

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Prävalenz und prognostische Wertigkeit von *K-ras* Codon 12-Genmutationen und des molekularen Phänotyps der Mikrosatelliteninstabilität im duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Anna Maria Brecht
aus Köln

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. G. Schumacher

2. Prof. Dr. med. J.-M. Langrehr

3. Prof. Dr. B. Brücher

Datum der Promotion: 27.03.09

Inhalt:

1. Einleitung	S.8
1.1 Die Krebserkrankung	S.8
1.2 Das Protoonkogen <i>K-ras</i> , Codon 12 (<i>K-ras^{Cod12}</i>)	S.10
1.3 <i>MMR</i> -Gendefekte und der molekulare Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität: Genetische Instabilität auf Nukleotidebene	S.13
1.4 Das Pankreaskarzinom	S.16
1.4.1 Epidemiologie	S.16
1.4.2 Symptome und Ätiologie	S.17
1.4.3 Staging und Diagnose	S.18
1.4.4 Behandlungsmöglichkeiten	S.20
1.4.5 Pathologie	S.21
1.4.6 Vorläuferläsionen	S.22
1.4.7 Protoonkogene und Tumorsuppressorgene in der pankreatischen Onkogenese	S.25
1.4.8 Der molekulare MSI-Phänotyp und <i>MMR</i> -Defekte in der pankreatischen Onkogenese	S.26
2. Zielsetzung	S.28
3. Material und Methoden	S.30
3.1 Patientenauswahl und Probengewinnung	S.30
3.2 Deparaffinierung, Extraktion und Purifikation der DNA	S.31
3.3 Molekulargenetische Analyse des molekularen Phänotyps der Mikrosatelliteninstabilität (MSI)	S.32

3.3.1	Analyse von Längenveränderungen der Mikrosatellitenloki	S.32
3.3.2	Analyse der <i>mismatch repair</i> -Proteine	S.36
3.4	Mutationsanalyse des Codons 12 des Protoonkogens <i>K-ras</i> (<i>K-ras^{Cod12}</i>)	S.36
3.5	Statistische Analysen	S.40
4. Ergebnisse		S.40
4.1	Demographische und klinisch-pathologische Charakterisierung der Patientenkollektive	S.40
4.2	Überlebensanalyse der Patientenserien	S.43
4.2.1	Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs	S.43
4.2.2	Überlebensanalyse beider Patientenserien im Vergleich	S.44
4.3	Überlebensanalyse in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Parametern	S.45
4.3.1	Lokale Tumorexpanansion (T) und postoperatives Überleben	S.45
4.3.2	Lymphknotenstatus (N) und postoperatives Überleben	S.46
4.3.3	AJCC-Stadieneinteilung und postoperatives Überleben	S.47
4.3.4	Differenzierungsgrad (G) und postoperatives Überleben	S.48
4.3.5	OP-Radikalität (R) und postoperatives Überleben	S.50
4.3.6	Multivariate Überlebensanalyse der klinisch-pathologischen und molekularbiologischen Parameter	S.51
4.4	<i>K-ras^{Cod12}</i> -Mutationsanalyse	S.52
4.4.1	<i>K-ras^{Cod12}</i> -Mutationsfrequenz und klinisch-pathologische Beschreibung der beiden Patientenkollektive nach <i>K-ras^{Cod12}</i> -Mutationsstatus	S.52
4.4.2	Tumorexpanansion, Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung, Stadieneinteilung und Differenzierungsgrad der <i>K-ras^{Cod12}</i> -Mutationsträger und der <i>K-ras^{Cod12}</i> <i>wild type</i> Genotypen	S.52
4.4.3	Überlebensanalyse der <i>K-ras^{Cod12}</i> -Mutationsträgern und <i>K-ras^{Cod12}</i> <i>wild type</i> Genotypen	S.56

4.5	Längenveränderungen des Mikrosatellitenmarkers <i>BAT25</i>	S.62
4.5.1	Follow up, demographische und klinisch-pathologische Beschreibung der <i>BAT25</i> -instabilen Patienten	S.62
4.5.2	Immunhistochemische Analyse der <i>BAT25</i> -instabilen Fälle	S.63
4.6	Mikrosatelliteninstabilität des Pankreaskarzinoms: Längenveränderungen an <i>BAT25</i> und <i>BAT26</i>	S.63
4.6.1	Fallbeschreibung und histopathologische Charakterisierung	S.63
4.6.2	Immunhistochemische Analyse der <i>mismatch repair</i> -Proteine des <i>BAT25</i> und <i>BAT26</i> instabilen, MSI-positiven Falles	S.65
<u>5. Diskussion</u>		S.67
5.1	Die prognostische Wertigkeit histopathologischer Parameter nach der TNM- Klassifikation	S.67
5.2	<i>K-ras</i> -Mutationen und Überleben	S.69
5.3	Mikrosatelliteninstabilität und DNA-Reparaturdefekte im Adenokarzinom des Pankreas	S.73
5.4	<i>Shifts</i> des Mikrosatellitenmarkers <i>BAT25</i>	S.79
<u>6. Zusammenfassung</u>		S.81
<u>7. Literatur</u>		S.85
<u>Danksagung</u>		S.97
<u>Erklärung an Eides Statt</u>		S.97
<u>Lebenslauf</u>		S.98

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
bp	base pairs
kD	kiloDalton
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
<i>MMR-</i>	<i>mismatch repair-</i>
TGFβIIIR	Tumor growth factor beta II rezeptor
IGFII	insulin-like growth factor II
<i>hMLH1</i>	<i>human mutL homologue 1</i>
<i>hMSH2</i>	<i>human mutS homologue 2</i>
<i>hMSH6</i>	<i>human mutS homologue 6</i>
<i>PMS2</i>	<i>postmeiotic segregation increased 2</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer
BMI	Body mass index
FAMMM-PC	familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic cancer
AJCC	American Joint Committee on Cancer
CT	Computertomographie
EUS	Endoskopischer Ultraschall
MRT	Magnetresonanztomographie
PET	Positronen-Emissionstomographie
IDUS	Intraduktale Ultrasonographie
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
CEA	Karzinoembryogenes Antigen
PPPD	Partielle pyloruserhaltende Pankreatoduodenektomie

PTCD	Perkutane transhepatische Gallengangsdrainage
NCI	National Cancer Institute
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
<i>wt</i>	<i>wild type</i>
HER2/neu	human epidermal growth receptor 2
rpm	Umdrehungen pro Minute
PCR	Polymerasekettenreaktion
dNTPs	Dinukleotidtriphosphate
pmol	pikomol
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
MSS	mikrosatellitenstabil
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
BSA	Bovines Serumalbumin

1. Einleitung

1.1 Die Krebserkrankung

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 424 000 Menschen an Krebs, davon rund 218 000 Männer und 206 000 Frauen (Robert Koch-Institut¹). Obwohl verbesserte Behandlungs- und Früherkennungsmethoden zu einem Rückgang der altersbereinigten Krebssterblichkeit geführt haben, nimmt die absolute Zahl der Krebstodesfälle bedingt durch die steigende Lebenserwartung der deutschen Bevölkerung weiterhin zu. Momentan stirbt ungefähr jeder Vierte an den Folgen einer Krebserkrankung, während jeder Dritte an Krankheiten des Herzkreislaufsystems verstirbt. Damit stehen die bösartigen Neoplasien nach den Herz-Kreislaufkrankungen weiterhin an zweiter Stelle der Todesursachenstatistik in Deutschland. Da aber die Herz-Kreislaufkrankungen einen wesentlich stärkeren Mortalitätsrückgang verzeichnen, könnten die bösartigen Neoplasien bereits in 15-20 Jahren die Todesursachenstatistik in Deutschland anführen (DKFZ²).

Krebserkrankungen umfassen ein breites Spektrum von über 100 Erkrankungsformen, die in Bezug auf Überlebensraten, Behandlungsmöglichkeiten und Ursachen sehr heterogen sind. Neben exogenen Risikofaktoren gewinnen aufgrund verbesserter molekularbiologischer Untersuchungstechniken und neuer Erkenntnisse hereditäre Faktoren im Rahmen einer familiären Disposition in zunehmendem Maße Bedeutung im Verständnis der Onkogenese (beispielsweise das BRCA2-Brustkrebsgen).

Für die Entstehung einer Krebskrankheit ist in der Regel jedoch nicht nur eine Ursache verantwortlich. Die Genese ist vielmehr multifaktoriell durch Einwirkung verschiedener endogener und/oder exogener Faktoren, die eine Schädigung des genetischen Materials in wachstumsregulierenden Abschnitten der DNA mit den Folgen ungehemmter Wachstums- und Differenzierungsvorgänge der geschädigten Zelle (klonale Expansion) nach sich ziehen. Gemeinsam ist den malignen Neoplasien eine erhöhte genetische Instabilität, die durch Veränderungen oder Verlusten auf chromosomaler, allelischer oder Nukleotidebene gekennzeichnet ist und sowohl in hereditären als auch sporadischen Formen vorkommt.

Unter den exogenen Ursachen stellt das Zigarettenrauchen den bedeutendsten Risikofaktor dar und macht in Deutschland 25-30 % der Krebstodesfälle aus. Ein ähnlich großer Anteil aller

Krebstodesfälle von 20-40 % ist mit falschen Ernährungsgewohnheiten (ein zu hoher Anteil tierischer Fette, zu wenig Ballaststoffe, Vitamine und Mineralien) assoziiert. Alkoholmissbrauch und virale Infektionen nehmen in Deutschland dagegen mit 5 % bzw. 3 % eine eher untergeordnete Rolle ein. Schädigende Umwelteinflüsse und chemische und physikalische Noxen (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Benzol, Nitrosamine, UV-Licht) durch berufliche Exposition scheinen ebenfalls kanzerogene Wirkungen zu haben (DKFZ²).

Spontanmutationen, Einwirkungen dieser exogenen Noxen sowie endogener Faktoren können zu mono- oder biallelischen Veränderungen von wachstumsregulierenden Genabschnitten, den sogenannten Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen, führen. Diese Gene sind für die Regulation und Kontrolle des Zellzyklus und für das Gleichgewicht proliferationsstimulierender und wachstumshemmender Faktoren zuständig. Fallen diese regulatorischen Steuerungsmechanismen aus, kommt es zu unkontrollierten und autonomen Zellteilungs-, Wachstums- und Differenzierungsprozessen und verminderter Hemm- und Apoptoseaktivität. Tumorzellen entstehen, gekennzeichnet durch genetische Instabilität, klonale Expansion und invasiv-destruierendes Wachstum.

Protoonkogene kommen physiologischerweise in jeder Zelle vor und nehmen dort wichtige zellregulatorische Funktionen wahr. Die Genprodukte der meisten Protoonkogene sind Bestandteile mitogener, die Zellteilung stimulierender Signaltransduktionswege wie Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, G-Proteine, Proteinkinasen und nukleäre Transkriptionsfaktoren. Sie vermitteln die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Expression bestimmter proliferationsfördernder Gene. Mutationen in Protoonkogenen wirken dominant und führen zu ihrer Umwandlung in zelluläre Onkogene (c-Onkogene). Es kommt zu einer ständigen Aktivitätssteigerung oder erhöhten Expressionsrate von Onkoproteinen und zu einer gestörten Kontrolle normaler Wachstums- und Differenzierungsprozesse.

Tumorsuppressorgene greifen ebenfalls regulierend in den Zellzyklus ein. Sie kodieren für Proteine, die die Expression von Wachstumsfaktoren hemmen, den Zellzyklus arrestieren und bei irreparablen Schäden der DNA die Apoptose einleiten können. Mutationen müssen hier biallelisch vorliegen, um phänotypisch wirksam zu werden. Hereditäre Fälle, in denen ein verändertes Allel bereits vererbt vorliegt, sind bei einer weiteren exogenen Mutation (*second hit*-Theorie nach Knudson³) besonders prädisponiert für eine maligne Entartung (Xeroderma pigmentosum, BRCA2-Mammakarzinom).

Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 69 Jahren (GEKID⁴) gehören die malignen Neoplasien zu den typischen Alterserkrankungen in Deutschland. Das späte mittlere Erkrankungsalter unterstützt das 1988 von Vogelstein entwickelte Tumorprogressionsmodell, das eine schrittweise Adenom-Karzinom-Sequenz im kolorektalen Karzinom aufgrund von sequenziellen Akkumulationen von Mutationen beschreibt. Laut dieser Multistep-Hypothese ist eine bestimmte Anzahl von sequenziellen Veränderungen in wachstumsregulierenden Genabschnitten, den Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen, erforderlich, um eine maligne Entartung einer Zelle auszulösen und zu einer klonalen Expansion und zu unkontrolliertem Wachstum zu führen (Vogelstein et al.⁵; Cho, Vogelstein⁶).

Tumorzellen, die auf Mutationen in den Protoonko- und Tumorsuppressorgenen beruhen, sind häufig aneuploid und zeigen Veränderungen auf chromosomaler oder allelischer Ebene (chromosomale Instabilität). Diese Form von genetischer Instabilität, gekennzeichnet durch Allelverlust und chromosomale Veränderungen, wird auch als „Loss of heterozygosity“ (LOH)-Phänotyp bezeichnet.

In den letzten Jahren hat eine neue und weniger gut untersuchte Form von genetischer Instabilität an Bedeutung im Verständnis der Karzinogenese gewonnen. Neben Veränderungen auf chromosomaler Ebene und allelischer Verluste wurden 1993 erstmals in kolorektalen Karzinomen subchromosomale Veränderungen in Form von Deletionen oder Insertionen auf Nukleotidebene beschrieben (Thibodeau, Bren, Schaid⁷; Ionov et al.⁸; Aaltonen et al⁹). Diese Längenveränderungen in kurzen repetitiven Nukleotidsequenzen sind kennzeichnend für den molekularen Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität und sind Folge eines defekten DNA-Reparatursystems.

1.2 Das Protoonkogen *K-ras*, Codon 12 (*K-ras*^{Cod12})

Die karzinogene Wirkung des *K-ras* Onkogens wurde erstmals im Jahr 1982 beschrieben (Der, Krontiris, Cooper¹⁰).

Das Codon 12 des *K-ras* Protoonkogen ist auf Chromosom 12p12, Exon 1 lokalisiert und umfaßt rund 45 000 bp (Mu, Peng, Xu¹¹). Sein Genprodukt, ein 188-189 Aminosäure und 21 kD großes Protein, nimmt im Zellverband vor allem eine proliferationsstimulierende und differenzierungssteuernde Funktion wahr.

Das *K-ras* Protein gehört zu der Familie der monomeren G-Proteine (= kleine G-Proteine), die Wachstums- und Differenzierungsprozesse vermitteln. Sie sind Bestandteil mehrerer mitogener Signaltransduktionswege, unter anderem der Ras-Raf-MEK-ERK-Kinase-Signalkaskade (s. Abbildung 1). Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren binden an spezifische extrazelluläre Rezeptoren und vermitteln über eine Zustandsänderung des Rezeptorkomplexes aktivierende Effekte auf das in der Zellmembran lokalisierte G-Protein (*Ras*-Protein). Das so aktivierte *Ras*-Protein leitet die stimulierenden Signale über mehr als 20 verschiedene Targetmoleküle an den Zellkern weiter und bewirkt, dass sich letztendlich Transkriptionsfaktoren an regulatorische Elemente der DNA binden und die Expression von Genen stimulieren, deren Produkte für die Zellteilung und -differenzierung notwendig sind. Das *Ras*-Protein vermittelt also über die Aktivierung von intrazellulären Proteinkinasen die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Expression proliferationsfördernder Genabschnitte (Kolch¹²).

Das *Ras*-Protein liegt in seiner inaktiven Grundform an Guanosindiphosphat (GDP) gebunden in der Zellmembran vor. Die Aktivierung des Rezeptorkomplexes bewirkt eine Bindung des *Ras*-Proteins an Guanosintriphosphat (GTP) und somit den Übergang in seine aktivierte, proliferationsfördernde Form. Erlöschen externe Stimuli, z.B. Wachstumsfaktoren, sorgt die intrinsische GTPase-Funktion der *Ras*-Proteine selbst für eine Nukleotidabspaltung des GTPs und für den erneuten Übergang in seine inaktive, an GDP gebundene Form (Ghaneh, Costello, Neoptolemos¹³).

Führen exogene oder endogene Einflüsse zu einer aktivierenden (*gain of function*-) Mutation des *K-ras* Gens, verliert das *Ras*-Protein seine intrinsische GTP-ase Aktivität und akkumuliert in der Zelle als aktivierte, GTP-gebundene Form. Das *Ras*-Protein wird so zu einem konstitutiven Signalgeber, der unabhängig von äußeren Stimuli zu einer ständigen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt. Die Folge ist das Entstehen eines maligne entarteten Zellverbandes, gekennzeichnet durch klonale Expansion, gesteigerte Proliferation und unkontrollierte Zelldifferenzierung (Schubbert, Shannon, Bollag¹⁴).

Die Ras-Raf-Mitogen-aktivierte und extrazellulär-regulierte-Kinase (MEK)-extrazellulär-Signal-regulierte-Kinase (ERK)-Kaskade wirkt proliferationssteigernd und ist häufig dereguliert in bestimmten Karzinomen, wie zum Beispiel dem Pankreaskarzinom. *Ras* aktiviert auch den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-3-phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1)-Akt-Transduktionsweg, der sich auf das zelluläre Überleben auswirkt. Die einzelnen, von *Ras* vermittelten Signaltransduktionskaskaden sind in Abbildung 1 dargestellt.

