so genannten „Frameshift-Peptiden“ (FSP) kommen, für die gezeigt werden konnte, dass sie gegen kolorektale Tumorzellen anti-tumorale Immunantworten hervorrufen können (Schwitalle et al. 2008). Dies erklärt zum einen die bessere Prognose von MSI-positiven kolorektalen Karzinomen. Zum anderen ergibt sich hieraus ein interessanter Ansatz für die Therapie (Schwitalle et al. 2008). Solche Ansätze werden derzeit beim kolorektalen Karzinom tatsächlich in der Klinik verfolgt ([:http://clinicaltrials.gov/show/NCT01885702](http://clinicaltrials.gov/show/NCT01885702); besucht Sep. 2013), wie an einer aktuellen Phase I/II Studie der Radboud Universität in den Niederlanden zu erkennen ist. Ob von einem solchen Ansatz auch Patienten mit einem PDAC profitieren könnten ist derzeit völlig unklar. Da jedoch der Mechanismus hinter dem Phänomen MSI beim PDAC im Prinzip gleich dem des kolorektalen Karzinoms ist, kann auch hier mit frameshift Mutationen in Leserahmen der Translation gerechnet werden und damit auch mit der Entstehung von FSP. Dies könnte durchaus ein spannender Ansatz für eine individuelle Therapie beim PDAC sein und sollte daher weiter verfolgt werden. Neue Möglichkeiten in der Hochdurchsatzsequenzierung bieten in diesem Zusammenhang auch die technische Voraussetzung, um FSP bei PDAC nachweisen zu können. Es scheint daher vorstellbar, dass eine umfangreiche genetische Analyse von Primärtumoren in der Zukunft für eine verbesserte Therapie von Patienten mit PDAC sorgen könnte. Nicht nur um eine feinere Prognoseabschätzung vornehmen zu können, um so adjuvante Therapien Risiko-Patienten gezielter geben zu können, sondern auch als direkter therapeutischer Ansatzpunkt.

6 Literaturverzeichnis

Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993; 260(5109): 812-6.

Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovarra R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomäki P, Mecklin JP, Jarvinen HJ. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer*. 1999; 81:214-218.

Abdel-Rahman WM, Peltomaki P. Molecular basis and diagnostics of hereditary colorectal cancers. *Ann Med*. 2004; 36(5): 379-388

Abraham SC, Wu TT, Hruban RH, Lee JH, Yeo CJ, Conlon K, Brennan M, Cameron JL, Klimstra DS. Genetic and immunohistochemical analysis of pancreatic acinar cell carcinoma: frequent allelic loss on chromosome 11p and alterations in the APC/beta-catenin pathway. *Am J Pathol*. 2002; 160(3):953-962.

Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, Kolodner R, Fishel R. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(24):13629-13634.

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. S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007. *Z Gastroenterol*. 2007; 45(6): 487-523.

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 1988; 53(4): 549-554

Amosenko FA, Kazubskaja TP, Gromyko OE, Matveeva TI, Korchagina EL, Nasedkina TV, Gar'kavtseva RF, Kalinin VN. Analysis of K-ras, BRCA1/2, CHEK2 mutations and microsatellite markers (loss of heterozygosity at 9p, 17p and 18q) in sporadic pancreas adenocarcinomas. *Mol Biol (Mosk)*. 2009; 43(3): 414-421

An HJ, Kim KI, Kim JY, Shim JY, Kang H, Kim TH, Kim JK, Jeong JK, Lee SY, Kim SJ. Microsatellite instability in endometrioid type endometrial adenocarcinoma

is associated with poor prognostic indicators. *Am J Surg Pathol.* 2007; 31(6): 846-853.

Attri J, Srinivasan R, Majumdar S, Radotra BD, Wig J. Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma. *BMC Gastroenterol.* 2005; 5: 22.

Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(3): 790-799.

Banerjea A, Hands RE, Powar MP, Bustin SA, Dorudi S. Microsatellite and chromosomal stable colorectal cancers demonstrate poor immunogenicity and early disease recurrence. *Colorectal Dis.* 2009; 11(6): 601-608.

Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, Hezel AF, Horner J, Lauwers GY, Hanahan D, DePinho RA. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev.* 2006; 20(22): 3130-3146.

Bartram CR. Genetische Grundlagen der Kanzerogenese. In: Die Onkologie. Teil 1. Hiddemann W, Bartram CR. Springer Medizin Verlag Heidelberg. 2010; 100 ff.

Baumgart M, Werther M, Bockholt A, Scheurer M, Rüschoff J, Dietmaier W, Ghadimi BM, Heinmöller E. Genomic instability at both the base pair level and the chromosomal level is detectable in earliest PanIN lesions in tissues of chronic pancreatitis. *Pancreas.* 2010; 39(7): 1093-1103.