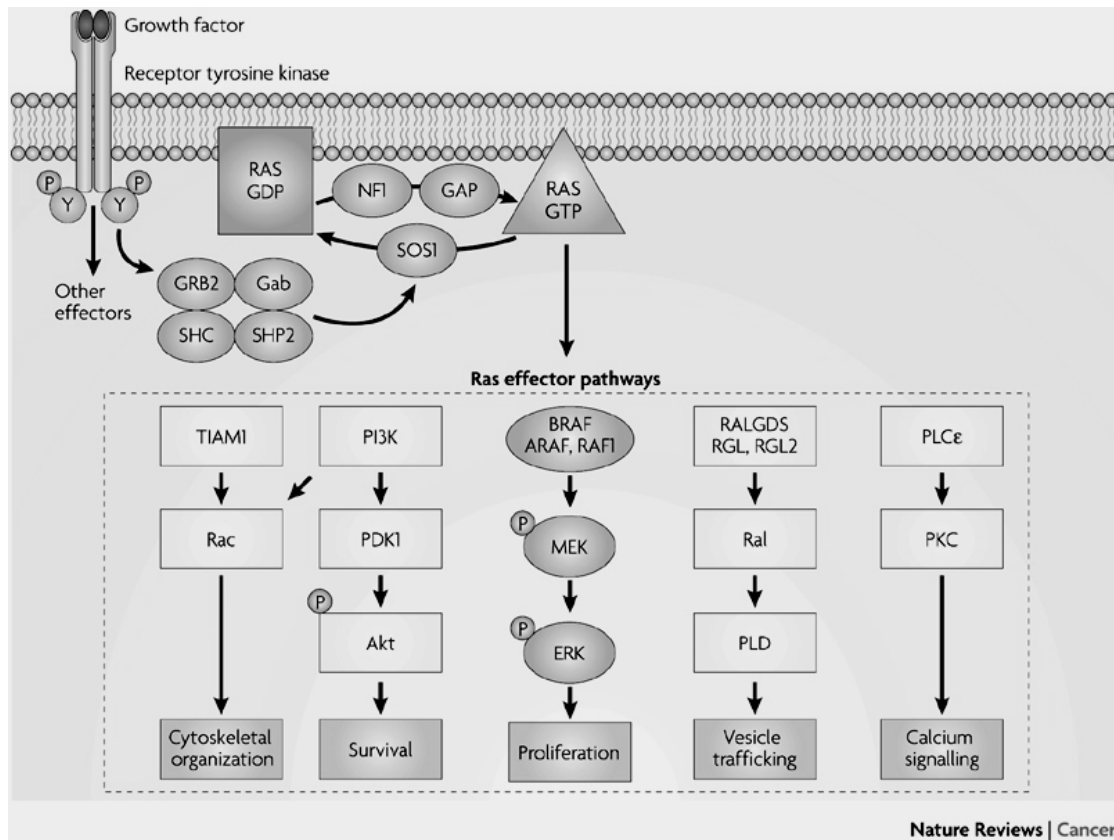


Abbildung 1: Der *K-ras* Signaltransduktionsweg. Das *Ras*-Protein greift regulatorisch über die Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren in die Zellproliferation und das zelluläre Überleben ein. Aus Schubbert, Shannon, Bollag. Hyperactive Ras in development of disorders and cancer. Nature Reviews, Volume 7, April 2007¹⁴.

Aktivierende *K-ras* Mutationen kann man in etwa 17-25 % aller Neoplasien finden. Sie machen damit die häufigste Neoplasie-assoziierte Mutation aus (NCBI¹⁵). Neben Kolon-, Gallenwegs-, Lungen- und Ovarialkarzinomen findet sich die weitaus größte *K-ras* Mutationsrate im duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Rund 75 % der duktalem Adenokarzinome des Pankreas weisen aktivierende Punktmutationen auf dem Codon 12 auf (Hruban et al.¹⁶; Wilentz et al.¹⁷; Slebos et al.¹⁸).

Der weitaus größte Anteil von *K-ras* Mutationen ist auf Codon 12 lokalisiert, vereinzelt finden sich auch Mutationen auf Codon 13 und 61. Es handelt sich überwiegend um somatische, seltener um Keimbahnmutationen. Sie bestehen in den meisten Fällen in der Substitution von einzelnen Basenpaaren (Punktmutation), die ein in der Aminosäuresequenz verändertes Onkoprotein entstehen lässt (Mu, Peng, Xu¹¹).

1.3 *MMR*-Gendefekte und der molekulare Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität: Genetische Instabilität auf Nukleotidebene

Mikrosatelliten sind simple repetitive Sequenzen von 1-5 Nukleotidmotiven, die über das ganze menschliche Genom verteilt sind. Sie liegen meist in intronischen oder intergenischen DNA-Abschnitten, finden sich aber auch als einfaches Sequenzmotiv in kodierenden Regionen bestimmter genomstabilisierender und -erhaltender Genabschnitte (z.B. TGF β IIR, IGFII).

Aufgrund ihrer repetitiven Struktur sind Mikrosatelliten besonders prädisponiert für Fehler der DNA-Polymerase durch *strand-slippage* und *misalignment* während der Replikation (Zhou et al.¹⁹; Sammalkorpi et al.²⁰). Diese Replikationsfehler werden normalerweise durch das DNA-Reparatursystem, oder *mismatch repair*-(*MMR*-) System, korrigiert, um die genomische Integrität eines Organismus aufrechtzuerhalten. In Präsenz eines defekten *MMR*-Systems ohne adäquate Expression bestimmter Reparaturproteine werden diese kleinen Insertionen oder Deletionen nicht korrigiert und bei jeder Replikation an die Tochterzelle weitergegeben. Vor allem Defekte der Reparaturproteine *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* und *PMS2* spielen in der Karzinogenese eines *MMR*-defizienten Tumors eine Rolle und sind kennzeichnend für den molekularen Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität (Modrich, Lahue²¹).

Im Jahr 1993 wurde der MSI-Phänotyp erstmals von drei unabhängigen Forschergruppen als besonderes molekulares Merkmal in den meisten Fällen des familiären HNPCC-(hereditary non-polyposis colorectal cancer-) Syndroms sowie in rund 13 % aller sporadischer kolorektalen Karzinome beschrieben. Diese Tumoren zeigen ein besonderes molekulargenetisches Profil verbunden mit einer günstigeren Prognose und einem besseren Langzeitüberleben sowie mit besonderen klinischen und histopathologischen Ausprägungen (Thibodeau, Bren, Schaid⁷; Ionov et al.⁸; Aaltonen et al.⁹).

Verschiedene darauffolgende Publikationen konnten die Entwicklung dieses speziellen molekularen Phänotyps, gekennzeichnet durch Längenveränderungen intergenischer Mikrosatelliten, ursächlich mit einem defizienten DNA-Reparatursystem in Verbindung bringen (Fishel et al.²²; Strand et al.²³).

Die *MMR*-Gene sind lokalisiert auf den Chromosomen 3p21 (*hMLH1*) und 2p16 (*hMSH2* und *hMSH6*). Ihre Genprodukte, die *MMR*-Proteine, reparieren Basenfehlpaarungen sowie kleine Insertionen oder Deletionen, die besonders häufig während der Replikation in simplen, repetitiven Sequenzen (z.B. Poly-Adenin-Wiederholungen) vorkommen. In einer Studie, in der

der Zusammenhang zwischen dem MSI-Phänotyp und DNA-Reparaturdefekte untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass der molekulare MSI-Phänotyp bei transgenerischer Übertragung von Chromosom 3 und damit der intakten *MMR*-Gene reversibel ist und die Zellen ihr genomisches Gleichgewicht wiederfinden (Koi et al.²⁴).

Bei Vorliegen des familiären HNPCC-Syndroms führen hereditäre heterozygote Mutationen eines der *MMR*-Gene in der Keimbahn in Verbindung mit einer weiteren somatischen Mutation des zweiten Allels in den meisten Fällen zur Expression eines trunkierten *MMR*-Proteins. Replikationsfehler werden aufgrund dieses Defektes nicht mehr korrigiert und Längenveränderungen in repetitiven Sequenzen, den Mikrosatelliten, akkumulieren. Auch *de novo* Punktmutationen sind nach heutiger Annahme von Defekten des *MMR*-Systems betroffen und akkumulieren mit jeder Replikation. Die Folge ist eine erhöhte genomweite, genetische Instabilität mit erhöhter Mutationsanfälligkeit und Mutationsrate anderer Gene, die genomstabilisierende oder wachstumsregulierende Funktionen einnehmen können. Mutationen der *MMR*-Gene führen also selbst wiederum zu neuen Mutationen an anderen Genorten, die eine maligne Zellentartung und eine Karzinogenese bewirken können. Aufgrund dieses mutagenen Potentials wird der MSI-Phänotyp deswegen auch als „Mutatorphänotyp“ bezeichnet (Loeb²⁵; de la Chapelle²⁶, Perucho²⁷). In sporadischen Fällen spielt vor allem eine biallelische, epigenetische Stilllegung des *hMLH1*-Gens durch Hypermethylierung der Promoterregion mit der Folge eines defekten Reparaturmechanismus eine Rolle (Liu et al.²⁸; Veigl et al.²⁹).

Längenveränderungen an Mikrosatellitenloki kennzeichnen also ein defektes DNA-Reparatursystem, was aufgrund der unzureichenden Korrektur von Replikationsfehlern zu genetischer Instabilität führt. Dieser sogenannte Mutatorphänotyp führt nach heutigem Verständnis zu einer rund 1000-fach erhöhten Rate von spontanen Genmutationen, die eine erhöhte Mutationsrate in weiteren genomweiten Allelen nach sich zieht (Eshleman et al.³⁰; Bhattacharyya et al.³¹; Bertholon et al.³²). In Präsenz eines defekten *mismatch repair*-Systems werden wahrscheinlich auch *de novo* Mutationen an beliebigen Genorten nicht repariert und durch klonale Expansion an die jeweilige Tochtergeneration weitergegeben. Dabei könnten unter anderem Gene betroffen sein, die an dem Mehrschrittprozess der Tumorentstehung beteiligt sind und so entscheidend die Karzinogenese beeinflussen.

Zur Testung des MSI-Phänotyps werden verschiedene Nukleotidmarker verwendet, die besonders häufig bei vorliegenden Defekten des DNA-Reparatursystems in ihrer Länge verändert sind. In der Vergangenheit ist auf diesem Feld durch die uneinheitliche Verwendung

verschiedener Marker Verwirrung bezüglich Prävalenz und Signifikanz geschaffen worden. Der bis vor kurzem noch häufig verwendete Terminus „MSI-low (MSI-L)“-Phänotyp beschreibt Längenveränderungen an wenigen Mikrosatellitenloki (zum Beispiel Cytosin-Adenin-(CA-)Wiederholungen), die aus polymorphen und im Vergleich zu Mononukleotidabschnitten (beispielsweise 25 Thymidin-Wiederholungen) instabileren Dinukleotidwiederholungen bestehen. Dieser Phänotyp zeigt weder eine Korrelation mit einem defekten *MMR*-System noch besondere klinische, pathologische oder molekularbiologische Ausprägungen. Es ist daher davon auszugehen, dass dieser molekular Subtyp in der Vergangenheit fälschlicherweise als Mikrosatelliteninstabilität interpretiert wurde. Der Begriff des MSI-low-Phänotyps gilt deswegen nach heutigem Wissensstand als obsolet (Umar et al.³³; Perucho³⁴).

Die MSI-Marker *BAT25* und *BAT26* sind nach heutigem Wissensstand quasimonomorphe und interindividuell stabile Mikrosatellitenloki. Längenveränderungen an diesen Genorten weisen laut verschiedener Studien das Vorliegen des genomweiten MSI-Phänotyps („MSI-high, MSI-H“) zu 99,5 % nach (Zhou et al.³⁵, Hoang et al.³⁶, Zhou et al.³⁷). Dieser MSI-Phänotyp ist ursächlich mit einem defekten *MMR*-System verbunden und weist spezifische histopathologische, klinische und molekularbiologische Parameter auf. Kolorektale Karzinome mit einem MSI-positiven Phänotyp sind gekennzeichnet durch eine bessere Prognose, eine geringere Wahrscheinlichkeit von Metastasen und besondere pathologische Merkmale wie geringe Differenzierung und invasives Wachstum. Häufig finden sich in der Familie andere Fälle einer malignen Erkrankung.

Aufgrund der spezifischen und sensitiven Natur von *BAT25* und *BAT26* wurden diese beiden Mononukleotidmarker in den letzten Jahren häufig den Dinukleotidmarkern vorgezogen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden (Brennetot et al.³⁸).

1.4 Das Pankreaskarzinom

1.4.1 Epidemiologie

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas gehört zu den Tumorerkrankungen mit der schlechtesten Prognose. Trotz signifikanter Fortschritte im Verständnis der Karzinogenese auf molekularbiologischer Ebene haben sich die Überlebensraten seit der Erstbeschreibung des Pankreaskarzinoms im Jahr 1936 durch Mondier nicht entscheidend verbessert (Hiddemann, Huber, Batram³⁹). Mit einer gesamten 5-Jahresüberlebensrate von unter 4 % ist die Prognose ausgesprochen ungünstig. Liegt eine palliative Situation bei fortgeschrittenen, nicht-resektablen Stadien vor, sinkt sie sogar auf unter 1 % mit einer mittleren Überlebenszeit von 4-6 Monaten (Schneider, Lersch, Schmid⁴⁰). Da das Pankreaskarzinom meistens erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, kommt eine kurative Resektion in lediglich 10-20 % der Fälle in Frage (Moore et al.⁴¹; Michl et al.⁴²). Neueste Daten aus dem Jahr 2008 zeigen eine deutlich gesunkene perioperative Mortalitätsrate nach Pankreatoduodenektomie seit den 70-er Jahren und eine leicht ansteigende, postoperative 5-Jahresüberlebensrate seit dem Jahr 1990 bis heute (Garcea et al.⁴³).

Schätzungen zufolge erkrankten in Deutschland im Jahr 2002 etwa 12.600 Menschen an einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Männer (6000) sind davon ungefähr so häufig betroffen wie Frauen (6600) (GEKID⁴). Die Inzidenzrate des Pankreaskarzinoms beträgt damit rund 12/100 000 (Männer) und 9/100 000 (Frauen).

Mit einem Anteil von nur 3 % aller Neoplasien gehört das Pankreaskarzinom zu den seltenen Krebserkrankungen in Deutschland. Aufgrund seiner aggressiven Natur und ausgesprochen ungünstigen Prognose macht es jedoch rund 6,1 % aller Krebstodesfälle aus und steht damit an vierter Stelle aller Tumor-assoziierten Sterbefälle in Deutschland (GEKID⁴).

In der Todesursachenstatistik rangiert das Pankreaskarzinom mit rund 12.800 Verstorbenen im Jahr 2002 an 5. Stelle. Damit liegt die jährliche Inzidenz annähernd so hoch wie die jährliche Mortalitätsrate (12/100.000 Männer, 8,77/100 000 Frauen). Der Lealitätsindex liegt damit bei etwa 100 % und spiegelt die ausgesprochen schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms wieder (S3-Leitlinie⁴⁴).

1.4.2 Symptome und Ätiologie

Die Symptome des Pankreaskarzinoms sind unspezifisch und präsentieren sich meistens erst in einem Stadium, in dem eine kurative Resektion nicht mehr möglich ist. Mehr als 80 % der Patienten weisen beim Zeitpunkt der Diagnose bereits Lymphknoten- oder Fernmetastasen auf.

Zu den Symptomen gehören Schmerzen im Oberbauch, oft mit gürtelförmiger Ausstrahlung in den Rücken, Inappetenz und Gewichtsverlust, Fatigue und dyspeptische Beschwerden, Erbrechen, Druckgefühl im Oberbauch und Diarrhöe. In 1/3 der Fälle kommt es durch Okklusion der ableitenden Gallenwege zu einem Verschlussikterus, eventuell verbunden mit acholischem Stuhl, Malabsorption und generalisiertem Pruritus. Thrombosen und Thrombophlebitiden treten bei einer vorliegenden Stauung im venösen Abfluss und bei Gerinnungsstörungen durch Übertritt der Pankreasenzyme in die Blutbahn auf. In einigen Fällen kommt es zum Diabetes mellitus oder gestörter Glukosetoleranz, seltener auch zu Pankreatitiden durch Obstruktion des Ductus pancreaticus (Li et al.⁴⁵).

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist multifaktoriell und die Entwicklung und Krankheitsprogression heterogen. Als am besten evaluierter Risikofaktor gilt das Zigarettenrauchen. Es ist ursächlich mit etwa 25-29 % der Pankreaskarzinome verbunden und verdoppelt bis verdreifacht das Erkrankungs-Risiko (Li et al.⁴⁵; Lowenfels, Maisonneuve⁴⁶; Vitone et al.⁴⁷). Verschiedene Studien weisen ebenfalls auf einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Übergewicht und einem erhöhten Risiko für ein Pankreaskarzinom hin. So zeigte sich in unterschiedlichen Populationen mit Adipositas (BMI > 30) ein erhöhtes Pankreaskarzinomrisiko (Berrington et al.⁴⁸). Weiterhin spielen als Risikofaktoren eine chronische Pankreatitis, ein vor kurzem diagnostizierter Diabetes mellitus und Alkoholabusus, sowie verschiedene karzinogene Noxen wie Naphthalamin, Benzidin und Nitrosamine eine Rolle (S3-Leitlinie⁴⁴).

Die Rolle, die hereditäre Faktoren in der Kanzerogenese des Pankreaskarzinoms einnehmen, ist bislang in der Literatur nicht befriedigend geklärt. Man nimmt momentan an, dass etwa 5-10 % der Pankreastumoren auf vererbten genetischen Dispositionen basieren (Vitone et al.⁴⁷). Einige dieser familiären Pankreaskarzinome gehören zum Spektrum bestimmter familiärer Krebs syndrome. Dazu gehört neben dem Familiären Brustkrebs syndrom (vererbte Mutationen des BRCA2-Gens) und dem FAMMM-PC (familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic cancer, Mutationen des p16 Tumorsuppressorgens) auch Lynch II, eine Form von HNPCC mit

extrakolonischen Manifestationen. Über die exakte Prävalenz und den genauen Pathomechanismus des familiären Pankreaskarzinoms im Rahmen des HNPCC ist bislang wenig bekannt. Wenigen Publikationen zufolge zeigen jedoch die Fälle mit HNPCC-ähnlichen molekulargenetischen Charakteristika analog der HNPCC-kolorektalen Karzinome eine besondere histopathologische und klinische Ausprägung mit einer günstigeren Prognose sowie Defekte in den DNA-Reparaturgenen *hMLH1*, *hMSH2* und *hMSH6* (Yamamoto et al.⁴⁹; Goggins et al.⁵⁰; Nakata et al.⁵¹).

1.4.3 Staging und Diagnose

Das Pankreaskarzinom wird entsprechend seiner Invasivität, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen durch das TNM-System nach American Joint Committee on Cancer (AJCC)-Kriterien klassifiziert und in vier Stadien eingeteilt (Tabellen 1 und 2). Eine exakte Zuordnung der Patienten erlaubt eine stadiengerechte Behandlung entsprechend der Krankheitsprogression und unterscheidet zwischen den Patienten, die von einer kurativ chirurgischen Behandlung oder von einem palliativen Therapieansatz, beispielsweise einer Stentimplantation in die ableitenden Gallenwege oder Chemotherapie, profitieren können.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des duktales Pankreaskarzinoms, aus AJCC-TNM Stage classification, 6. Edition⁵²

Tx	Primärtumor nicht untersuchbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf das Pankreas beschränkt, Durchmesser < 2 cm
T2	Tumor auf das Pankreas beschränkt, Durchmesser > 2 cm
T3	Tumor überschreitet Organgrenze, Truncus coeliacus/A. mesenterica superior tumorfrei
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht untersuchbar
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
Mx	Fernmetastasen nicht darstellbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2: Stadieneinteilung des duktales Pankreaskarzinoms, aus AJCC-TNM Stage classification, 6. Edition⁵²

Stadium 0	Tis	N0	M0	Tumor auf das Pankreas beschränkt
Stadium IA	T1	N0	M0	Tumor auf das Pankreas beschränkt
Stadium IB	T2	N0	M0	Tumor auf das Pankreas beschränkt
Stadium IIA	T3	N0	M0	Lokal invasives Wachstum
Stadium IIB	T1,2, oder 3	N1	M0	Lokal invasives Wachstum
Stadium III	T4	Jedes N	M0	Lokal invasives Wachstum
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1	Fernmetastasen

Spezifische diagnostische Mittel sowie sensitive standardisierte bildgebende Verfahren sind wichtige Parameter, um Patienten in resezierbaren Stadien verlässlich identifizieren zu können. Als Methoden der Wahl kommen aktuell vor allem die Oberbauchsonographie, Multidetektor-CT und die endoskopische Sonographie (EUS) sowie die MRT mit MRCP zum Einsatz (S3-Leitlinie 2007⁴⁴). Konventioneller Ultraschall weist besonders eine hohe Sensitivität in der Darstellung von Gallenwegsdilatationen und biliären Obstruktionen auf. Aufgrund der retroperitonealen Lage des Pankreas und seiner Überlagerung von Darmschlingen hat er jedoch nur bei Läsionen > 3 cm eine sensitive Aussagekraft (95 % Sensitivität) (Michl et al.⁴²). Als Goldstandard gilt aktuell das Multidetektor-CT mit zumindest biphasischem Kontrastmittelprotokoll. Von allen Methoden weist es die Größe und Invasivität des Primärtumors (74 % Sensitivität), vaskuläre Infiltration (83 %), Fernmetastasen (88 %), TNM-Stadium (46 %) und Tumorresektabilität (83 %) am Genauesten nach. Der endoskopische Ultraschall wird seit seiner Entwicklung in den 80-er Jahren als Standardverfahren eingesetzt. Der Einsatz erlaubt die Entdeckung und Darstellung von fokalen, kleinen Läsionen mit einem minimalen Durchmesser von 2-3 mm (Rösch et al.⁵³). Im Gegensatz zum Spiral-CT hat er die höchste Aussagekraft in der Darstellung von Tumordurchmesser und Lymphknotenbeteiligung (Balci et al.⁵⁴). In der Diagnostik spielen neben den genannten Verfahren auch die Magnetresonanztomographie (MRT), eventuell eine selektive Angiographie der Mesenterialgefäße und der Vena portae, die Positronen-Emissionstomographie (PET) und die intraduktale Ultrasonographie (IDUS) eine Rolle. Die endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) eignet sich besonders, um die hepatobiliären Wege

darzustellen und hat den Vorteil, gleichzeitig Pankreassaft für die Zytologie, Biopsie und eventuelle genetische Analysen gewinnen zu können.

Die Tumormarker CA 19-9 und CEA eignen sich für die postoperative Verlaufskontrolle und zur Diagnostik von eventuellen Rezidiven, aufgrund ihrer unspezifischen Natur jedoch nicht zur Frühdiagnostik (S3-Leitlinien⁴⁴).

1.4.4 Behandlungsmöglichkeiten

Die einzige Therapie mit kurativem Behandlungsansatz stellt die Operation dar. Aufgrund der fehlenden Symptomatik stellen sich die wenigsten Patienten mit einem auf das Pankreas lokalisierten Krankheitsprozess (T1 oder T2) vor, und in einem Großteil der Fälle liegen bereits Lymphknoten- oder Fernmetastasen vor. So kommen nur rund 10-20 % der Patienten überhaupt für einen kurativen Eingriff in Frage, ein postoperatives Langzeitüberleben von mehr als sieben Jahren ist jedoch die Ausnahme (Garcea et al.⁴³). Bei einer kompletten Resektion (R0) und einem lokalisierten Tumor ohne Lymphknotenmetastasen wurden 5-Jahresüberlebensraten von 18-24 % beschrieben (Yeo et al.⁵⁵). Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium (AJCC III oder IV) profitieren nach aktueller Auffassung nicht von einer kurativen chirurgischen Therapie. Studien belegen eine durchschnittliche postoperative Überlebenszeit von unter einem Jahr und, im Vergleich zu kurativ intendierten Eingriffen, eine erhöhte perioperative Mortalität (Von Hoff, Evans, Hruban⁵⁶). Ein exaktes präoperatives Staging ist daher von entscheidender Bedeutung, um eine der Krankheitsprogression adäquate Behandlung anwenden zu können.

Die operative Therapie eines Pankreaskopfkarcinoms besteht meistens in einer partiellen Pankreatoduodenektomie nach Whipple (USA, 1943). Sie beinhaltet eine Rechtsresektion des Pankreas und eine Entfernung des Duodenums, der Gallenblase mit Ductus choledochus sowie eine Magenteilresektion mit Entfernung der regionären Lymphknoten. Diese Operationstechnik nach Whipple wird oft auch als pyloruserhaltende Variante (PPPD) durchgeführt. Ein Korpuskarzinom macht in der Regel eine subtotale Pankreaslinksresektion oder je nach Tumorausdehnung eine totale Pankreatoduodenektomie erforderlich. Das operative Verfahren bei Karzinomen des Pankreasschwanzes ist die Pankreaslinksresektion (S3-Leitlinie⁴⁴).

In Palliativsituationen bei nicht mehr resektablen Stadien kommen verschiedene Behandlungsmöglichkeiten in Betracht. Studien von Mallison, Palmer und Glimelius konnten

zeigen, dass die Chemotherapie in palliativen Situationen der besten supportiven Therapie, sowohl im Hinblick auf Überlebenszeit, als auch hinsichtlich der Lebensqualität, überlegen ist (S3-Leitlinie⁴⁴). Als Standard gilt seit der Studie von Burris der Einsatz der Substanz Gemcitabine (Burris⁵⁷). Neuere Therapieansätze, zum Beispiel der Einsatz der Substanz 2-Methoxyestradiol zur Wachstumshemmung des Tumors, befinden sich bisher nur in einem experimentellen Stadium. Eventuell könnten sie in Zukunft zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens des weitestgehend chemoresistenten Pankreaskarzinoms beitragen, finden jedoch noch keine klinische Anwendung (Schumacher et al.⁵⁸). Als invasive palliative Maßnahmen in den AJCC-Stadien III und IV kommen bei Gallenwegsokklusionen eine endoskopische transpapilläre Endoprotheseneinlage in die Gallenwege, sowie eine perkutane transhepatische Gallengangsdrainage (PTCD) oder eine biliodigestive Anastomose (Cholechojejunostomie) zum Einsatz. Eine Pankreatoduodenektomie in palliativen Situationen zeigt nach heutiger Auffassung keinen Gewinn an Lebensqualität und sollte resektablen Stadien vorbehalten bleiben (Bahra, Jacob⁵⁹).

1.4.5 Pathologie

Exokrine Pankreastumoren machen rund 10 % aller Tumore des Verdauungstraktes aus und stehen damit an dritter Stelle aller Neoplasien dieses Organsystems. Hinter den meisten pankreatischen Tumoren steht eine maligne Erkrankung. So sind lediglich 1 % aller Pankreastumoren benigne Neubildungen. Bei den restlichen Formen handelt es sich um maligne Neoplasien, die vorrangig vom Ausführungsgangepithel, und nur sehr selten von den Azinuszellen ausgehen (Riede, Schaefer, Werner⁶⁰). Das duktales Adenokarzinom und seine Varianten stellen mit einem Anteil von über 90 % den weitaus größten Anteil der Pankreastumoren dar. 2 % der Tumoren sind intraduktales papillär-muzinöses Karzinom, 1 % Azinuszellkarzinome und rund 1 % muzinöse Zystadenokarzinome. Endokrine Tumoren machen nur etwa 1-2 % aller Pankreastumoren aus (Böcker, Denk, Heitz⁶¹).

Die meisten Tumore finden sich im Pankreaskopfbereich (ca. 80 %), gefolgt von Tumoren im Korpus- oder Schwanzbereich. Verbunden mit der früheren Symptomatik aufgrund der choledochusnahen Lokalisation weisen Tumore des Pankreaskopfbereichs meist eine etwas günstigere Prognose auf.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt in ca. 90 % eine Nervenscheideninvasion und in über 70 % eine lymphogene Metastasierung vor. Hierbei sind insbesondere die coeliacalen, paraaortalen sowie Leberhiluslymphknoten betroffen. Die hämatogene Filiarisierung erfolgt primär in die Leber (65 %), weiter in Lunge und Pleura (25 %), Gehirn und Knochen (10 %) (Riede, Schaefer, Werner⁶⁰).

1.4.6 Vorläuferläsionen

Wie die meisten bösartigen Neoplasien ist das duktales Adenokarzinom des Pankreas stark mit dem Alter korreliert. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt in Deutschland für Frauen bei etwa 76 Jahren und für Männer bei über 68 Jahren (GEKID⁴). Analog des Adenokarzinommodells des kolorektalen Karzinoms nach Vogelstein geht man heute davon aus, dass Akkumulationen von Mutationen in den Protoonko- und Tumorsuppressorgenen das regulatorische Gleichgewicht des Zellwachstums stören und maßgeblich an der Onkogenese beteiligt sind. Histomorphologische, klinische und molekularbiologische Untersuchungen in der Vergangenheit führten zur Entstehung eines Progressionsmodells, das die Entstehung eines invasiven Karzinoms über Epithelläsionen mit verschiedenen Dysplasiegraden beschreibt. Diese Vorläuferläsionen finden sich häufig in unmittelbarer Nähe der Neoplasie, gehen dieser zeitlich voraus und zeigen stadienabhängig dasselbe molekularbiologische Profil (Cubilla and Fitzgerald⁶²; Hruban et al.⁶³). Im Jahr 2001 führte das National Cancer Institute (NCI) den Terminus pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) für diese Vorläuferläsionen ein und unterteilte diese je nach struktureller Dysplasie und morphologischen Veränderungen in vier Stadien (Kern et al.⁶⁴). PanIN-1 umfaßt Epithelläsionen ohne Atypie, die entweder flach (PanIN-1A) oder papillös (PanIN-1B) formiert sind. PanIN-2-Läsionen sind papillär und zeigen Atypien, während PanIN-3 bereits histopathologische Kriterien eines Carcinoma in situ aufweisen. Das invasive Adenokarzinom ist gekennzeichnet durch drüsenformendes, infiltrierendes Epithel mit Zellatypien, hyperchromen Zellkernen, Verlust der Zellpolarität und prominenten Nuclei. Abbildung 2 zeigt schematisch die morphologischen und molekularbiologischen Veränderungen der PanINs. In Abbildung 3 werden Fotos von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparatschnitten der einzelnen PanIN-Stadien dargestellt.

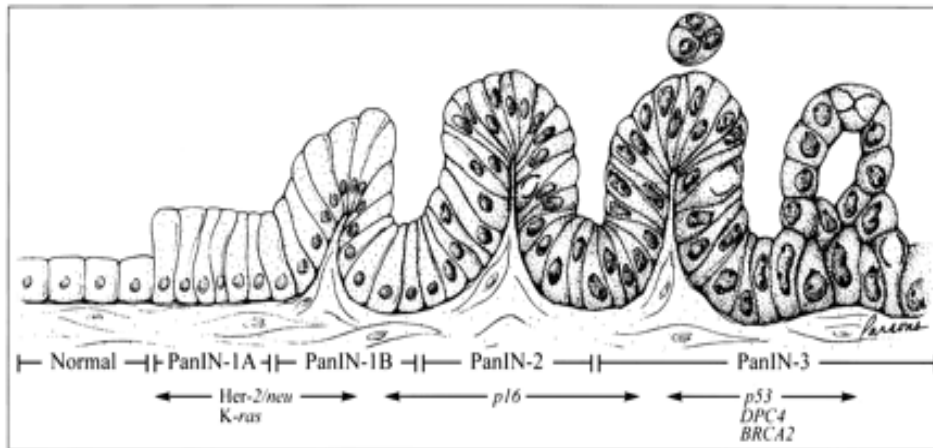


Abbildung 2: Zellmorphologie und molekulargenetische Merkmale der einzelnen PanIN-Stadien. *K-ras* Mutationen sind schon früh in der pankreatischen Onkogenese zu identifizieren; aus Hruban et al., Progression model for pancreatic cancer, 2000⁶³.

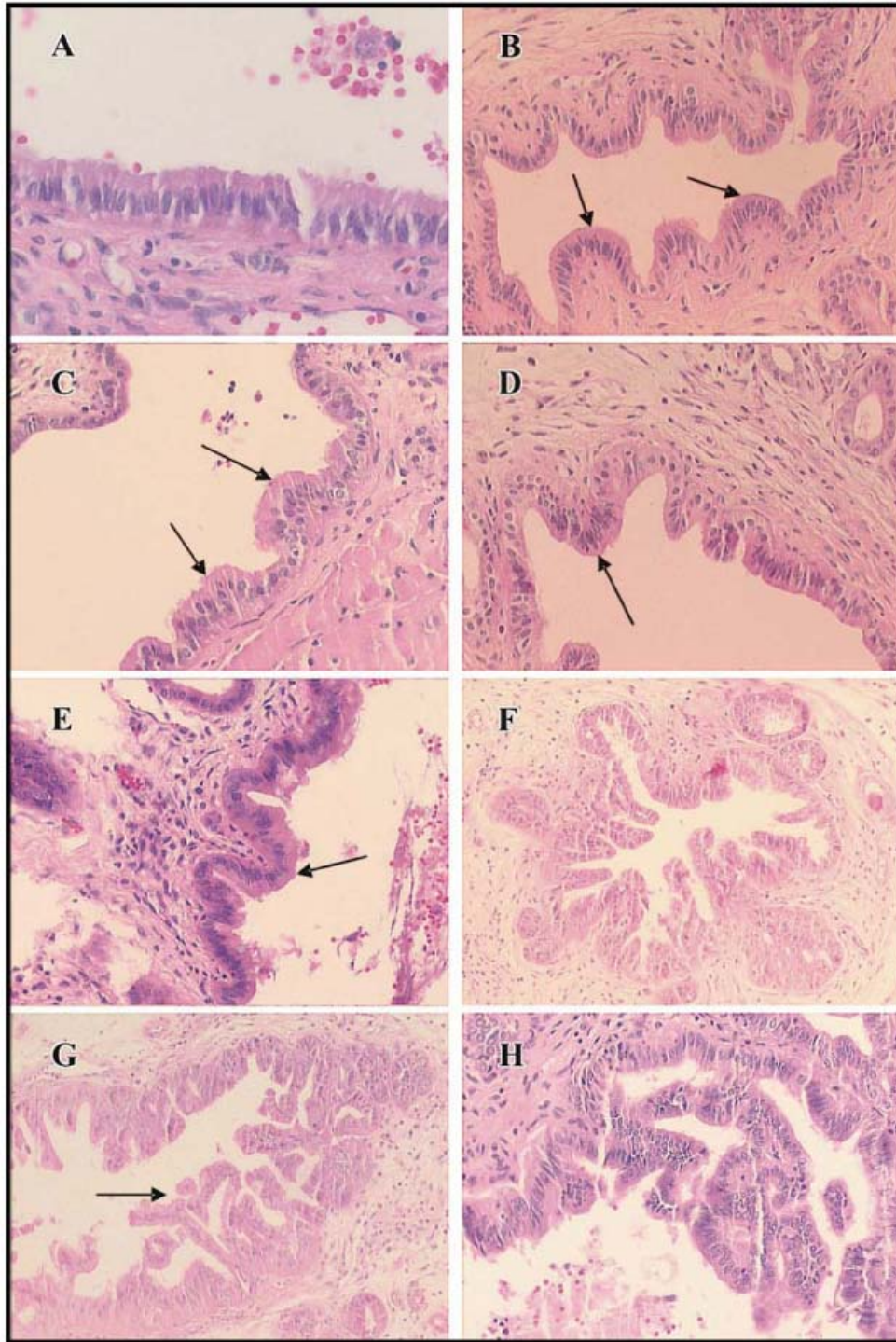


Abbildung 3: Mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Schnitte von Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms (PanINs) **A:** PanIN-1A, Vergrößerung 40-fach **B und C:** PanIN-1B mit papillären Formationen (Pfeile), Vergrößerung 20-fach bzw. 10-fach **D und E:** PanIN-2 mit papillären Formationen und Kernatypien (Pfeil), Vergrößerung 20-fach **F und G:** PanIN-3 mit Läsion (Pfeil), Vergrößerung 10-fach. **H:** PanIN-3 mit cribriformem Erscheinungsbild, Vergrößerung 20-fach. Aus Wendt et al., Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice. Effects of alcohol and caffeine, *Acta Cirurgica Brasileira*, 2007⁶⁵.

1.4.7 Protoonkogene und Tumorsuppressorgene in der pankreatischen Onkogenese

Veränderungen auf genetischer Ebene sind die Basis für die Tumorprogression des Pankreaskarzinoms. Auf molekulargenetischer Ebene finden sich zahlreiche Mutationen in bestimmten Protoonko- und Tumorsuppressorgenen. Eine zentrale Rolle nehmen dabei aktivierende Punktmutationen auf Codon 12 des *K-ras*-Protoonkogens ein. Mit einer angegebenen Mutationshäufigkeit von 75-100 % weist das Pankreaskarzinom die höchste *K-ras*-Mutationsrate aller humanen Neoplasien auf (Li et al.⁴⁵; Almoguera et al.⁶⁶).

Aktivierende *K-ras*-Mutationen sind bereits sowohl in einem frühen Stadium als auch in den PanINs identifizierbar (Hruban et al.⁶³). Diese Tatsache unterstützt die Hypothese des Tumorprogressionsmodells und Vorstellungen einer schrittweisen malignen Entartung.