Berginc G, Glavac D. Rapid and accurate approach for screening of microsatellite unstable tumours using quasimonomorphic mononucleotide repeats and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Dis Markers.* 2009; 26(1): 19-26.

Berrington de Gonzalez A, Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2003; 89(3): 519-523.

Bian Y, Caldes T, Wijnen J, Franken P, Vasen H, Kaklamani V, Nafa K, Peterlongo P, Ellis N, Baron JA, Burn J, Moeslein G et al. TGFBR1*6A may contribute to hereditary colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(13): 3074-3078.

- Bodmer W, Bishop T, Karran P. Genetic steps in colorectal cancer. *Nat Genet.* 1994; 6: 217-219.
- Bomme L, Heim S, Bardi G, Fenger C, Kronborg O, Brøgger A, Lothe RA. Allelic imbalance and cytogenetic deletion of 1p in colorectal adenomas: a target region identified between DIS199 and DIS234. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21(3): 185-194.
- Brennetot C, Buhard O, Jourdan F, Flejou JF, Duval A, Hamelin R. Mononucleotide repeats BAT-26 and BAT-25 accurately detect MSI-H tumors and predict tumor content: implications for population screening. *Int J Cancer.* 2005; 113(3): 446-450.
- Brentnall TA, Chen R, Lee JG, Kimmey MB, Bronner MP, Haggitt RC, Kowdley KV, Hecker LM, Byrd DR. Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. *Cancer Res.* 1995; 55(19): 4264-4267.
- Büchler MW, Uhl W, Malfertheiner P. *Pankreaserkrankungen.* S. Karger AG. 2004.
- Burriss H 3rd, Rocha-Lima C. New therapeutic directions for advanced pancreatic cancer: targeting the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways. *Oncologist.* 2008; 13(3): 289-298.
- Burriss HA 3rd. Recent updates on the role of chemotherapy in pancreatic cancer. 1: *Semin Oncol.* 2005; 32(4 Suppl 6): 1-3.
- Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet.* 1994; 8(1): 27-32.
- Camps J, Armengol G, del Rey J, Lozano JJ, Vauhkonen H, Prat E, Egozcue J, Sumoy L, Knuutila S, Miró R. Genome-wide differences between microsatellite stable and unstable colorectal tumors. *Carcinogenesis.* 2006; 27(3): 419-428.
- Chang SC, Lin JK, Yang SH, Wang HS, Li AF, Chi CW. Relationship between genetic alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2006; 118(7): 1721-1727.
- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB,

Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. Folfirinox versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2011; 364: 1817-1825.

Cottu PH, Muzeau F, Estreicher A, Flejou JF, Iggo R, Thomas G, Hamelin R. Inverse correlation between RER+ status and p53 mutation in colorectal cancer cell lines. *Oncogene.* 1996; 13: 2727-2730.

De la Chapelle A. Microsatellite instability. *N Engl J Med.* 2003; 349(3): 209-210.

DiGiuseppe JA, Hruban RH, Goodman SN, Polak M, van den Berg FM, Allison DC, Cameron JL, Offerhaus GJ. Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Pathol.* 1994; 101(6): 684-688.

Fearon EF. Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature of Cancer. *Science* 1997; 278(5340): 1043-1050.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61: 759-767.

Ferrone CR, Pieretti-Vanmarcke R, Bloom JP, Zheng H, Szymonifka J, Wargo JA, Thayer SP, Lauwers GY, Deshpande V, Mino-Kenudson M, Fernández-Del Castillo C, Lillemoe KD, Warshaw AL. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Long-term survival does not equal cure. *Surgery.* 2012; 152(3 Suppl 1): 43-49.

Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Nishizuka S, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. *Oncogene.* 2001; 20(3): 329-335.

Forster S, Sattler HP, Hack M et al. Microsatellite instability in sporadic carcinomas of the proximal colon: association with diploid DNA content, negative protein expression of p53, and distinct histomorphologic features. *Surgery.* 1998; 123: 13-18.

Fraumeni JF Jr. Cancer of the pancreas and biliary tract: Epidemiological considerations. *Cancer Res.* 1975; 35: 3437-3446.

Friedl W. Sporadische Darmtumoren. *medgen.* 2002; 14: 145-151.

Friedrichs N, Kahl P, Aust D, Steinke V, Baretten G, Büttner R. Diagnostik hereditärer Tumorerkrankungen. Rolle der Pathologie als Bestandteil des Deutschen Konsortiums für erblichen Darmkrebs (HNPCC). *Forum* 2012; 27(1): 42-46.

Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T et al. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol.* 1998; 153: 1063-1078.

Gargiulo S, Torrini M, Ollila S, Nasti S, Pastorino L, Cusano R, Bonelli L, Battistuzzi L, Mastracci L, Bruno W, Savarino V, Sciallero S, Borgonovo G, Nyström M, Bianchi-Scarrà G, Mareni C, Ghiorzo P. Germline MLH1 and MSH2 mutations in Italian pancreatic cancer patients with suspected Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 2009; 8(4): 547-553.

Gerdes B, Ramaswamy A, Ziegler A, Lang SA, Kersting M, Baumann R, Wild A, Moll R, Rothmund M, Bartsch DK. p16INK4a is a prognostic marker in resected ductal pancreatic cancer: an analysis of p16INK4a, p53, MDM2, and Rb. *Ann Surg.* 2002; 235(1): 51-59.

Gerok W. Die innere Medizin. Schattauer GmbH Stuttgart. 2007.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (GEKID), Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends, 5. Auflage. 2006.

Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut.* 2007; 56(8): 1134-1152.

Ghimenti C, Tannergård P, Wahlberg S, Liu T, Giulianotti PG, Mosca F, Fornaciari G, Bevilacqua G, Lindblom A, Caligo MA. Microsatellite instability and mismatch repair gene inactivation in sporadic pancreatic and colon tumours. *Br J Cancer.* 1999; 80(1-2): 11-16.

Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1998a; 58(23): 5329-5332.

Goggins M, Offerhaus GJ, Hilgers W, Griffin CA, Shekher M, Tang D, Sohn TA, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. *Am J Pathol.* 1998b; 152(6): 1501-1507.

Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007; 446: 153–158.

Griffin CA, Hruban RH, Morsberger LA, Ellingham T, Long PP, Jaffee EM, Hauda KM, Bohlander SK, Yeo CJ. Consistent chromosome abnormalities in adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Res*. 1995; 55(11): 2394-2399.

Grocock CJ, Vitone LJ, Harcus MJ, Neoptolemos JP, Raraty MG, Greenhalf W. Familial pancreatic cancer: a review and latest advances. *Adv Med Sci*. 2007; 52: 37-49.

Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2000; 342(2): 69-77.

Gu L, Cline-Brown B, Zhang F, Qiu L, Li GM. Mismatch repair deficiency in hematological malignancies with microsatellite instability. *Oncogene*. 2002; 21(37): 5758-5764.

Hadziavdić V, Pavlović-Calić N, Eminović I. Microsatellite instability and loss of heterozygosity of tumor suppressor genes in Bosnian patients with sporadic colorectal cancer. *Bosn J Basic Med Sci*. 2008; 8(4): 313-321.

Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, Gerdes B, Kress R, Ziegler A, Raeburn JA, Campra D, Grützmann R, Rehder H, Rothmund M, Schmiegel W, Neoptolemos JP, Bartsch DK. BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95(3): 214-221.

Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*. 1996; 271(5247): 350-353.

Hahn SA, Seymour AB, Hoque AT, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, Caldas C, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ et al. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. *Cancer Res*. 1995; 55(20): 4670-4675.

Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res*. 1993; 53(21): 5087-5989.

- Han SS, Jang JY, Kim SW, Kim WH, Lee KU, Park YH. Analysis of long-term survivors after surgical resection for pancreatic cancer. *Pancreas*. 2006; 32(3) :271-275.
- Harada T, Okita K, Shiraishi K, Kusano N, Kondoh S, Sasaki K. Interglandular cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2002; 62(3): 835-839.
- Herner A, Sauliunaite D, Michalski CW, Erkan M, De Oliveira T, Abiatari I, Kong B, Esposito I, Friess H, Kleeff J. Glutamate increases pancreatic cancer cell invasion and migration via AMPA receptor activation and Kras-MAPK signaling. *Int J Cancer*. 2011; 129(10): 2349-2359.
- Hiddemann W, Huber H, Bartram, CR. *Die Onkologie*. Springer Verlag. 2004.
- Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res*. 1997; 57(2): 300-303.
- Holzman DC. Pancreatic cancer: will incremental advances begin to make a difference? *J Natl Cancer Inst*. 2010; 102: 1821-1823.
- House MG, Herman JG, Guo MZ, Hooker CM, Schulick RD, Cameron JL, Hruban RH, Maitra A, Yeo CJ. Prognostic value of hMLH1 methylation and microsatellite instability in pancreatic endocrine neoplasms. *Surgery* 2003; 134(6): 902-908.
- Hruban RH, Canto MI, Goggins M, Schulick R, Klein AP. Update on familial pancreatic cancer. *Adv Surg*. 2010; 44: 293-311.
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2000; 6 :2969-2972.
- Hruban RH, Maitra A, Goggins M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008; 1: 306-316.
- Huggett MT, Pereira SP. Diagnosing and managing pancreatic cancer. *Practitioner*. 2011; 255(1742): 21-25, 2-3.
- Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*. 2008; 29(4): 673–680.
- International Union Against Cancer (UICC). *TNM classification of malignant tumors*, 5th Edn. Wiley-Liss, New York. 1997.

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis *Nature*. 1993 (Lond.); 363: 558-561.

Izeradjene K, Combs C, Best M, Gopinathan A, Wagner A, Grady WM, Deng CX, Hruban RH, Adsay NV, Tuveson DA, Hingorani SR. Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Cell*. 2007; 11(3): 229-243.

Jarufe NP, Coldham C, Mayer AD, Mirza DF, Buckels JA, Bramhall SR. Favourable prognostic factors in a large UK experience of adenocarcinoma of the head of the pancreas and periampullary region. *Dig Surg*. 2004; 21(3): 202-209.

Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, Meltzer SJ, Wright C, Searle J, Young J, Leggett BA. Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and a mild mutator pathways. *J Clin Pathol*. 1999; 52: 455-460.

Jefford CE, Irminger-Finger I. Mechanisms of chromosome instability in cancers. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006; 59: 1-14.

Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. 2008; 321(5897): 1801-1806.

Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S. Beiträge zur Gedunheitsberichterstattung des Bundes. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe Robert Koch-Institut, Berlin. 2012.

Kaur G, Masoud A, Raihan N, Radzi M, Khamizar W, Kam LS. Mismatch repair genes expression defects & association with clinicopathological characteristics in colorectal carcinoma. *Indian J Med Res*. 2011; 134: 186-192.

Kelber JA, Reno T, Kaushal S, Metildi C, Wright T, Stoletov K, Weems JM, Park FD, Mose E, Wang Y, Hoffman RM, Lowy AM, Bouvet M, Klemke RL. KRas in-

duces a Src/PEAK1/ErbB2 kinase amplification loop that drives metastatic growth and therapy resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2012; 72(10): 2554-2564.

Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmuller G. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer, *Lancet.* 2002; 360 [9334]: 683-689.

Klein AP, Lindström S, Mendelsohn JB, Stepilowski E, Arslan AA, Bueno-de-Mesquita HB, Fuchs CS, Gallinger S, Gross M, Helzlsouer K, Holly EA, Jacobs EJ, Lacroix A, Li D, Mandelson MT, Olson SH, Petersen GM, Risch HA, Stolzenberg-Solomon RZ, Zheng W, Amundadottir L, Albanes D, Allen NE, Bamlet WR, Boutron-Ruault MC, Buring JE, Bracci PM, Canzian F, Clipp S, Cotterchio M, Duell EJ, Elena J, Gaziano JM, Giovannucci EL, Goggins M, Hallmans G, Hassan M, Hutchinson A, Hunter DJ, Kooperberg C, Kurtz RC, Liu S, Overvad K, Palli D, Patel AV, Rabe KG, Shu XO, Slimani N, Tobias GS, Trichopoulos D, Van Den Eeden SK, Vineis P, Virtamo J, Wactawski-Wende J, Wolpin BM, Yu H, Yu K, Zeleniuch-Jacquotte A, Chanock SJ, Hoover RN, Hartge P, Kraft P. An absolute risk model to identify individuals at elevated risk for pancreatic cancer in the general population, *PLoS One.* 2013; 8 (9)

Klöppel G. Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer.* 2011; 18(1): 1-16.

Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian SP, Carethers JM, Kunkel TA, Boland CR. Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res.* 1994; 54(16): 4308-4312.

Kondo E, Furukawa T, Yoshinaga K, Kijima H, Semba S, Yatsuoka T, Yokoyama T, Fukushige S, Horii A. Not hMSH2 but hMLH1 is frequently silenced by hypermethylation in endometrial cancer but rarely silenced in pancreatic cancer with microsatellite instability. *Int J Oncol.* 2000; 17(3): 535-541.

Koorstra JB, Feldmann G, Habbe N, Maitra A. Morphogenesis of pancreatic cancer: role of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs). *Langenbecks Arch Surg.* 2008; 393(4): 561-570.