Verschiedene Studien haben sich bisher mit einer näheren Klassifizierung von *K-ras*-mutierten Pankreaskarzinomen beschäftigt. Angaben dazu sind jedoch sehr unterschiedlich und heterogen. Castells et al. identifizierten *K-ras*-Mutationen als unabhängigen ungünstigen prognostischen Faktor. Patienten mit *K-ras*-Mutationen zeigten in dieser Studie eine kürzere Überlebenszeit als Patienten mit einem unveränderten, *wild type (wt)* *K-ras*-Gen (Castells et al.⁶⁷). In einer Studie von Niedergethmann et al. wurden *K-ras*-Mutationen ebenfalls als ungünstigen Faktor beschrieben. Die Patienten mit *K-ras*-Mutationen zeigten mit einer erneuten Erkrankungsquote von 100 % eine höhere postoperative Rezidivrate und wiesen eine signifikant kürzere Überlebenszeit als Patienten mit *K-ras wt*-Genen auf (Niedergethmann et al.⁶⁸). Andere Studien hingegen konnten keinen Zusammenhang zwischen Patientenüberleben oder besonderen histopathologischen Parametern und dem Vorhandensein von *K-ras*-Mutationen herstellen (Hruban et al.¹⁶; Dergham et al.⁶⁹; Ghaneh et al.⁷⁰). Auch Slebos et al. konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich Tumorgrading oder Mitoseindex feststellen, identifizierten aber einen Trend von höherer *K-ras*-Mutationsraten mit steigendem Tumorstadium (Slebos et al.¹⁸).

Neben Alterationen des *K-ras*-Gens nehmen Mutationen zahlreicher weiterer Protoonkogene und Tumorsuppressorgene eine zentrale Rolle in der Karzinogenese ein. Man geht heute davon aus, dass diese Mutationen stadienabhängig im Tumorprogressionsprozess auftreten (s. Abbildung 2). In 65-70 % findet man bereits am Anfang der Tumorprogression (PanIN-1) Mutationen des Onkogens HER2/neu. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie p53, p16^{CDKN2A} und SMAD4 sind in der Onkogenese ein essenzieller Faktor und werden meist erst in späteren

Vorläuferläsionen identifizierbar (PanIN's-2 und -3). Tabelle 3 gibt die am häufigsten betroffenen Protoonkogene und Tumorsuppressorgene mit ihren Mutationshäufigkeiten wieder.

Tabelle 3: Mutationshäufigkeiten der Protoonkogene und Tumorsuppressorgene des duktales Pankreaskarzinoms, aus Li et al., Pancreatic cancer, Lancet 2004⁴⁵

	Chromosomal location	Alteration frequency (%)
Oncogenes		
<i>K-ras</i>	12p	75–100
<i>HER2/neu</i>	17q	65–70
<i>AKT2</i>	19q	10–20
<i>MYB</i>	6q	10
Tumour-suppressor and genome-maintenance genes		
<i>TP53</i>	17p	40–75
<i>CDKN2A*</i>	9p	27–98
<i>CDKN2A†</i>	9p	27–82
<i>CDKN2B</i>	9p	27–48
<i>MADH4</i>	18q	50–55
<i>FHIT</i>	3p	66–70
<i>RBI</i>	13q	0–10
<i>BRCA2</i>	13q	7–10
<i>STK11</i>	19q	5
<i>MAP2K4</i>	17p	4
<i>ALK5</i>	9q	1
<i>TGFBR2‡</i>	3p	1
<i>TGFBR2§</i>	3p	3
<i>MLH1</i>	3p	3

*p16^{INK4a}, †p19^{ARF}, ‡MSI-, §MSI+. Modified from Mangray S, King TC. Molecular pathobiology of pancreatic adenocarcinoma. *Front Biosci* 1998; **3**: D1148–60, and Sohn TA, Yeo CJ. The molecular genetics of pancreatic ductal carcinoma: a review. *Surg Oncol* 2000; **9**: 95–101.

1.4.8 Der molekulare MSI-Phänotyp und MMR-Defekte in der pankreatischen Onkogenese

In den vergangenen Jahren haben neben Veränderungen in Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen auch Mutationen des *mismatch repair*-Systems eine Rolle als möglicher alternativer Onkogeneseweg des Pankreaskarzinoms eingenommen. Vererbte oder sporadische Mutationen der *mismatch repair*-Gene *hMLH1*, *hMSH2* und *hMSH6* führen zu einem defekten

DNA-Reparatursystem, das kleine Fehler in der Nukleotidfolge der DNA nach der Replikation nicht mehr korrigiert. Diese Deletionen oder Insertionen akkumulieren und ein MSI-positiver Phänotyp entsteht. Dieser ist gekennzeichnet durch Längenveränderungen an bestimmten Mikrosatellitenloki, wie zum Beispiel an den Mononukleotidwiederholungen *BAT25* (Thymin₂₅) und *BAT26* (Adenin₂₆).

Es gibt bisher nur wenige Studien über den MSI-Phänotyp in pankreatischen Adenokarzinomen. Die angegebene Prävalenz weicht in der Literatur stark voneinander ab und umfasst Mutationshäufigkeiten von 0 % (0/26) bis 50 % (4/8) (Seymour et al.⁷¹; Brentnall et al.⁷²). Goggins et al. berichtete eine Prävalenz von 3,7 % (3/82), während eine Studie von Nakata et al. 17,4 % (8/46) MSI-positive Karzinome angab (Goggins et al.⁵⁰, Nakata et al.⁵¹). Ghimenti et al. konnte ebenso wie Seymour keinen Fall mit MSI identifizieren (Ghimenti et al.⁷³). 2001 fand Yamamoto et al. eine Prävalenz von 13 % (13/100) in sporadischen Pankreaskarzinomen und 100 % (3/3) in HNPCC-Pankreaskarzinomen (Yamamoto et al.⁴⁹). Ouyang et al. zeigte ähnlich Daten mit einer angegebenen Prävalenz von 15 % (9/60) (Ouyang et al.⁷⁴). Wilentz et al. fanden hingegen unter Verwendung der Mononukleotidmarker *BAT25* und *BAT26* in 77 sporadischen Adenokarzinomen keinen MSI-positiven Fall (0/77). Hohe Prävalenzraten berichten überwiegend Studien japanischer Herkunft und solche Publikationen, die sich nicht auf den Gebrauch von Mononukleotidmarkern stützen und bei denen der eigentliche karzinogene Mechanismus der defekten *MMR*-Gene nicht immunhistochemisch untersucht wurde. In den wenigen Studien, in denen ein Patientenkollektiv mit Pankreaskarzinomen im Rahmen eines HNPCC untersucht wurde, fanden sich ebenfalls sehr hohe Prävalenzraten. Bisherige Untersuchungen nicht-selektierter, kaukasischer Patientenserien lieferten unter Verwendung der Mononukleotidmarker *BAT25* und *BAT26* und Durchführung einer immunhistochemischen Analyse der *MMR*-Proteinen *hMLH1*, *hMSH2* und *hMSH6* Prävalenzraten zwischen 0 % und maximal 2,4 %.

Analog des kolorektalen Karzinoms scheinen MSI-Pankreaskarzinome spezielle histopathologische und molekularbiologische Ausprägungen aufzuweisen und sind mutmaßlich verbunden mit einem besseren Langzeitüberleben (Yamamoto et al.⁴⁹, Nakata et al.⁵¹). Es wurde beschrieben, dass dieser spezielle Genotyp analog der kolorektalen MSI-Karzinome einen sogenannten medullären Phänotyp aufweist, der gekennzeichnet ist durch geringe Differenzierung (G3 oder G4), synzytiales Wachstumbild, invasives Tumorwachstum und extensive Nekrose (Wilentz et al.⁷⁵). Angaben in der Literatur bezüglich der *K-ras*

Mutationsraten in diesem speziellen Phänotyp sind bisher uneinheitlich. Goggins et al. fand 3/28 MSI-positive Fälle, die durch K-ras *wild type* Varianten und einen diploiden Phänotyp gekennzeichnet waren. Die Ergebnisse von Brentnall et al. hingegen legen eine mögliche Korrelation von Defekten des DNA-Reparatursystems und der Entwicklung von *K-ras* Mutationen nahe.

Um die klinischen und histologischen Charakteristika und den speziellen molekularbiologischen Onkogeneseweg dieses Subtyps von pankreatischen Adenokarzinomen genau beschreiben zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen auf diesem Feld. Die Identifikation bestimmter mutationstragender Untertypen könnte in Zukunft in Hinblick auf den Einsatz adäquater diagnostischer Mittel (z.B. eine molekulargenetische Mutationsanalyse zur Bestimmung eines bestimmten Karzinomsubtyps), die Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der untersuchten Mutationen und möglicherweise die Entwicklung besonderer therapeutischer Konzepte ausschlaggebend sein.

2. Zielsetzung

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 12.600 Menschen an einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Trotz verbessertem molekularbiologischen Verständnis und neuen Therapieansätzen gehört das Pankreaskarzinom mit einem Letalitätsindex von rund 100 % noch immer zu den Tumorerkrankungen mit der schlechtesten Prognose. Eine kurative Behandlung ist nur in einem geringen Prozentsatz der Erkrankungen und bei frühzeitiger chirurgischer Intervention in frühen, auf das Pankreas beschränkten malignen Prozessen möglich. Trotz zahlreicher Studien und neuer methodischer Ansätze konnte eine geeignete Screeningmethode in Hochrisikogruppen und damit eine kostengünstige Früherkennung bisher noch nicht etabliert werden. Eine Möglichkeit könnte in der Gewinnung von Pankreasgewebe oder Pankreassaft und der molekulargenetischen Analyse der häufigsten Protoonkogenmutation im Pankreaskarzinom, der Mutation des Codon 12 des *K-ras* Gens, liegen.

Die histopathologischen Merkmale lokale Tumorexpanansion und das Tumorstadium nach AJCC-Kriterien gelten nach heutigem Wissensstand in der uni- sowie multivariaten Analyse als unabhängige prognostische Marker. Über die Bedeutung anderer histopathologischer Charakteristika wie der Befall lokoregionärer Lymphknoten oder die Radikalität des Eingriffs sowie der histologischen Differenzierung für das Gesamtüberleben besteht nach derzeitiger Studienlage kein Konsens. Auch die prognostische Wertigkeit und der mögliche Zusammenhang von *K-ras*^{Cod12}-Mutationen und bestimmten klinisch-pathologischen Parametern werden noch gegensätzlich diskutiert.

Insertionen und Deletionen an bestimmten Genorten, den Mikrosatelliten, werden besonders im Kolonkarzinom trotz aggressiveren histopathologischen Merkmalen wie schlechter Differenzierung und ausgeprägter Invasivität mit einem besseren Langzeitüberleben und damit besseren Prognose assoziiert. Studien, die sich mit diesem molekularen Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität beim Pankreaskarzinom befassen, sind zahlenmäßig sehr begrenzt und treffen nur unbefriedigende und meist gegensätzliche Aussagen bezüglich der Prävalenz, der Vergesellschaftung mit bestimmten histopathologischen und klinischen Merkmalen und der Prognose dieses MSI-Phänotyps.

In dieser Studie werden zwei konsekutive, kaukasische Patientenserien untersucht und nach der aktuellsten TNM-Klassifikation und AJCC-Stadieneinteilung dargestellt. Ziel ist dabei die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den einzelnen klinisch-pathologischen Merkmalen wie lokale Tumorexpanansion (T), lokaler Lymphknotenstatus (N), Fernmetastasierung und Befall nicht-lokoregionärer Lymphknoten (M) sowie des Differenzierungsgrades des Tumors (G) und der Radikalität des Eingriffes (R0-R2) einerseits und dem Gesamtüberleben andererseits.

K-ras-Mutationen sind die im Pankreaskarzinom am häufigsten gefundenen Mutationen und finden sich in 75-100 % der pankreatischen Neoplasien. Nach heutiger Studienlage können weder gesicherte Aussagen über eine möglicherweise abweichende Prognose *K-ras*-mutierter Phänotypen noch über einen möglichen Zusammenhang zwischen histopathologischen Kriterien wie Tumorstadium und Differenzierung getroffen werden.

Während über die Prävalenz von *K-ras*-Mutationen und deren Funktion in der pankreatischen Onkogenese Konsens herrscht, gibt es kaum gesicherte Erkenntnisse über den molekularen Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität und seinen onkogenetischen Pathomechanismus. Die Prävalenz dieses Phänotyps beim Pankreaskarzinom umfasst in der Literatur Spannen von 0 bis

50 % und seine prognostische Bedeutung und der Zusammenhang mit bestimmten molekularen und klinisch-pathologischen Charakteristika werden kontrovers diskutiert.

Außer der Analyse der prognostischen Bedeutung einzelner histopathologischer Parameter nach TNM-Klassifikation und des AJCC-Tumorstadiums hat diese Studie das Ziel, neben der *K-ras^{Cod12}*-Mutationshäufigkeit vor allem die prognostische Wertigkeit dieser Protoonkogenmutation zu analysieren und Aussagen über eine mögliche Korrelation mit bestimmten histopathologischen Parametern wie Tumorstadium und histologischer Differenzierung treffen zu können. Im Hinblick auf die lückenhafte Studienlage und die gegensätzlichen Aussagen, die die einzelnen Studien über den MSI-Phänotyp in der Vergangenheit getroffen haben, soll die Prävalenz des MSI-Phänotyps im duktalem Adenokarzinom des Pankreas analysiert und seine eventuelle Bedeutung als prognostischer Marker untersucht werden.

Neue Erkenntnisse auf diesem molekulargenetischen Gebiet könnten zukünftig zu einer zeitigen Diagnosestellung verhelfen und eine frühzeitige therapeutische Intervention in noch potentiell kurativen Krankheitsstadien ermöglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenauswahl und Probengewinnung

Gegenstand der vorliegenden Studie waren insgesamt 119 Pankreaskarzinompräparate des Kopf-, Korpus- oder Schwanzbereichs, die während des Zeitraums zwischen 1993 und 2006 chirurgisch asportiert wurden. Dazu wurde Tumorgewebe eines Patientenkollektivs, bestehend aus zwei internationalen, konsekutiven Patientenserien, molekulargenetisch untersucht. Die erste Serie setzte sich aus 62 Patienten mit duktalem Adenokarzinom des exokrinen Pankreas zusammen, an denen zwischen den Jahren 1993 und 2006 an der Universitätsmedizin Berlin, Charité, Deutschland eine Pankreasresektion nach Kausch/Whipple oder eine partielle pyloruserhaltende Pankreatoduodenektomie (PPPD) durchgeführt wurde. Gewebeproben des zweiten Patientenkollektivs wurden freundlicherweise vom Istituto Clinico Humanitas in

Mailand zur Verfügung gestellt und umfassten 57 Patienten mit exokrinem Pankreaskarzinom, die sich in der Zeit zwischen 1998 und 2005 am Istituto Clinico Humanitas, Mailand, Italien einer Pankreasresektion nach oben genannten Techniken oder einer totalen Pankreasresektion bei Korpus- und Schwanzbefall unterzogen.

Die Überlebensdaten, die histopathologischen Daten wie Tumorstaging nach AJCC-Klassifikation (TNM-Stadien nach Vorgaben der AJCC-Klassifikation, 6. Edition), Differenzierungsgrad und Tumorlokalisation sowie die demographischen und klinischen Daten wurden entweder mit Hilfe klinikinterner Datenbanken oder durch eine Recherche in den jeweiligen Klinikarchiven gewonnen. Die Einverständniserklärung eines jeden Patienten beider Gruppen lag bei Studienbeginn vor.

Die Gewebeproben wurden nach chirurgischer Resektion mit Formalin fixiert und in Paraffin gebettet. Zur Probengewinnung wurden je drei 5 µm-Sektionen eines Paraffinblockes mit Tumorgewebe an dem Mikrotom geschnitten. Eine Tumorzellularität von mindestens 50 % aller Zellen wurde mittels einer Hämatoxylin-Eosinfärbung des jeweiligen Tumorgewebes sichergestellt.

3.2 Deparaffinierung, Extraktion und Purifikation der DNA

Um die in Paraffin gebetteten Gewebeschnitte der einzelnen Operationspräparate für die molekulargenetische Analyse vorzubereiten, wurde ein mehrschrittiger Prozess angewendet, der aus einer Deparaffinierung einerseits und der Extraktion genetischen Materials aus dem Tumorgewebe und der Reinigung der zu analysierenden DNA andererseits bestand.

Den formalinfixierten und in Paraffin gebetteten Schnitten wurde jeweils 1 ml Xylen zugesetzt. Nach gründlichem Mischen am Vortex wurden die Proben für 10 Minuten bei 12.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Sigma, Braun Biotechn International) und der Überstand verworfen. Um das Paraffin vollständig zu entfernen, wurde dieser Schritt mit allen Proben wiederholt. Rückstände des Xylens wurden durch Zugabe von 1 ml 100 %-igem Ethanol ausgewaschen und nach gründlichem Mischen am Vortex eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 rpm bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach vorsichtigem Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Pellet in einem Heizblock bei 85°C für 10 Minuten getrocknet. Die Entfernung des noch verbleibenden Proteins erfolgte mit Hilfe einer enzymatischen Spaltung

durch Zugabe eines Reaktionsgemischs aus 260 µl sterilem Wasser, 30 µl PCR-Puffer (Optimized DyNazime™ Buffer 10x, *Finnzymes*) und 10 µl Proteinase K (F-202S, 20 mg/ml, > 30 U/mg, *Finnzymes*). Nach Inkubation der Proben über Nacht bei 52°C wurde das Enzym durch Erhitzen inaktiviert (95°C für 10 Minuten).

Die Purifikation der DNA erfolgte nach der Phenol-Chloroform-Methode. Hierzu wurde zur Extraktion und Abtrennung von hydrophoben Stoffen, Zellwänden und Proteinen in einem ersten Schritt jede Probe mit 1 Volumen (300 µl) Phenol versetzt und am Vortex gemischt. Nach Zentrifugation (10 Minuten, Raumtemperatur, 12.000 rpm) resultierten zwei Phasen, von denen der DNA-haltige, wässrige Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt und jeder Probe ein Volumen (300 µl) Chloroform hinzugefügt wurde. Nach gründlichem Mischen am Vortex und erneuter Zentrifugation (10 Minuten, Raumtemperatur, 12.000 rpm) wurde erneut ein DNA-haltiger Überstand gewonnen, der in neue Eppendorfgefäße überführt wurde. Zur DNA-Fällung wurde die Lösung mit 1/10 Volumen (30 µl) 3-molarem Natriumazetat versetzt, gevortext und anschließend 2 Volumen (600 µl) 100 %-iges, kaltes (-20°C) Ethanol beigemischt und gevortext. Zur vollständigen Ausfällung der DNA wurden die Proben über Nacht bei -20°C inkubiert.

Die Lösungen wurden am darauf folgenden Tag für 30 Minuten bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Das entstandene Pellet aus ausgefüllter DNA wurde je nach Größe in 50-100 µl sterilem Wasser aufgenommen und durch 5-minütiges Inkubieren bei 65°C im Heizblock gelöst. Vor Amplifikation des genetischen Materials wurden die Proben für 24 Stunden bei 4°C gelagert und mehrmals gevortext, um ein vollständiges Übergehen des Niederschlages in Lösung zu ermöglichen.