Kopciuk KA, Choi YH, Parkhomenko E, Parfrey P, McLaughlin J, Green J, Briollais L. Penetrance of HNPCC-related cancers in a retrospective cohort of 12 large New-

- foundland families carrying a MSH2 founder mutation: an evaluation using modified segregation models. *Hered Cancer Clin Pract.* 2009; 7(1): 16.
- Krejs GJ. Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors. *Dig Dis.* 2010; 28(2):355-358.
- Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature.* 1996; 383: 832-836.
- Lahue RS, Au KG, Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system. *Science.* 1989; 245(4914): 160-164.
- Latchford A, Greenhalf W, Vitone LJ, Neoptolemos JP, Lancaster GA, Phillips RK. Peutz-Jeghers syndrome and screening for pancreatic cancer. *Br J Surg.* 2006; 93(12): 1446–1455.
- Li D, Yeung SC, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese JL. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2009; 137(2): 482-488.
- Loeb AL, Fox JE, Salk JJ. Mutational Heterogeneity in Human Cancers: Origin and Consequences. *Annu.Rev.Pathol.* 2010; 5: 51-75.
- Loeb LA A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 2001; 61(8): 3230-3239.
- Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia.* 2005; 7(1): 17-23.
- Lu SL, Kawabata M, Imamura T, Akiyama Y, Nomizu T, Miyazono K, Yuasa Y. HNPCC associated with germline mutation in the TGFbeta type II receptor gene (letter): *Nat. Genet.* 1998; 19: 17–18.
- Lüttges J, Beyser K, Pust S, Paulus A, Rüschoff J, Klöppel G. Pancreatic mucinous noncystic (colloid) carcinomas and intraductal papillary mucinous carcinomas are usually microsatellite stable. *Mod Pathol.* 2003; 16(6): 537-542.
- Lüttges J, Diederichs A, Menke MA, Vogel I, Kremer B, Klöppel G. Ductal lesions in patients with chronic pancreatitis show K-ras mutations in a frequency similar to that in the normal pancreas and lack nuclear immunoreactivity for p53. *Cancer.* 2000; 88(11): 2495-2504.
- Lüttges J. What's new? The 2010 WHO classification for tumours of the pancreas. *Pathologe.* 2011; 32(2): 332-336.

Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer*. 1996; 78: 1149–1167.

Lynch SM, Vrieling A, Lubin JH, Kraft P, Mendelsohn JB, Hartge P, Canzian F, Steplowski E, Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *Am J Epidemiol*. 2009;170(4): 403.

Mancuso TF, El-Attar AA. Cohort study of workers exposed to betanaphthylamine and benzidine. *J Occup Med*. 1967; 9: 277-285.

Maple JT, Smyrk TC, Boardman LA, Johnson RA, Thibodeau SN, Chari ST. Defective DNA mismatch repair in long-term (> or =3 years) survivors with pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2005; 5(2-3): 220-227.

Matsuzaki K, Deng G, Tanaka H, Kakar S, Miura S, Kim YS. The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(24 Pt 1): 8564-8569.

Mehigan BJ, Ashman JN, Baker RP, Macdonald A, Greenman J, Monson JR, Cawkwell L. Mismatch repair, p53 and chromosomal aberrations in primary colorectal carcinomas. *Acta Oncol*. 2006; 45(1): 61-66.

Mei M, Deng D, Liu TH, Sang XT, Lu X, Xiang HD, Zhou J, Wu H, Yang Y, Chen J, Lu CM, Chen YJ. Clinical implications of microsatellite instability and MLH1 gene inactivation in sporadic insulinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(9): 3448-3457.

Melcher R, Hartmann E, Zopf W, Herterich S, Wilke P, Müller L, Rosler E, Kudlich T, Al-Taie O, Rosenwald A, Katzenberger T, Scholtka B, Seibold S, Rogoll D, Scheppach W, Scheurlen M, Lührs H. LOH and copy neutral LOH (cnLOH) act as alternative mechanism in sporadic colorectal cancers with chromosomal and microsatellite instability. *Carcinogenesis*. 2011; 32(4): 636-642.

Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Fukayama N, Igarashi S, Kotake K, Matsui T, Koyama Y, Maekawa M, Nagai H. Methylation profile of the MLH1 promoter region and their relationship to colorectal carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003; 36(1): 17-25.

Miyamoto N, Yamamoto H, Taniguchi H, Miyamoto C, Oki M, Adachi Y, Imai K, Shinomura Y. Differential expression of angiogenesis-related genes in human gastric

cancers with and those without high-frequency microsatellite instability. *Cancer Lett.* 2007 28; 254(1): 42-53.

Miyki M, Konishi M, Muraoka M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Iwama T, Mori T, Koike M, Ushio K, Chiba M, Nomizu S, Utsunomiya J. Germ line mutations of hMSH2 and hMLH1 genes in Japanese families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): usefulness of DNA analysis for screening and diagnosis of HNPCC patients. *J Mol Med.* 1995; 73 :515-520.