3.3 Molekulargenetische Analyse des molekularen Phänotyps der Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

3.3.1 Analyse von Längenveränderungen der Mikrosatellitenloki

Zur Analyse des genetischen Phänotyps der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) erfolgte eine Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) der Mikrosatellitenloki *BAT25* und *BAT26*. Der Genlocus *BAT26* befindet sich auf Exon 5 des Gens *hMSH2* und besteht aus 26 Adeninnukleotiden. *BAT25* befindet sich auf Intron 16 des Protoonkogens *c-Kit* und setzt sich aus 25 Thymidinnukleotiden zusammen. Diese repetitiven Sequenzmotive sind während der

DNA-Replikation besonders prädisponiert für Replikationsfehler in Form von Längenveränderungen, weil die gepaarten DNA-Stränge während der Replikation leicht verrutschen können. Werden diese *frameshift*-Mutationen aufgrund eines defizienten DNA-Reparatursystems, oder *mismatch repair (MMR)*- Systems, nicht korrigiert, kommt es bei jeder darauffolgenden Replikation zu einer Weitergabe des mutierten Mikrosatellitenlokus (klonale Expansion) und der molekulare Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität entsteht.

Die Mononukleotidmarker *BAT25* und *BAT26* stellen sensitive und spezifische Marker für den Nachweis der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) dar und weisen bei Längenveränderungen zu 99,5 % auch das Vorliegen des genomweiten molekularen MSI-Phänotyps nach. Da die beiden Marker nach derzeitigem Wissensstand in der kaukasischen Bevölkerung quasi-monomorph erscheinen, entfällt der Vergleich mit nicht-entartetem Gewebe als Normalkontrolle. Die verwendeten Primer und der Reaktionsansatz werden in Tabelle 4 und 5 wiedergegeben.

Tabelle 4: Primer für die Amplifikation der Mikrosatellitenloki *BAT25* und *BAT26*

Funktion	Primer	Sequenz
<i>BAT25 forward primer</i>	BAT 25 FW fluo	5'-gCCTCCAAgAATgTAAgTgggAg-3'
<i>BAT25 backward primer</i>	BAT 25 BW	5' -TgCTTTTggTTACCACACTTCAA-3'
<i>BAT26 forward primer</i>	BAT.26.1fluo	5'-TgACTACTTTTgACTTCAgCC-3'
<i>BAT26 backward primer</i>	BAT.26.2	5'-AACCAATCAACATTTTAAACCC-3'

Die jeweiligen *forward primer* inserieren einen fluoreszierenden Sequenzabschnitt in den replizierten Strang, um eine anschließende Analyse der Längenveränderungen beider Genloki mittels Laser an der Sequenzmaschine zu ermöglichen. Zur Amplifikation der Mikrosatellitenloki wurde eine PCR durchgeführt, in der nach einer initialen Denaturierungsphase (94°C für 4 Minuten) das genetische Material in 40 Zyklen (Denaturierung bei 94°C für 15 Sekunden, Hybridisierung bei 55°C für 15 Sekunden, Polymerisation bei 72°C für 30 Sekunden) und einer finalen Elongationsphase (72°C für 10 Minuten) vervielfältigt wurde. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Auftragen auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel analysiert. Dazu wurde ein 2 %-iges Agarosegel aus 1x-TBE-Puffer, Agarose sowie $\frac{1}{10}$ Volumen Ethidiumbromid gegossen. Ethidiumbromid ist ein die DNA interkalierendes Reagenz und sorgt dafür, dass die amplifizierte DNA unter UV-Licht als Banden sichtbar wird.

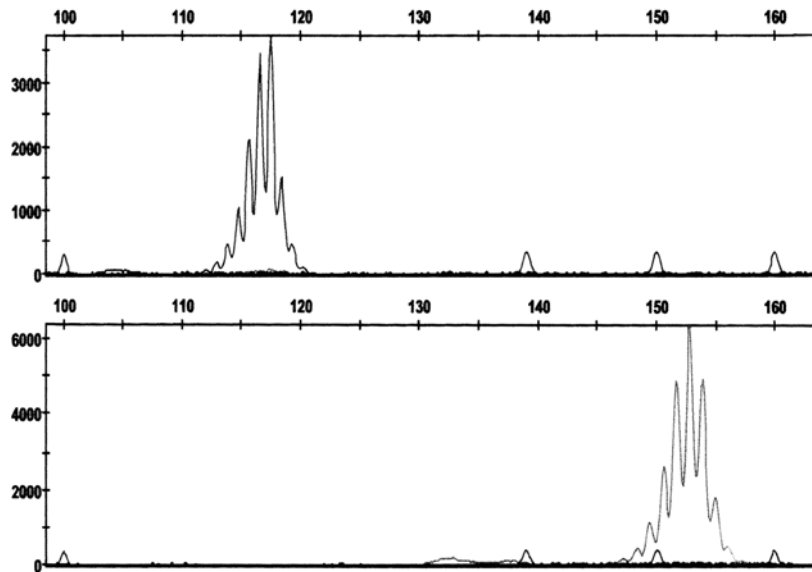
Tabelle 5: PCR-Ansatz *BAT25* und *BAT26*

PCR-Ansatz	Menge
DNA	200-300 ng/ 1,5 µl
Optimized DyNazine™ Buffer 10x (<i>Finnzymes</i>)	2,5 µl
<i>Forward primer</i> 10 pmol/ul	0,7 µl
<i>backwad primer</i> 10 pmol/ul	0,7 µl
dNTPs 10 mM (<i>Finnzymes</i>)	0,5 µl
DyNazime™II DNA Polymerase 2U/µl (<i>Finnzymes</i>)	0,5 µl
H ₂ O, steril	18,6 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Je 10 µl der einzelnen PCR-Produkte wurden mit jeweils 2 µl Probepuffer (Glyzin und Bromphenolblau) in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenbeurteilung der PCR-Produkte wurde ein 100 bp DNA-Marker mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 100 Volt für ungefähr 15 Minuten gefahren und das Gel anschließend mit einer Digitalkamera unter UV-Licht photographiert und das Ergebnis dokumentiert.

Die Analyse von Deletionen oder Insertionen der Mikrosatellitenloki *BAT25* und *BAT26* erfolgte an der automatischen Sequenzmaschine ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Dazu wurden je 1 µl PCR-Produkt mit 1 µl molekularer Marker TAMRA™-500 (Applied Biosystems) und 12 µl Denaturierungsreagenz Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) versetzt und zur vollständigen Denaturierung der DNA für 5 Minuten bei 95°C im Heizblock inkubiert. Längenveränderung der beiden monomorphen Genloki wurden anschließend nach kapillärer Gelelektrophorese an der automatischen Sequenzmaschine anhand des dazugehörigen Datenverarbeitungsprogramms Genescan (Applied BioSystems, Foster City, Californien) analysiert und in Form von Elektropherogrammen dargestellt. Abbildung 4 zeigt schematisch Beispiele von Elektropherogrammen, die Längenveränderungen an den Genloki *BAT25* und *BAT26* widerspiegeln, sowie zum Vergleich Elektropherogramme von mikrosatellitenstabilen *BAT25* und *26*-Genabschnitten. Als MSI-Phänotyp positiv galten die Proben, die an beiden Genloki Deletionen oder Insertionen aufwiesen, als negativ (mikrosatellitenstabil, MSS), wenn die Anzahl der Mononukleotidwiederholungen an *BAT26* und *BAT25* unverändert waren.

A



B

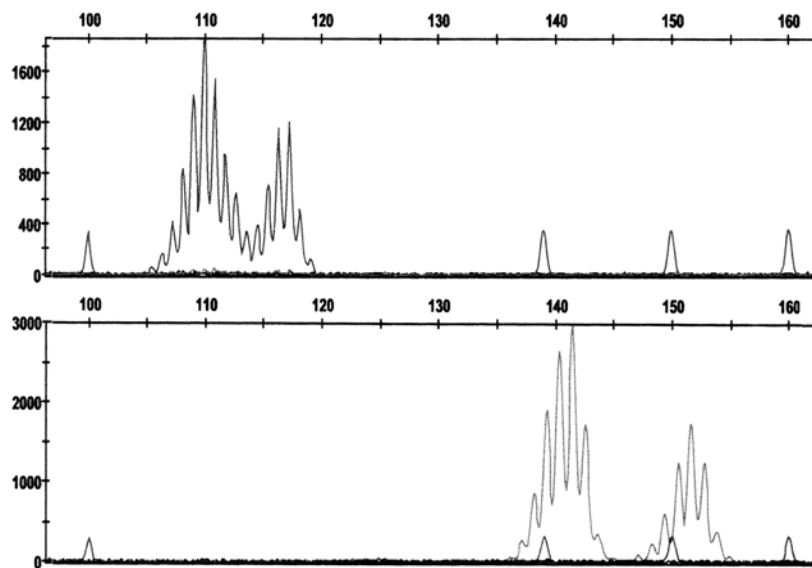


Abbildung 4: Beispiele von Elektropherogrammen der Genloki *BAT26* (schwarz, jeweils obere Reihe) und *BAT25* (grau, jeweils untere Reihe). In A wird je nur ein peak pro Marker als Zeichen von unveränderten Mikrosatellitenlängen sichtbar, die Mikrosatellitenloki sind stabil (MSS). In B sind zwei unterschiedliche peaks sichtbar, Zeichen für Längenveränderungen an den Genloki *BAT25* und *BAT26*, die Mikrosatelliten sind instabil (MSI).

3.3.2 Analyse der *mismatch repair*-Proteine

Eine fehlende Expression der Reparaturproteine spricht für einen Defekt auf Ebene der zugehörigen *MMR*-Gene des Tumorgewebes und damit für ein defizientes DNA-Reparatursystem. Die Mutation kann in diesem Fall entweder als erworbene Spontanmutation (Hypermethylierung der Promoterregion) oder im Rahmen eines hereditären genetischen Defekts (monoallelischer Defekt mit erworbener Deletion des zweiten Allels) vorliegen.

Die Fälle, die *frameshift* Mutationen, d.h. Längenveränderungen, an einem der beiden Mikrosatellitenloki aufwiesen, wurden immunhistochemisch auf die Expression der *mismatch repair* (*MMR*)-Proteine *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* untersucht.

Zur Probenvorbereitung wurden je Mutationsträger Tumorgewebe und Normalgewebe in jeweils drei 3 µm-Sektionen an dem Mikrotom geschnitten, auf dem Objektträger ausgebreitet und getrocknet. Die immunhistochemische Analyse der *MMR*-Proteine wurde freundlicherweise von Dr. Giancarlo Marra, Institute for Molecular and Cancer Research, Zürich, durchgeführt.

3.4 Mutationsanalyse des Codons 12 des Protoonkogens *K-ras* (*K-ras*^{Cod12})

Die DNA der 119 Pankreaskarzinomproben wurde mittels Amplifikation (PCR) und anschließender Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse auf Punktmutationen des Codons 12 des Protoonkogens *K-ras* untersucht.

Bei der Amplifikation wird die ursprüngliche Sequenz der DNA an Codon 12 durch den *forward primer* durch Modifikation einer bzw. dreier Basen verändert. Das modifizierte Genprodukt bietet nur eine Erkennungs- und damit eine Schnittstelle für Restriktionsendonukleasen, wenn eine nicht-mutierte (*wild type*) Variante vorliegt. Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die spezifische Nukleotidsequenzen erkennen und Phosphodiesterbindungen inmitten eines DNA-Moleküls hydrolysieren. Die resultierenden DNA- oder Restriktionsfragmente weisen veränderte Nukleotidsequenzen nach und kommen deswegen häufig bei der Mutationsanalyse zum Einsatz. Die von den *forward primern* eingefügten Restriktionspunkte werden in Tabelle 6 bei der Auflistung der Primer hervorgehoben. Der PCR-Ansatz wird in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 6: Primer für die Amplifikation des Protoonkogens *K-ras*^{Cod12}

Funktion	Primer	Sequenz
	RAS-A-1 FW	5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAC <u>CT</u> -
<i>forward primer</i>	MUT	3'
<i>backward primer</i>	RAS Rev Dig	5'-TCAAAGAATGGTCCTGCACCAG-3'

Nach einer initialen Denaturierungsphase (94°C für 4 Minuten) wurde eine PCR des Codons 12 des *K-ras* Protoonkogens mit 45 Zyklen (Denaturierung 94°C für 15 Sekunden, Hybridisierung 53°C für 15 Sekunden, Polymerisation für 40 Sekunden) durchgeführt. Abschließend erfolgte eine finale Elongationsphase bei 72°C für 10 Minuten. Als Positiv- und Negativkontrollen wurde bei jeder PCR genetisches Material verschiedener humaner Zelllinien amplifiziert, die an Codon 12 eine Mutation oder die nicht-mutierte *wild type*-Variante aufwiesen.

Tabelle 7: PCR-Ansatz für die Amplifikation des Protoonkogens *K-ras*^{Cod12}

PCR-Ansatz	Menge
DANN	100-300 ng/ 1 µl
Optimized DyNazine TM Buffer 10x (<i>Finnzymes</i>)	5 µl
dNTPs 10 mM (<i>Finnzymes</i>)	1 µl
<i>forward primer</i> 10 pmol/µl	1 µl
<i>backward primer</i> 10 pmol/µl	1 µl
MgCl ²⁺ 25 mmol	1 µl
DyNazine TM II DNA Polymerase 2U/µl (<i>Finnzymes</i>)	1 µl
H ₂ O, steril	39 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Als Positivkontrolle wurde die humane Zelllinie *HP+SW480* (humane Plazenta-DNA plus humane kolorektale Karzinom-Zelllinie mit bekannter Mutation an Codon 12 des *K-ras*-Protoonkogens), als Negativkontrollen die humane Zelllinie *HCT116* (humane kolorektale Karzinom-Zelllinie mit nicht-mutiertem Codon 12) und *HP* (humane Plazenta-DNA) verwendet. Um eine Kontamination der Proben mit anderem genetischen Material ausschließen zu können, wurde bei jeder PCR eine Blindprobe durchgeführt, die keine DNA enthält.

Zur RFLP-Analyse des *K-ras^{Cod12}* wurde das bakterielle Enzym *BstNI* verwendet, das die DNA-Sequenz CC || WGG (W= A/T; ||= Restriktionspunkt) spezifisch erkennt. Hierzu wurde der RFLP-Ansatz für 12-16 Stunden bei 60°C in Heizblock inkubiert. Der Reaktionsansatz wird in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: RFLP-Reaktionsansatz des *K-ras^{Cod12}*-Gens

RFLP-Ansatz	Menge
PCR Produkt	20 µl
H ₂ O, steril	24 µl
<i>BstNI</i> 10 IU/µl	0,5 µl
NE Buffer 2	5 µl
Bovines Serumalbumin BSA (100x)	0,5 µl

Die PCR-Produkte der verschiedenen Tumorgewebe, die keine Mutation an Codon 12 aufweisen (*wild type*-Varianten), werden von den Endonukleasen erkannt und in zwei DNA-Fragmente hydrolysiert. Es resultieren zwei Fragmente von geringerer Größe als das anfängliche PCR-Produkt, nämlich 29 bp und 128 bp. Amplifizierte Tumor-DNA, die an einem der beiden Genloki mutiert ist, ist auch an dem Restriktionspunkt in ihrer Sequenz verändert und bietet dementsprechend keinen Erkennungs- und Ansatzpunkt für das Restriktionsenzym. Es resultiert ein in der Größe unverändertes Genprodukt von 157 bp (Codon 12). Die Größenunterschiede zwischen dem mutierten und dem *wild type*-Phänotyp stellen sich bei der darauffolgenden Gelelektrophorese dar. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung der RFLP-PCR.

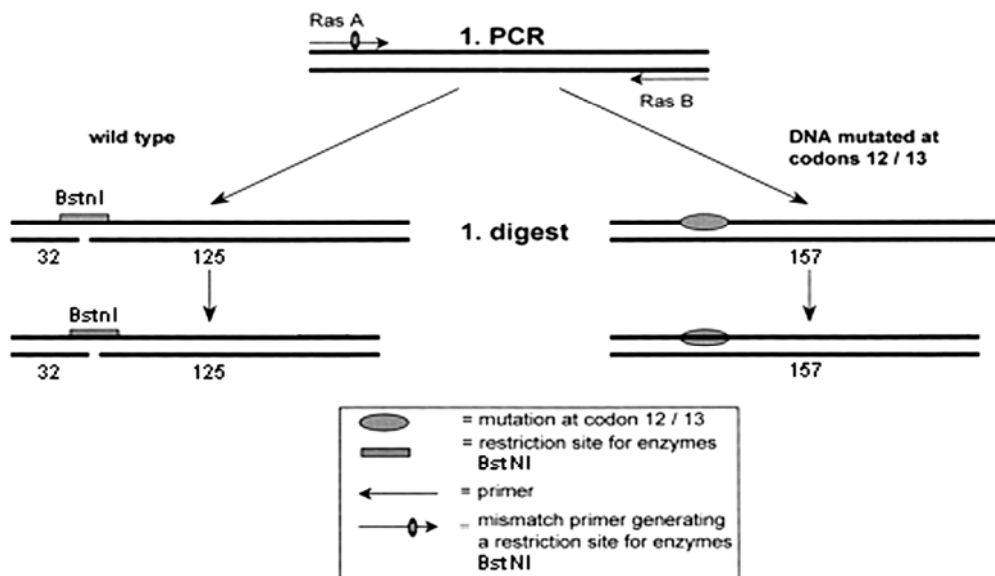


Abbildung 5: RFLP-PCR zur Mutationsanalyse des *K-ras* Protoonkogens, Codon 12, modifiziert aus Schimanski, Linnemann, Berger et al. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. *Cancer Res.* 1999⁷⁶. Nicht-mutierte *wild type K-ras^{Cod12}*-Sequenzen werden spezifisch von dem Enzym *BstNI* erkannt und in zwei DNA-Fragmente hydrolysiert. Die *K-ras^{Cod12}*-mutierte Form wird in der RFLP-Analyse nicht durch das Enzym *BstNI* hydrolysiert und stellt in der Gelelektrophorese ein anderes Bandenmuster dar.

Nach der Enzymverdauung wurden jeweils 15 µl Reaktionsprodukt mit je 3 µl Probepuffer versetzt und auf ein 3 %-iges, mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel geladen. Während der 20-minütigen Elektrophorese bei 100 Volt wurden die einzelnen RFLP-Produkte nach Größe aufgetrennt. Niedermolekulare, fragmentierte und damit nicht-mutierte DNA wanderte in dem Gel schneller, während die *K-ras*-mutierte, unfragmentierte DNA eine niedrigere Wanderungsgeschwindigkeit in dem Gel aufwies. Das unterschiedliche Bandenmuster, das durch das interkalierende Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar wurde, und der Vergleich mit der Positiv- und Negativkontrolle ermöglichte die Unterscheidung zwischen Tumorgewebe mit und ohne *K-ras*-Mutationen der entsprechenden Genabschnitte.

3.5 Statistische Analysen

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm SPSS 14.0 für Windows durchgeführt. Der Vergleich der klinisch-pathologischen Parameter zwischen den jeweiligen Gruppen erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test (Fisher's exact test) oder anhand des t-Tests nach Pearson. p-Werte von < 0.05 galten als statistisch signifikant. Die univariate Überlebensanalyse erfolgte nach der Kaplan-Meier Methode mit einer p-Wertberechnung nach dem Log Rank-Test. In die multivariate Überlebensanalyse gingen Werte aus der univariaten Analyse mit $p < 0.1$ ein. Zur Berechnung diente die Cox Regression-Analyse.

4. Ergebnisse

4.1 Demographische und klinisch-pathologische Charakterisierung der Patientenkollektive

Gegenstand dieser Studie sind intraoperativ gewonnene Pankreasresektate zweier konsekutiver Patientenserien der in Kapitel 3 genannten Institute. Von diesen beiden zwischen 1993 und 2006 resezierten Patientenkollektiven erfüllten insgesamt 119 Gewebeproben die histopathologischen Kriterien eines duktales Adenokarzinoms des exokrinen Pankreas. Die demographischen und klinisch-pathologischen Daten der beiden Patientenserien werden in Tabelle 9 dargestellt.

Die untersuchte Patientenserie setzt sich aus zwei zahlenmäßig etwa ausgeglichenen Kollektiven zusammen. 57 der 119 Patienten (47,9 %) stammen aus dem Istituto Clinico Humanitas, Mailand, während die Probengröße der Charité, Berlin mit 62 Patienten mit einem Anteil von 52,1 % zahlenmäßig gering überwiegt.

Die Kollektive sind in Bezug auf die Geschlechterverteilung und die Tumorlokalisation homogen. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung liegt in der Berliner Serie rund 3,5 Jahre unter dem der Mailänder Patientengruppe. Unterschiede der beiden Patientenkollektive werden in der Tumorklassifikation nach dem TNM-System auffällig. Beide Patientengruppen zeigen mit 43,9 % (italienische Serie) bzw. 82,3 % (deutsche Serie) eine Tendenz zu Stadium IIb nach AJCC-Kriterien (Beschreibung s. Kapitel 1, Einleitung). Die italienische Gruppe weist

jedoch einen fast ebenso großen Anteil an Stadium IIa-klassifizierten Patienten auf (31,6 %), der sich bei der deutschen Serie nur im Ausnahmefall darstellt (6,5 %). Auch im Hinblick auf die Radikalität des Eingriffes stellt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Serien dar ($p = 0.013$). 91,2 % der mailändischen Patienten wurden makroskopisch und mikroskopisch im Gesunden reseziert, während eine R0-Resektion der Berliner Karzinompatienten in nur 71 % der Fälle durchgeführt wurde.

Auffällig ist auch der abweichende Lymphknotenstatus der beiden Patientenserien. Der Nachweis von malignen Zellen in den untersuchten Lymphknoten des italienischen Kollektivs ist in 43,9 % der Patienten negativ, während die deutsche Gruppe nur 6 Patienten (9,7 %) mit einem negativen Lymphknotenstatus (N0) aufweist. Vergleichsweise selten wurde eine Resektion in beiden Gruppen an Patienten mit einem Tumorstadium I (T1 oder 2, N0) oder IV (mit Fernmetastasen, auch Befall nicht-lokoregionärer Lymphknoten) durchgeführt (s. Tabelle 9).

Der Anteil der Pankreaskarzinome mit einem mittelgradigen Differenzierungsgrad (G2) ist in beiden Patientengruppen am häufigsten (64,9 % bzw. 64,5 %). In etwa einem Drittel der Fälle handelt es sich um schlecht differenzierte Karzinome (31,6 % bzw. 30,6 %). Gut differenzierte Neoplasien sind in beiden Gruppen eher selten (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Demographische und klinisch-pathologische Charakterisierung der untersuchten Patientenkollektive

		Mailand (n = 57)		Berlin (n = 62)		
Alter (in Jahren, Mittelwert +/-SD)		64,7 (+/-8,2)		61,2 (+/-10,6)		
Alle Patienten n = 119		n	(%)	n	(%)	p
		57	(47,9)	62	(52,1)	
Geschlecht	M	36	(63,2)	36	(58,1)	0.58 [§]
	W	21	(36,8)	26	(41,9)	
Tumorlokalisation	Kopf	56	(98,2)	62	(100)	0.48 [§]
	Korpus + Schwanz	1	(1,8)	0	0	
Tumorexpansion (T)	Tis	1	(1,8)	0	0	0.18 [^]
	T1	3	(5,4)	1	(1,6)	
	T2	3	(5,3)	10	(16,1)	
	T3	48	(84,2)	47	(75,8)	
	T4	2	(3,5)	4	(6,5)	
Lymphknotenstatus (N)	N0	25	(43,9)	6	(9,7)	< 0.001 [§]
	N1	32	(56,1)	56	(90,3)	
Fernmetastasen (M)	M0	53	(93)	61	(98,4)	0.192 [§]
	M1	4	(7)	1	(1,6)	
Tumorstadium nach AJCC-Kriterien	Tis	1	(1,8)	0	0	< 0.001 [§]
	Ia	4	(7,0)	0	0	
	Ib	3	(5,3)	2	(3,2)	
	IIa	18	(31,6)	4	(6,5)	
	IIb	25	(43,9)	51	(82,3)	
	III	2	(3,5)	4	(6,5)	
Differenzierungsgrad (G)	G1	2	(3,5)	3	(4,8)	0.94 [^]
	G2	37	(64,9)	40	(64,5)	
	G3	18	(31,6)	19	(30,6)	
OP-Radikalität (R)	R0	52	(91,2)	44	(71)	0.013 [^]
	R1	5	(8,8)	14	(22,6)	
	R2	0	0	4	(6,5)	

[§] Exakter Test nach Fisher [^] Chi-Quadrat nach Pearson

4.2 Überlebensanalyse der Patientenserien

4.2.1 Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs

Die durchschnittliche Überlebenszeit beider Patientenserien beträgt 19,8 Monate nach chirurgischer Intervention. Abbildung 6 stellt graphisch die Überlebensrate der untersuchten Patienten beider Kollektive dar.

Das 1-Jahresüberleben betrug 64,7 %, die 2-Jahres- und 3-Jahresüberlebensrate lagen bei 37 % bzw. 27,7 %. Fünf Jahre nach chirurgischer Therapie lebten nur noch 21,8 % der operierten Patienten. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die postoperativen Überlebensraten.

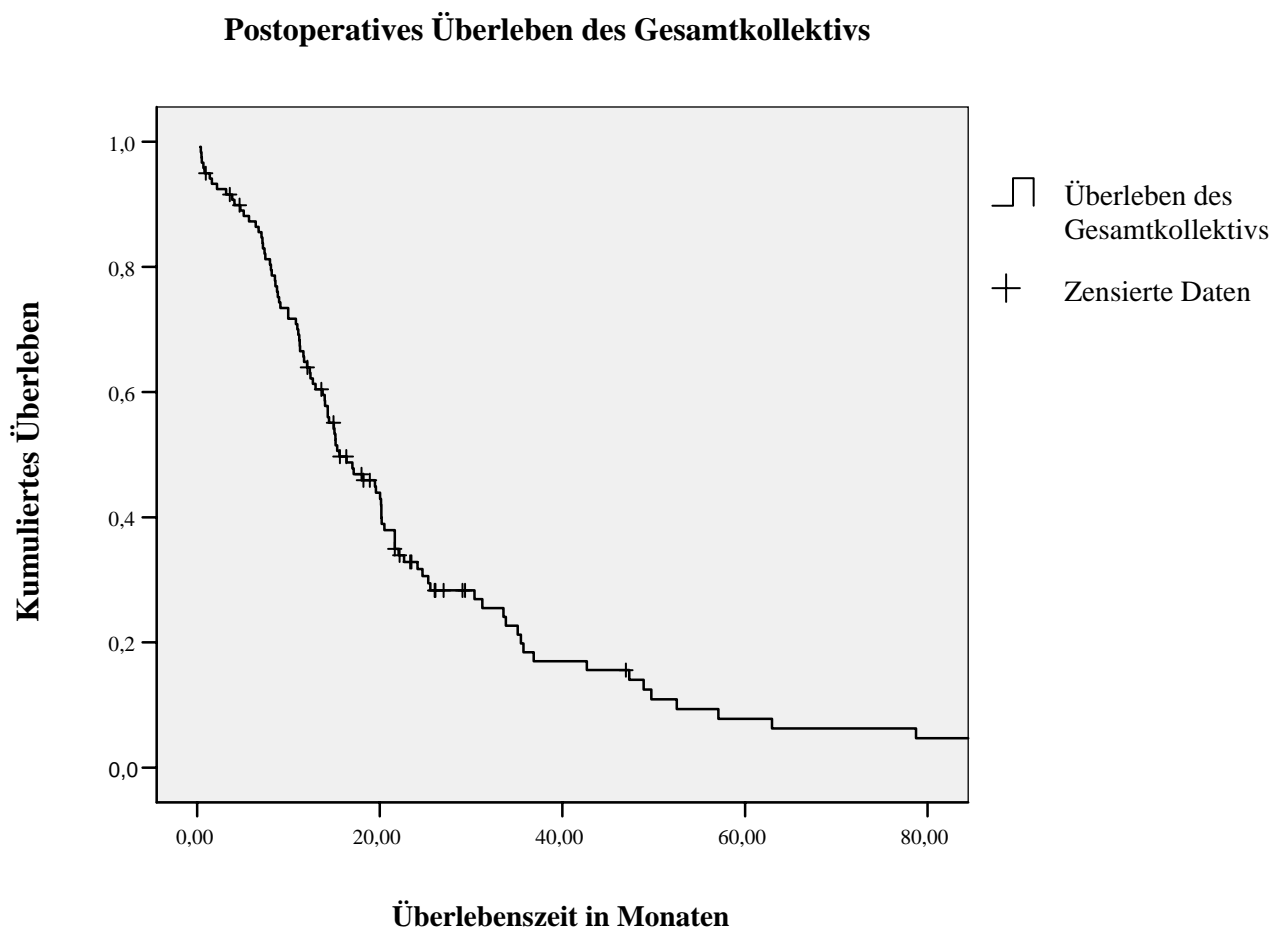


Abbildung 6: Postoperatives Überleben des gesamten Patientenkollektivs nach Kaplan-Meier. Nach 5 Jahren leben noch 21,8 % der operierten Patienten.

4.2.2 Überlebensanalyse beider Patientenserien im Vergleich

Die durchschnittliche Überlebenszeit der Patientengruppe der Berliner Charité liegt mit 18,2 Monaten leicht unter der des italienischen Patientenkollektivs (21,5 Monate). Der Unterschied ist jedoch mit $p > 0.05$ statistisch nicht signifikant. Abbildung 7 stellt die Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier dar. Es stellen sich keine Unterschiede bezüglich des postoperativen Überlebens mit einem p -Wert = 0.543 (Log Rank Test) dar. Auch in der 1-Jahres, 2- und 3-Jahres sowie in der 5-Jahresüberlebensrate stellen sich zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede dar (s. Tabelle 10).

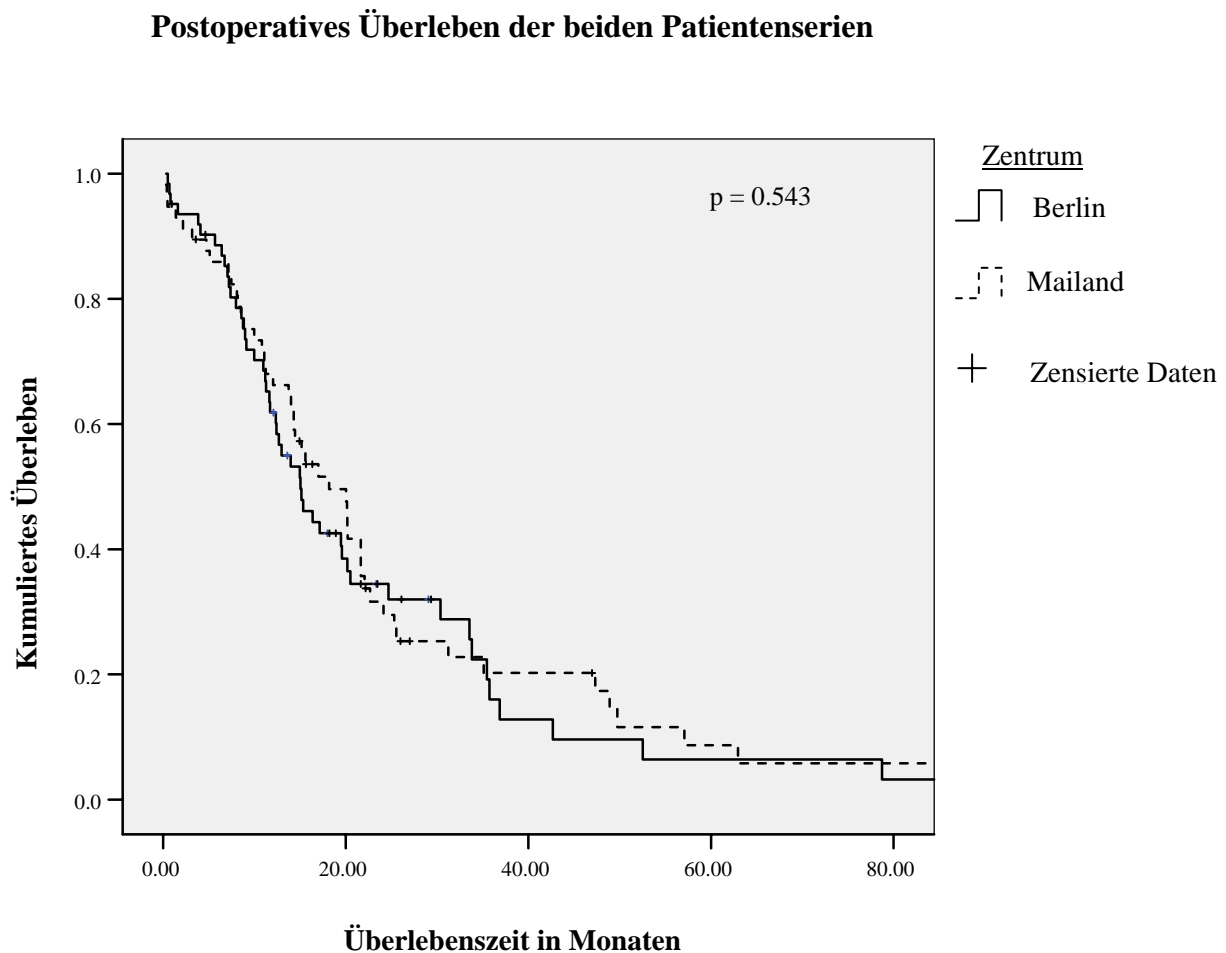


Abbildung 7: Postoperatives Überleben beider Patientenserien nach Kaplan-Meier. Die Unterschiede sind nicht signifikant auf dem 5 %-Niveau.

Tabelle 10: Überlebensraten der italienischen und deutschen Patientenserien. Zur p-Wertberechnung wurde der Log-Rank-Test verwendet. Die Unterschiede des postoperativen Überlebens sind statistisch nicht signifikant.

	Berlin	Mailand	Gesamt	P
1-Jahres Überlebensrate	62,9 %	66,7%	64,7 %	0,69
2-Jahres Überlebensrate	38,7 %	35,1 %	37,0 %	0,83
3-Jahres Überlebensrate	29 %	26,3 %	27,7 %	0,72
5-Jahres Überlebensrate	24,2 %	19,3 %	21,8 %	0,65

4.3 Überlebensanalyse in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Parametern

Eine tabellarische Beschreibung und Erläuterung der Tumorklassifikation nach dem TNM-System und der Tumorstadien nach AJCC-Kriterien, sechste Edition, finden sich in Kapitel 1 (Einleitung).

4.3.1 Lokale Tumorexpansion (T) und postoperatives Überleben

Abbildung 8 stellt die Überlebensdauer in Abhängigkeit von der lokalen Tumorexpansion (T) dar. T1 und T2 sowie T3 und T4 sind in der Graphik zur besseren Überschaubarkeit jeweils zusammengefasst. In die Berechnung des p-Wertes (s. Graphik) sind die Parameter einzeln eingegangen. Die Unterschiede in der Überlebensdauer sind mit $p < 0.001$ statistisch signifikant. Die Überlebenschance sinkt demnach mit steigender lokaler Tumorexpansion.

Postoperatives Überleben in Abhängigkeit von der lokalen Tumorexpansion (T)

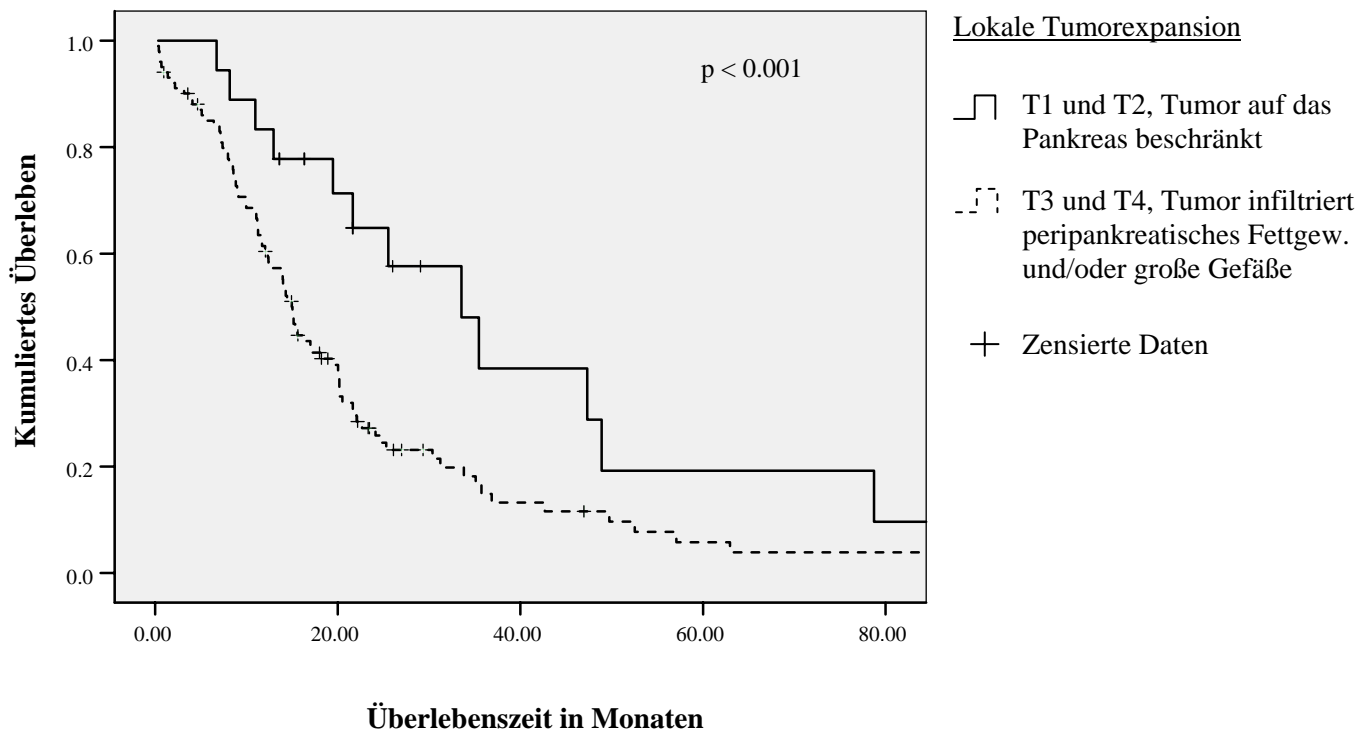


Abbildung 8: Postoperatives Überleben in Abhängigkeit von der lokalen Tumorexpansion nach Kaplan-Meier. Das postoperative Überleben wird mit $p < 0.001$ (Log Rank-Test) statistisch signifikant von der Tumorgöße beeinflusst.