Modrich P. Mechanisms in eucaryotic mismatch repair. *J Biol Chem.* 2006; 281(41): 30305–30309.

Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE. p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1997; 57: 2140–2143.

Moskovitz AH, Linford NJ, Brentnall TA, Bronner MP, Storer BE, Potter JD, Bell RH Jr, Rabinovitch PS. Chromosomal instability in pancreatic ductal cells from patients with chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Gen Chrom Canc.* 2003; 37(2): 201-206.

Möslein G, Tester DJ, Lindor NM, Honchel R, Cunningham JM, French AH, Halling KC, Schwab M, Goretzki P, Thibodeau SN. Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal Cancer *Hum Mol Genet.* 1996; 5(9): 1245-1252.

Mueller J, Gazzoli I, Bandipalliam P, Garber JE, Syngal S, Kolodner RD. Comprehensive molecular analysis of mismatch repair gene defects in suspected Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) cases. *Cancer Res.* 2009; 69(17): 7053-7061.

Müller K. Prognostische Relevanz von p53 und den Mismatch Repair Genen MLH1 und MSH2 beim kolorektalen Karzinom und deren Bedeutung für den Benefit einer adjuvanten Therapie. Dissertation. Berlin. 2010.

Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, Nishioka N, Tanaka H, Ohira M, Ishikawa T, Nishino H, Hirakawa K. Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2002a; 8(8): 2536-2540.

Nakata B, Yashiro M, Nishioka N, Aya M, Yamada S, Takenaka C, Ohira M, Ishikawa T, Nishino H, Wakasa K, Seki S, Hirakawa K. Very low incidence of microsat-

ellite instability in intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas. *Int J Cancer*. 2002b; 102(6): 655-659.

Nöthlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN. Meat and fat intake as risk factors for pancreatic cancer: the multiethnic cohort study. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(19): 1458-1465.

Nyiraneza C, Jouret-Mourin A, Kartheuser A, Camby P, Plomteux O, Detry R, Dahan K, Sempoux C. Distinctive patterns of p53 protein expression and microsatellite instability in human colorectal cancer. *Hum Pathol*. 2011; 42(12): 1897-1910.

Oettle H, Goerke A, Vogel P. Pankreaskarzinom. Bessere Prognose durch multimodale Therapie. *Best Practice Onkologie*. 2007; 2(3): 4-17.

Oettle H, Heinemann V, Herrmann R, Wörrmann B. Leitlinie Pankreaskarzinom. Stand: August 2010. www.dgho-onkopedia/leitlinien/pankreaskarzinom

Ouyang H, Furukawa T, Abe T, Kato Y, Horii A. The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endometrium. *Clin Cancer Res*. 1998; 4(4): 1071-1074.

Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1995; 55(23): 5548-5550.

Peltomäki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet*. 2001; 10(7): 735-740.

Peltomäki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res*. 2001; 488(1): 77-85.

Perucho M. Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med*. 1996; 6:630-1.

Perucho M. Correspondence re: C.R. Boland et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1999 ;59(1): 249-256.

Pietri F, Clavel F. Occupational exposure and cancer of the pancreas: a review. *British Journal of Industrial Medicine*. 1991; 48: 583-587.

Pino MS, Mino-Kenudson M, Wildemore BM, Ganguly A, Batten J, Sperduti I, Iafrate AJ, Chung DC. Deficient DNA mismatch repair is common in Lynch syndrome-associated colorectal adenomas. *J Mol Diagn.* 2009; 11(3): 238-247.

Plaschke J, Preußler M, Ziegler A, Schackert HK. Aberrant protein expression and frequent allelic loss of MSH3 in colorectal cancer with low-level microsatellite instability. *Int J Colorectal Dis.* 2012; 27(7): 911-919.

Poynter JN, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Long TI, Thibodeau SN, Lindor N, Young J, Jenkins MA, Hopper JL, Baron JA, Buchanan D, Casey G, Levine AJ, Le Marchand L, Gallinger S, Bapat B, Potter JD, Newcomb PA, Haile RW, Laird PW. Colon Cancer Family Registry Investigators. Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLHI promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(11): 3208-3215.

Rindi G, Bordi C. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: etiology, molecular pathogenesis and genetics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005; 19(4): 519-534.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch HT, Perucho M, Smyrk T, Sbin L, Srivastava SA. National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda Guidelines *J Nat Cancer Inst.* 1997; 89: 1758-1762.

Rohrmann S, Linseisen J, Nöthlings U, Overvad K, Egeberg R, Tjønneland A, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Cottet V, Pala et al. Meat and fish consumption and risk of pancreatic cancer: Results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer.* 2012 May 18.

Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 1997; 57(9): 1731-1734.

Rüschhoff J, Dietmaier W, Lüttges J, Seitz G, Bocker T, Zirngibl H et al. Poorly differentiated colonic adenocarcinoma, medullary type. Clinical, phenotypic and molecular characteristics. *Am J Pathol.* 1997; 150: 1815–1825.

S3- Leitlinie “Exokrines Pankreaskarzinom”. 2007. Springer Verlag.

- Saletti P, Edwin ID, Pack K, Cavalli F, Atkin W. Microsatellite instability application in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Ann Oncol* 2001; 12(2): 151-160.
- Samowitz WS, Slattery ML, Potter JD, Leppert MF. BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. *Am J Pathol.* 1999; 154(6): 1637-1641.
- Samuel N, Hudson TJ. The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011; 9(2): 77-87.
- Schlegel Ch, Arens N, Zentgraf H, Bleyl U. Identification of frequent chromosomal aberrations in ductal adenocarcinoma of pancreas by comparative genomic hybridization (CGH); *J Pathol.* 2000; 191: 27-32.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(4): 295-308.
- Schuler M, Green DR. Transcription, apoptosis and p53: catch-22. *Trends Genet.* 2005; 21: 182-187.
- Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, Tariverdian M, Benner A, von Knebel Doeberitz M. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology.* 2008; 134(4):988-97
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16 INK4a. *Cell.* 1997; 88: 593–602.
- Seymour AB, Hruban RH, Redston M, Caldas C, Powell SM, Kinzler KW, Yeo CJ, Kern SE. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma: *Cancer Res.* 1994; 54(10): 2761-2764.
- Shah AN, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU, Gallick GE. Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 3629-3637.
- Shibata D, Peinado MA, Ionov Y et al. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet.* 1994; 6: 273-281.

Sievert JC, Rothmund M, Schumpelick V. *Onkologische Chirurgie. Praxis der Viszeralchirurgie.* Springer Medizin Verlag Heidelberg, 3. Auflage. 2010.

Sinicrope FA, Rego RL, Foster N, Sargent DJ, Windschitl HE, Burgart LJ, Witzig TE, Thibodeau SN. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* 2006; 131 (3): 729–737.

Sinn DH, Chang DK, Kim YH, Rhee PL, Kim JJ, Kim DS, Park CK, Kim JW, Yun SH, Lee WY, Chun HK, Rhee JC. Effectiveness of each Bethesda marker in defining microsatellite instability when screening for Lynch syndrome. *Hepatogastroenterology.* 2009 May-Jun;56(91-92):672-6.

Søreide K. High-fidelity of five quasimonomorphic mononucleotide repeats to high-frequency microsatellite instability distribution in early-stage adenocarcinoma of the colon. *Anticancer Res.* 2011; 31(3): 967-971.

Sponsiello-Wang Z, Weitkunat R, Lee PN. Systematic review of the relation between smokeless tobacco and cancer of the pancreas in Europe and North America. *BMC Cancer.* 2008, 8: 356.

Stoecklein N, Erbersdobler A, Schmidt-Kittler O, Diebold J, Schardt A. SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *Am J Pathol.* 2003; 163(6): 2645.

Stoecklein NH, Luebke AM, Erbersdobler A, Knoefel WT, Schraut W, Verde PE, Stern F, Scheunemann P, Peiper M, Eisenberger CF, Izbicki JR, Klein CA, Hosch SB. Copy number of chromosome 17 but not HER2 amplification predicts clinical outcome of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2004; 22(23): 4737-4745.

Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature.* 1993; 365(6443): 274-276. Erratum in: *Nature.* 1994; 368(6471); 569.

Sugai T, Takahashi H, Habano W, Nakamura S, Sato K, Orii S, Suzuki K. Analysis of genetic alterations, classified according to their DNA ploidy pattern, in the progression of colorectal adenomas and early colorectal carcinomas. *J Pathol.* 2003; 200(2): 168-176.

Sugio K, Molberg K, Albores-Saavedra J, Virmani AK, Kishimoto Y, Gazdar AF. K-ras mutations and allelic loss at 5q and 18q in the development of human pancreatic cancers. *Int J Pancreatol.* 1997; 21(3): 205-217.

Tannapfel A. Präkanzerosen und molekulare Marker. In: Sievert et al. *Onkologische Chirurgie*, Springer Verlag. 2010. 17.

Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, Adsay V, Abrams RA, Cameron JL, Kern SE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(12): 4115-4121.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993; 260(5109): 816-819.

Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, McDonnell SK, Schaid DJ, Vockley CW, Michels VV, Farr GH Jr, O'Connell MJ. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res.* 1998; 58(8):1713-8

Tomaszewska R, Okoń K, Stachura J. Expression of the DNA mismatch repair proteins (hMLH1 and hMSH2) in infiltrating pancreatic cancer and its relation to some phenotypic features. *Pol J Pathol.* 2003;54(1):31-7.

Tsai MH, Fang WH, Lin SW, Yen SJ, Chou SJ, Yang YC. Mitochondrial genomic instability in colorectal cancer: no correlation to nuclear microsatellite instability and allelic deletion of hMSH2, hMLH1, and p53 genes, but prediction of better survival for Dukes' stage C disease. *Ann Surg Oncol.* 2009; 16(10): 2918-2925.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(4): 261-268.

van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, Offerhaus GJ, Hicks JL, Wilentz RE, Goggins MG, De Marzo AM, Hruban RH, Maitra A. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol.* 2002; 161(5): 1541-1547.

Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(15): 8698-8702.

Vincent A, Omura N, Hong SM, Jaffe A, Eshleman J, Goggins M. Genome-wide analysis of promoter methylation associated with gene expression profile in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(13): 4341-4354.

Vitone LJ, Greenhalf W, McFaul CD, Ghaneh P, Neoptolemos JP. The inherited genetics of pancreatic cancer and prospects for secondary screening. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006; 20(2): 253-283.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988; 319 (9): 525-532.

Vousden KH, Prives C. P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell*. 2005; 120: 7-10.

Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. *Genome Res*. 2012; 22(2): 208-219.

Wang Z, Li Y, Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Azmi AS, Ali S, Abbruzzese JL, Galllick GE, Sarkar FH. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Res*. 2009; 69: 2400-2407.

Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB 3rd, Hamilton SR. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2001; 344(16): 1196-1206.

Westgaard A, Tafjord S, Farstad IN, Cvancarova M, Eide TJ, Mathisen O, Clausen OP, Gladhaug IP. Resectable adenocarcinomas in the pancreatic head: the retroperitoneal resection margin is an independent prognostic factor. *BMC Cancer*. 2008; 8: 5.

Wilentz RE, Chung CH, Sturm PD, Musler A, Sohn TA, Offerhaus GJ, Yeo CJ, Hruban RH, Slebos RJ. K-ras mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer*. 1998; 82(1): 96-103.

Wilentz RE, Goggins M, Redston M, Marcus VA, Adsay NV, Sohn TA, Kadkol SS, Yeo CJ, Choti M, Zahurak M, Johnson K, Tascilar M, Offerhaus GJ, Hruban RH, Kern SE. Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity. *Am J Pathol*. 2000; 156(5): 1641-1651.

Wilentz RE, Argani P, Hruban RH. Loss of heterozygosity or intragenic mutation, which comes first? *Am J Pathol*. 2001; 158(5): 1561-1563.

Yamamoto H, Itoh F, Nakamura H, Fukushima H, Sasaki S, Perucho M, Imai K. Genetic and clinical features of human pancreatic ductal adenocarcinomas with widespread microsatellite instability. *Cancer Res*. 2001a; 61(7): 3139-3144.

Yamamoto N, Noma H, Shibahara T. Allelic imbalance on the long arm of chromosome 21 in human oral squamous cell carcinoma: relationship between allelic imbalances (LOH and MSI) and clinicopathologic features. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2001b; 42(4): 211-223.

Yamano M, Fujii H, Takagaki T, Kadowaki N, Watanabe H, Shirai T. Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol*. 2000; 156(6): 2123-2133.

Yanamadala S, Ljungman M. Potential role of MLH1 in the induction of p53 and apoptosis by blocking transcription on damaged DNA templates. *Mol Cancer Res*. 2003; 1(10): 747-754.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein, der durch stete Betreuung und kritische Anregung bis zuletzt zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Mit viel Geduld und Ausdauer hat er sich immer wieder aufs Neue engagiert. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel danke ich für die Möglichkeit und Unterstützung, so dass ich die Arbeiten im Chirurgischen Forschungslabor durchführen konnte.

Ganz besonders danken möchte ich, für die Einführung und für die Unterstützung bei der PCR-Analytik und der Sequenzierung, Herrn PD Dr. rer. nat. Karl-Ludwig Schäfer vom Institut für Pathologie.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Poremba und den Mitarbeitern des Labors des Instituts für Pathologie für die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen und die Nutzung des Labors.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei den Mitarbeitern des Chirurgischen Forschungslabors für die fortwährende Nutzung und dauernde Unterstützung.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern und Geschwistern für ihre Unterstützung und bedingungslose Liebe in allen Lebenslagen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