4.3.2 Lymphknotenstatus (N) und postoperatives Überleben

88 der 119 Patienten (73,9 %) weisen einen Tumorbefall lokaler Lymphknoten (N1) auf. In Abbildung 9 wird das postoperative Überleben über einen Zeitraum von 80 Monaten in Abhängigkeit von einem malignen Lymphknotenbefall dargestellt. Das kumulierte Überleben bei Patienten, in deren Lymphknoten kein Nachweis von malignen Zellen erbracht wurde, stellt sich dabei günstiger dar, als bei Patienten mit positivem Lymphknotenbefall. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Postoperatives Überleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

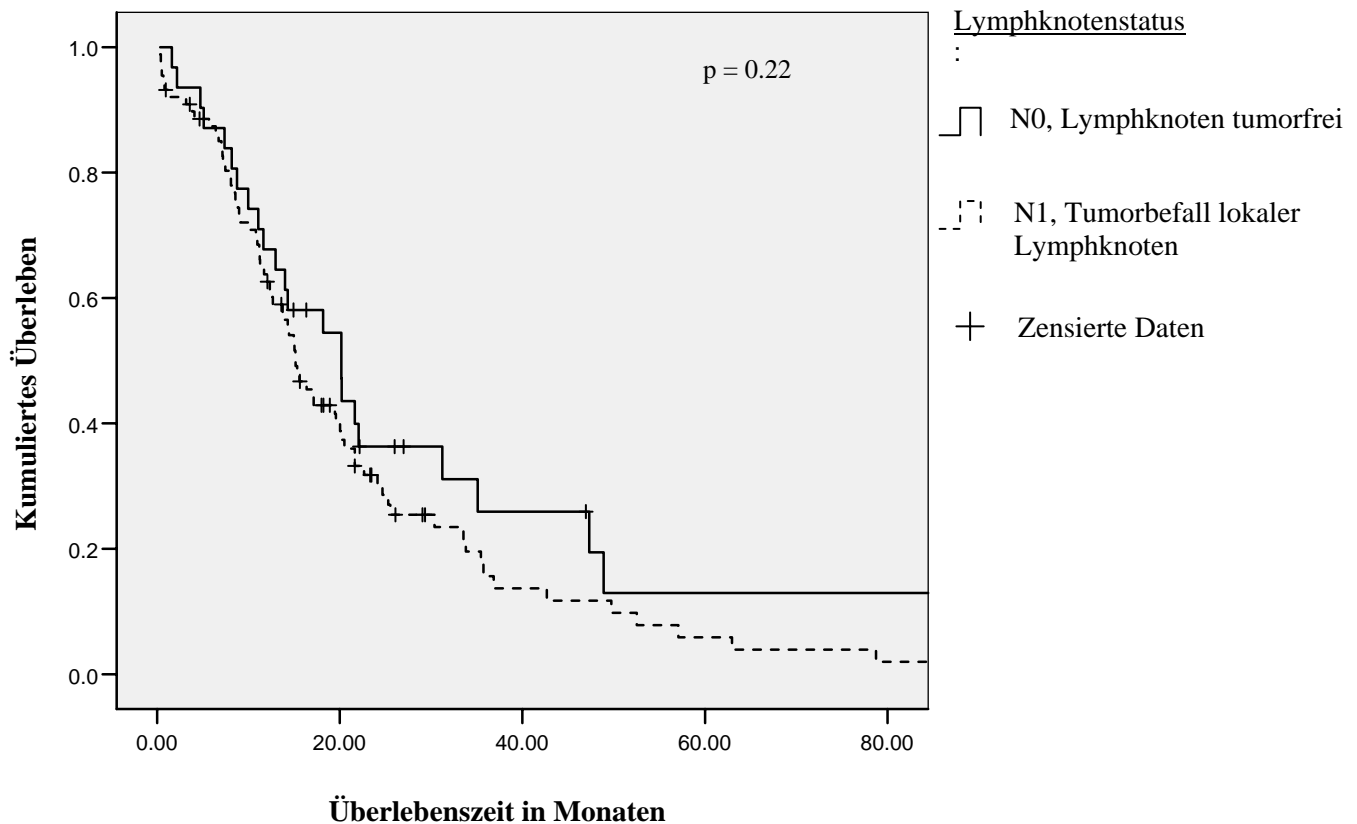


Abbildung 9: Postoperatives Überleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus (N) nach Kaplan-Meier.

4.3.3 AJCC-Stadieneinteilung und postoperatives Überleben

76 der 119 Patienten (63,9 %) sind in das Stadium IIb nach AJCC-Klassifikation einzuordnen. Abbildung 10 gibt das kumulierte Überleben nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von den einzelnen Tumorstadien wieder. Zur besseren Übersicht werden die Stadien mit negativem Lymphknotenbefall (Tis, Ia, Ib und IIa) sowie die Stadien III und IV in Abbildung 10 zusammengefasst. Stadium IIb wird separat dargestellt. In die statistische Analyse gehen die einzelnen Stadien getrennt ein. Patienten in einem niedrigen Tumorstadium, das heißt mit einem auf das Pankreas limitierten Tumor und ohne malignen Lymphknotenbefall leben signifikant länger als Patienten mit einem fortgeschrittenen Krankheitsprozess.

Postoperatives Überleben in Abhängigkeit vom Tumorstadium

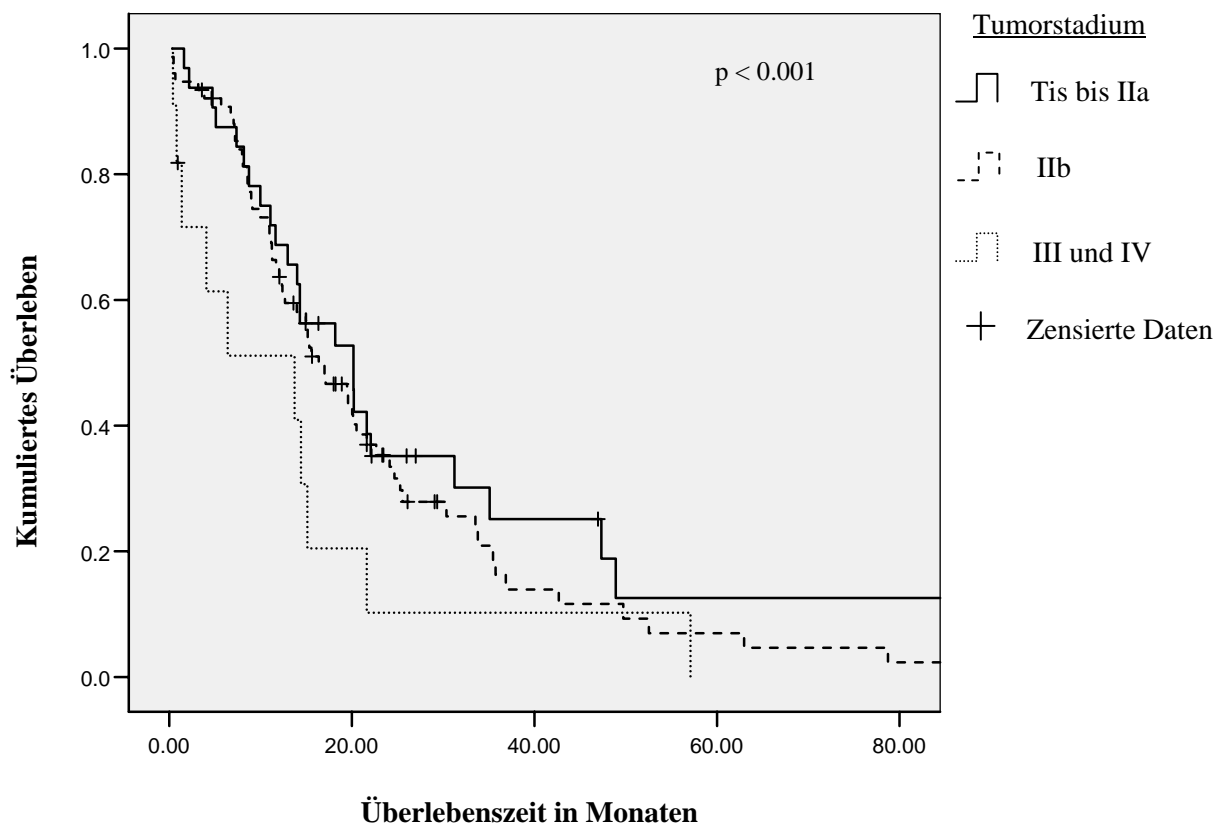


Abbildung 10: Postoperatives Überleben der unterschiedlichen AJCC-Stadien nach Kaplan-Meier. Der p-Wert ist im Log Rank-Test mit $p < 0.001$ statistisch signifikant.

4.3.4 Differenzierungsgrad (G) und postoperatives Überleben

In beiden Patientenserien waren Pankreaskarzinome vom mittelgradig differenzierten Typ (G2) am häufigsten vertreten (64,9 % bzw. 64,5 %). Schlecht differenzierte Karzinome (G3) machten jeweils rund ein Drittel der Pankreasneoplasien aus und schienen sich in dem untersuchten Patientenkollektiv in Bezug auf das Überleben leicht nachteilig auszuwirken (s. Abbildung 11). In der statistischen Analyse sind Unterschiede des postoperativen Überlebens nicht signifikant (s. unten).

Postoperatives Überleben in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad

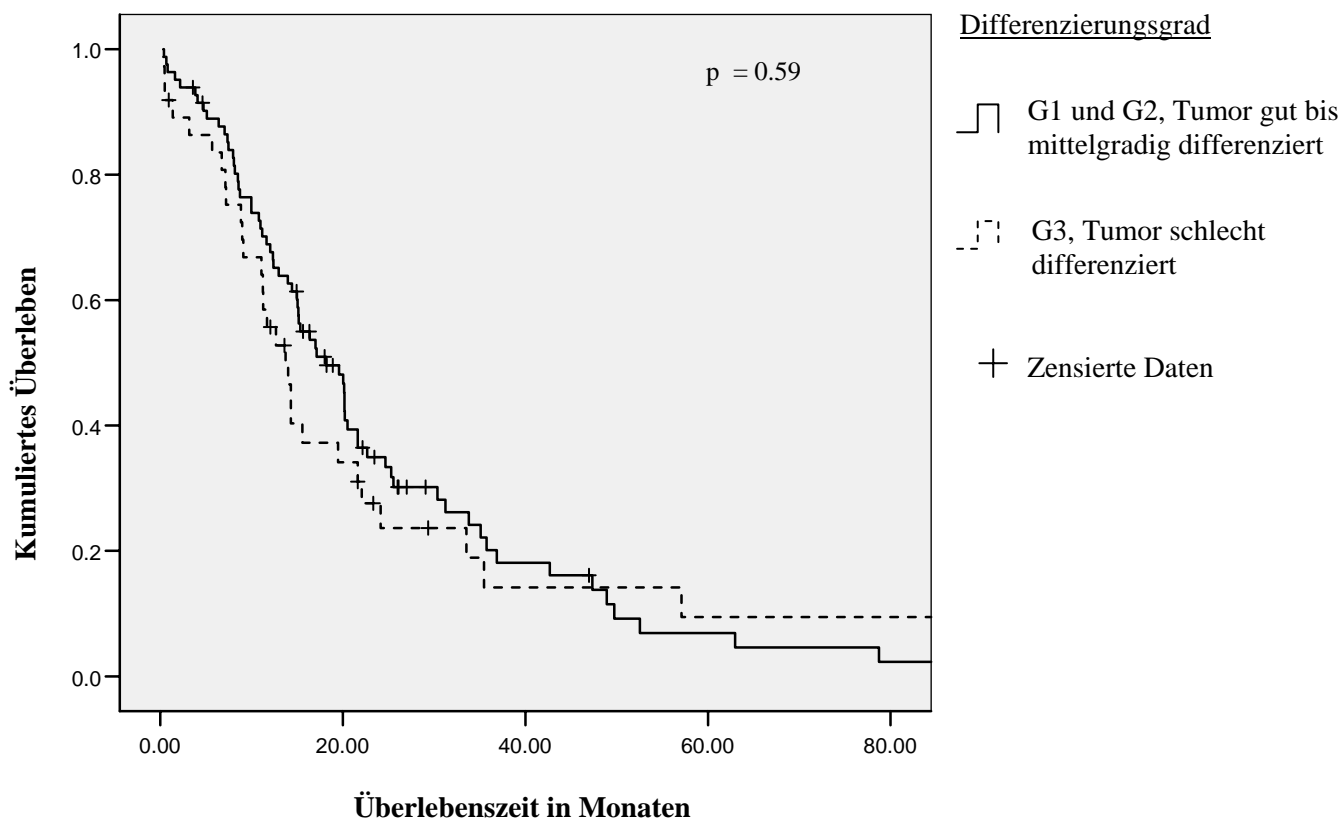


Abbildung 11: Postoperatives Überleben in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad (G) nach Kaplan-Meier.

Nach einem Jahr leben noch 100 % (5/5) der Patienten mit einem gut differenzierten (G1) Karzinom und 66,2 % der Patienten (51/77) mit einem mittelgradig differenzierten Tumor (G2). Der Anteil der nach einem Jahr nach Operation noch lebenden Patienten mit einem schlecht differenzierten Tumor (G3) beträgt 56,8 % (21/37). Die 3-Jahresüberlebensrate beträgt für die gut differenzierten Tumore 60 % und für die mittelgradig differenzierten Karzinome 27,3 %, während die Patienten mit schlecht differenzierten Neoplasien eine Überlebensrate von nur noch 24,3 % aufweisen. Von den Patienten mit einem gut differenzierten Karzinom leben nach 5 Jahren noch 40 %, während die Rate an noch lebenden G2- und G3-Karzinompatienten nur noch 20,8 % bzw. 21,6 % beträgt.

4.3.5 OP-Radikalität (R) und postoperatives Überleben

Postoperatives Überleben in Abhängigkeit von der OP-Radikalität

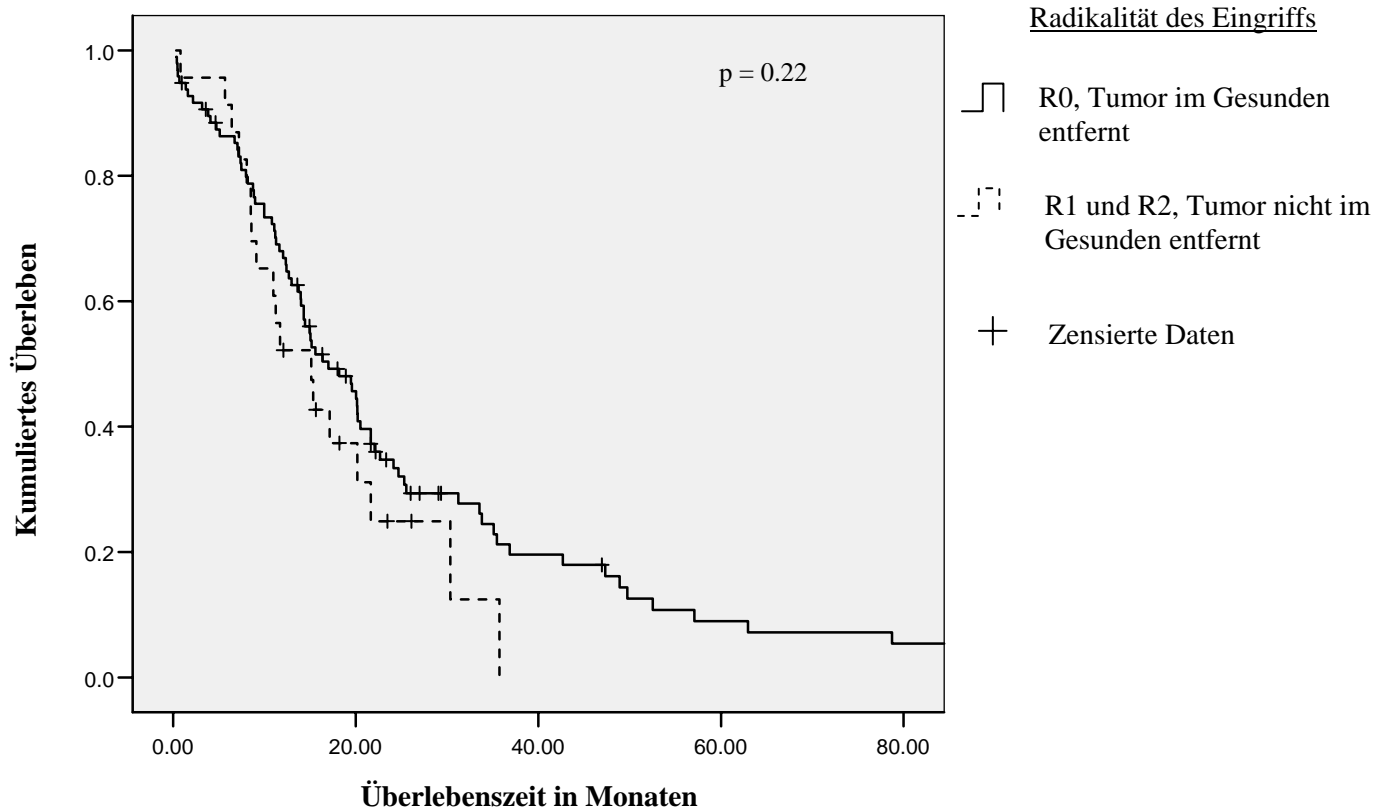


Abbildung 12: Postoperatives Überleben in Abhängigkeit von der OP-Radikalität nach Kaplan-Meier.

96 der 119 Patienten konnten radikal bei vollständiger mikroskopischer und makroskopischer Entfernung des Tumors im Gesunden operiert werden. Bei 19 Patienten wurde eine R1-Resektion durchgeführt und bei 4 Patienten konnte der Tumor auch makroskopisch nicht vollständig entfernt werden (R2). Abbildung 12 zeigt das Überleben in Abhängigkeit von der OP-Radikalität. Die graphische Darstellung erfolgt getrennt nach vollständiger (R0-) und nicht-radikaler (R1 und R2-) Resektion. Für die Berechnung des p-Werts wurden die Parameter hingegen einzeln berücksichtigt.

4.3.6 Multivariate Überlebensanalyse der klinisch-pathologischen und molekularbiologischen Parameter

Zur Bestimmung der für das Überleben unabhängigen Parameter wurde die Cox Regression-Analyse als multivariates Testverfahren durchgeführt. Hier zeigte sich lediglich der Parameter lokale Tumorexpansion (T) als statistisch signifikant für das Überleben ($p = 0.003$). Eine Übersicht über die uni- und multivariate Überlebensanalyse gibt Tabelle 11.

Tabelle 11: Mittlere Überlebenszeiten in Abhängigkeit von den einzelnen histopathologischen und molekularbiologischen Parameter

Faktor		Mittleres Überleben ^o	p-Wert univariat [^]	p-Wert multivariat [*]	Hazard Risiko [*]	95 % CI [*]
Tumorexpansion	T1	31,2	< 0.001	0.003	2,1	1,3-3,4
	T2	29,8				
	T3	18,8				
	T4	4,7				
Lymphknotenstatus	N0	23,4	0.22	-	-	-
	N1	18,5				
AJCC-Stadium	I bis IIa	23,1	< 0.001	0,61	1,4	1,0-1,9
	IIb	19,5				
	III und IV	12,4				
Histologische Differenzierung	G1	24,5	0.59	-	-	-
	G2	19,9				
	G3	18,9				
OP-Radikalität	R0	21,0	0.22	-	-	-
	R1	16,0				
	R2	8,7				
K-ras Status	K-ras wt	20,7	0.36	-	-	-
	K-ras mut	19,5				

^o in Monaten

[^] Log Rank-Test

^{*} Cox Regression-Analyse

4.4 $K\text{-ras}^{\text{Cod12}}$ -Mutationsanalyse

4.4.1 $K\text{-ras}^{\text{Cod12}}$ -Mutationsfrequenz und klinisch-pathologische Beschreibung der beiden Patientenkollektive nach $K\text{-ras}^{\text{Cod12}}$ -Mutationsstatus

In Bezug auf die Mutationshäufigkeit des $K\text{-ras}^{\text{Cod12}}$ -Protoonkogens erscheinen die beiden Patientenserien homogen. So weist in der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) das italienische Kollektiv eine Mutationsrate von 79,7 % und die deutsche Patientenserie eine Mutationsrate von 77,4 % auf.

Tabelle 12 stellt die klinisch-pathologischen Parameter der italienischen und deutschen Patientenserie, unterteilt nach $K\text{-ras}^{\text{Cod12}}$ -Mutationsstatus, gegenüber. Die Verteilung der Mutationsträger und nicht mutierten Phänotypen auf die Gruppierungen Geschlecht, Tumorexpanansion (T), Lymphknotenstatus (N), Differenzierungsgrad (G) und OP-Radikalität unterscheiden sich zwischen den beiden Nationalitäten nur unwesentlich.

Patienten, die aufgrund eines Tumorbefalls nicht-lokoregionärer Lymphknoten als M1 (fernmetastasiert) klassifiziert wurden, sind alle Träger eines mutierten $K\text{-ras}^{\text{Cod12}}$ -Gens. In der Gruppe der $K\text{-ras}^{\text{Cod12}}$ *wild type*-Genotypen finden sich hingegen keine Fernmetastasen. Patienten im Stadium IV nach AJCC-Klassifikation weisen daher alle ein mutiertes Codon 12 des $K\text{-ras}$ -Protoonkogens auf.

4.4.2 Tumorexpanansion, Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung, Stadieneinteilung und Differenzierungsgrad der $K\text{-ras}^{\text{Cod12}}$ -Mutationsträger und der $K\text{-ras}^{\text{Cod12}}$ *wild type*-Genotypen

Insgesamt weisen 78,2 % der Patienten beider Patientenkollektive Mutationen des $K\text{-ras}^{\text{Cod12}}$ -Protoonkogens auf. In der klinisch-pathologischen Charakterisierung besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mutationsträgern und den $K\text{-ras}^{\text{Cod12}}$ *wild type*-Merkmalsträgern. Der prozentuale Anteil mutierter und nicht-mutierter Phänotypen weicht sowohl in der histopathologischen Charakterisierung Tumorexpanansion (T), Lymphknotenstatus (N) und AJCC-Stadieneinteilung nicht signifikant voneinander ab (s. Tabelle 13).

Tabelle 12: Demographische und klinisch-pathologische Charakterisierung der *K-ras*^{Cod12} - Mutationsträger und der nicht-mutierten (*wild type*) Genotypen, aufgetrennt nach Patientenserien

		Mailand (n = 57)				Berlin (n = 62)			
		<i>K-ras</i> ^{c12} mut		<i>K-ras</i> ^{c12} wt		<i>K-ras</i> ^{c12} mut		<i>K-ras</i> ^{c12} wt	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Patientenserien n = 119		45	(79,7)	12	(20,3)	48	(77,4)	14	(22,6)
Geschlecht	M	29	(61,7)	7	(58,3)	25	(52,1)	11	(78,6)
	W	16	(38,3)	5	(41,7)	23	(47,9)	3	(21,4)
Tumorexpansion (T)	Tis	1	(2,2)	0	0	0	0	0	0
	T1	2	(4,4)	1	(8,3)	1	(2,1)	0	0
	T2	2	(4,4)	1	(8,3)	5	(10,4)	5	(35,7)
	T3	38	(84,4)	10	(83,3)	39	(81,3)	8	(57,1)
	T4	2	(4,4)	0	0	3	(8,3)	1	(7,1)
Lymphknotenstatus (N)	N0	16	(35,6)	9	(75)	5	(10,4)	1	(7,1)
	N1	29	(64,4)	3	(25)	43	(89,6)	13	(92,9)
Fernmetastasen (M)	M0	41	(91,1)	12	(100)	47	(97,9)	14	(100)
	M1	4	(8,9)	0	0	1	(2,1)	0	0
AJCC-Stadium	Tis	1	(2,2)	0	0	0	0	0	0
	Ia	2	(4,4)	2	(16,7)	0	0	0	0
	Ib	2	(4,4)	1	(8,3)	1	(2,1)	1	(7,1)
	IIa	12	(26,7)	6	(50,0)	4	(6,3)	0	0
	IIb	22	(48,9)	3	(25,0)	39	(81,3)	12	(92,9)
	III	2	(4,4)	0	0	3	(8,3)	1	(7,1)
	IV	4	(8,9)	0	0	1	(2,1)	0	0
Differenzierung (G)	G1	0	0	2	(4,4)	2	(4,2)	1	(7,1)
	G2	28	(62,2)	9	(75)	31	(64,6)	9	(64,3)
	G3	17	(37,8)	1	(8,3)	15	(31,2)	4	(28,6)
OP-Radikalität (R)	R0	40	(88,9)	12	(100)	32	(66,7)	12	(85,7)
	R1	5	(11,1)	0	0	12	(25,0)	2	(14,3)
	R2	0	0	0	0	4	(8,3)	0	0

K-ras^{Cod12}-Mutationsträger zeigen einen deutlichen Trend zu einem schlechteren Differenzierungsgrad (G3), mit einem grenzwertigen p-Wert von $p = 0.05$. 86,5 % (32/37) der schlecht differenzierten Tumoren (G3) weisen aktivierende *K-ras*^{Cod12} Mutationen auf, während nur 13,5 % des G3-Typs die nicht-mutierte *K-ras*^{Cod12} *wild type*-Variante aufweist. Auch unter den mittelgradig differenzierten Karzinomen überwiegen Merkmalsträger der *K-ras*^{Cod12} Mutation mit 76,6 % gegenüber der Patienten ohne *K-ras*-Mutation (23,4 %). Gut differenzierte Karzinome zeigen hingegen mit einem prozentualen Anteil von 60 % häufiger ein nicht-mutiertes *K-ras*^{Cod12}-Protoonkogen.

Patienten mit einem positiven Lymphknotenbefall haben zu 81,8 % ein mutiertes *K-ras*^{Cod12}-Gen, während nur 67,7 % der Patienten mit tumorfreien Lymphknoten (N0) Merkmalsträger eines *K-ras*^{Cod12}-mutierten Gens sind. Die Träger eines nicht-mutierten *K-ras*-Gens sind in der Gruppe der Patienten mit tumorfreien Lymphknoten mit 32,3 % hingegen häufiger vertreten, während nur 18,2 % eine Mutation des *K-ras*-Gens bei tumorfreiem Lymphknotenstatus zeigen. Patienten mit lokoregionären Lymphknotenmetastasen sind also häufiger Merkmalsträger eines mutierten *K-ras*-Protoonkogens als einer nicht-mutierten *K-ras wild type*-Variante, während bei Patienten mit tumorfreien Lymphknoten (N0) *K-ras*-Mutationen seltener aufzufinden sind als ein *K-ras* negativer *wild type*-Phänotyp.

Auch bezüglich der Radikalität des Eingriffs gibt es einen Trend von einer höheren *K-ras*-Mutationsrate zu einer weniger radikalen chirurgischen Resektion. R2-Resektionen, also Resektionen, die weder mikroskopisch noch makroskopisch im Gesunden stattgefunden haben, wurden alle an *K-ras*^{Cod12}-mutierten Patienten durchgeführt. Die Patienten, die Fernmetastasen oder einen Tumorbefall nicht-lokoregionärer Lymphknoten aufweisen, sind alle Träger eines mutierten *K-ras*^{Cod12}-Protoonkogens.

Tabelle 13: TNM-Klassifikation, AJCC-Stadien und Differenzierung der *K-ras*^{Cod12} - Mutationsträger und der nicht-mutierten (*wild type*) Genotypen des Gesamtkollektivs

		<i>K-ras</i> ^{cod12} mut		<i>K-ras</i> ^{cod12} wt		
		n	(%)	n	(%)	p
Alle Patienten n=119		93	(78,2)	26	(21,8)	
Tumorexpansion (T)	Tis	1	(1,1)	0	0	0,17 [^]
	T1	3	(3,2)	1	(3,8)	
	T2	7	(7,5)	6	(23,1)	
	T3	77	(82,8)	18	(69,2)	
	T4	5	(5,4)	1	(3,8)	
Lymphknotenstatus (N)	N0	21	(22,6)	10	(38,5)	0,13 [§]
	N1	72	(77,4)	16	(61,5)	
Fernmetastasen (M)	M0	88	(94,6)	26	(100)	0,58 [^]
	M1	5	(5,4)	0	0	
AJCC-Tumorstadium	Tis	1	(1,1)	0	0	0,55 [^]
	Ia	1	(1,1)	1	(3,8)	
	Ib	2	(2,2)	2	(7,7)	
	IIa	17	(18,3)	7	(26,9)	
	IIb	62	(66,7)	15	(57,7)	
	III	5	(5,4)	1	(3,8)	
	IV	5	(5,4)	0	0	
Differenzierungsgrad (G)	G1	2	(2,2)	3	(11,5)	0,05 [^]
	G2	59	(63,4)	18	(69,2)	
	G3	32	(34,4)	5	(19,2)	
OP-Radikalität (R)	R0	72	(77,4)	24	(92,3)	0,21 [^]
	R1	17	(18,3)	2	(7,7)	
	R2	4	(4,3)	0	0	

[§] Exakter Test nach Fisher [^] Chi-Quadrat nach Pearson

4.4.3 Überlebensanalyse der *K-ras*^{Cod12}-Mutationsträger und *K-ras*^{Cod12} wild type-Genotypen

In Abbildung 13 wird das postoperative Überleben der *K-ras*^{Cod12}-Mutationsträger und der nicht-mutierten *K-ras*^{Cod12} wild type-Phänotypen über einen Zeitraum von 2 Jahren (24 Monate) dargestellt. 24 Monate nach chirurgischer Intervention lebten noch 37 % der Patienten. 53,8 % der Träger eines nicht-mutierten *K-ras* wild type Gens waren zu diesem Zeitpunkt noch am Leben, während von den mutierten *K-ras* Phänotypen nur noch 32,3 % der Patienten lebten. Der Unterschied ist mit $p = 0.049$ statistisch signifikant. Insgesamt wiesen von den 119 Patienten lediglich 26 einen nicht-mutierten *K-ras*^{Cod12}-Status auf, 93 Patienten beider Kollektive waren Mutationsträger des *K-ras*^{Cod12}-Protoonkogens.

Patienten ohne Mutation des *K-ras*^{Cod12}-Gens wiesen innerhalb der ersten 24 Monate nach Operation einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den Mutationsträgern auf. Nach 2 Jahren lebten noch 50 % (11/22) der Patienten mit einem nicht-mutierten *K-ras* Gen, von den *K-ras*^{Cod12}-Mutationsträgern waren nach 2 Jahren hingegen nur noch 22 % am Leben.

Während der direkten postoperativen Phase sowie zwei Jahre nach chirurgischer Therapie scheint sich die Überlebenschance zwischen den *K-ras* wild type-Phänotypen und den *K-ras*-Mutationsträgern bei bedeutender Fallzahlverringering anzugleichen. Abbildung 15 zeigt die Überlebensanalyse von Mutationsträgern und nicht-mutierten Phänotypen 5 Jahre nach Operation. Es besteht kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Überlebenschancen der beiden *K-ras*-Varianten ($p = 0.36$).

2-Jahresüberleben in Abhängigkeit vom $K\text{-ras}^{Cod12}$ -Mutationsstatus

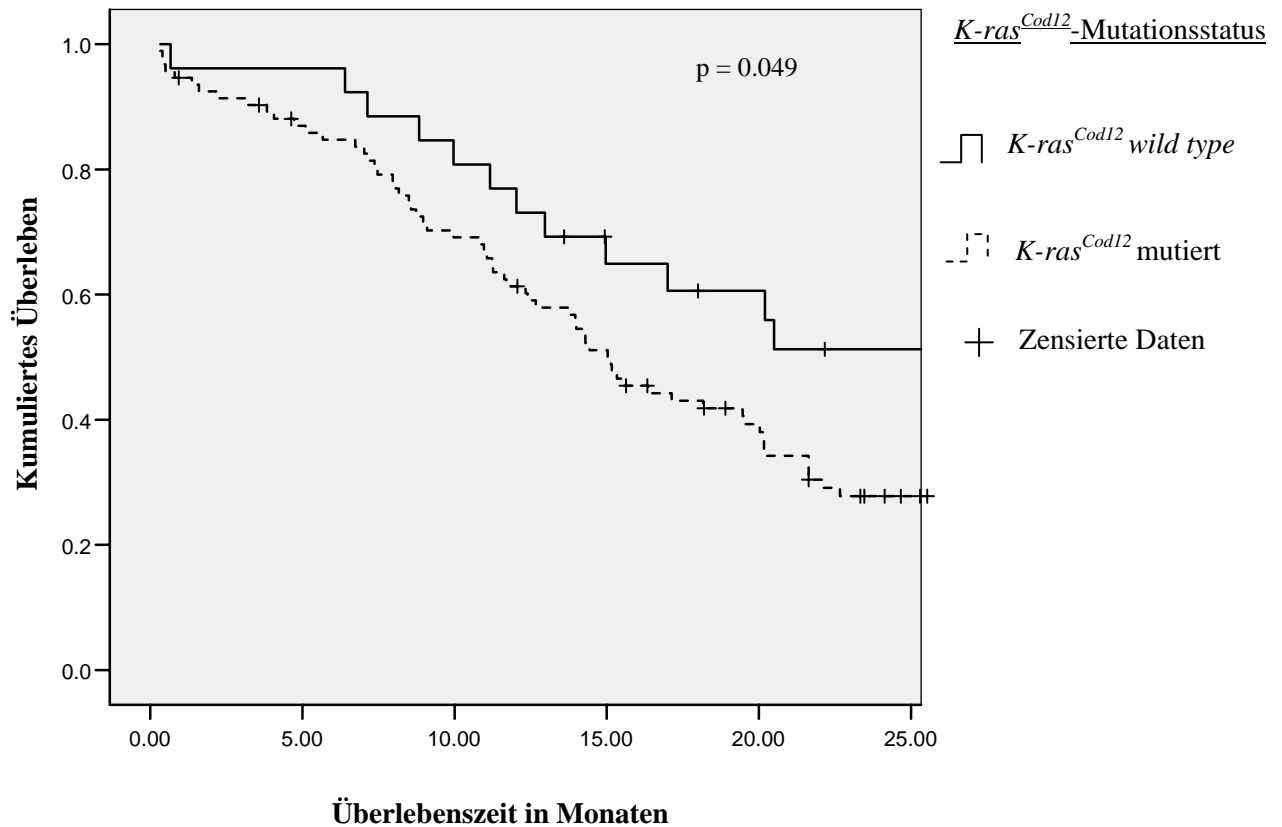


Abbildung 13: Überlebensstatus der italienischen und deutschen Patienten nach 2 Jahren in Abhängigkeit vom $K\text{-ras}^{Cod12}$ -Mutationsstatus. $K\text{-ras}^{Cod12}$ wild type-Phänotypen weisen einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil auf ($p = 0.049$).

In der Abbildung 14 wird die Sterbewahrscheinlichkeit von $K\text{-ras}^{Cod12}$ -Mutationsträgern und nicht-mutierten wild type-Phänotypen über ein 2-jähriges postoperatives Intervall dargestellt. In der abgebildeten Hazardfunktion zur Risikoabschätzung wird deutlich, dass $K\text{-ras}$ -Mutationsträger einem erhöhten Sterberisiko ausgesetzt sind.

Hazard-Funktion zur Risikoabschätzung von $K\text{-ras}^{Cod12}$ -Mutationen nach 2 Jahren

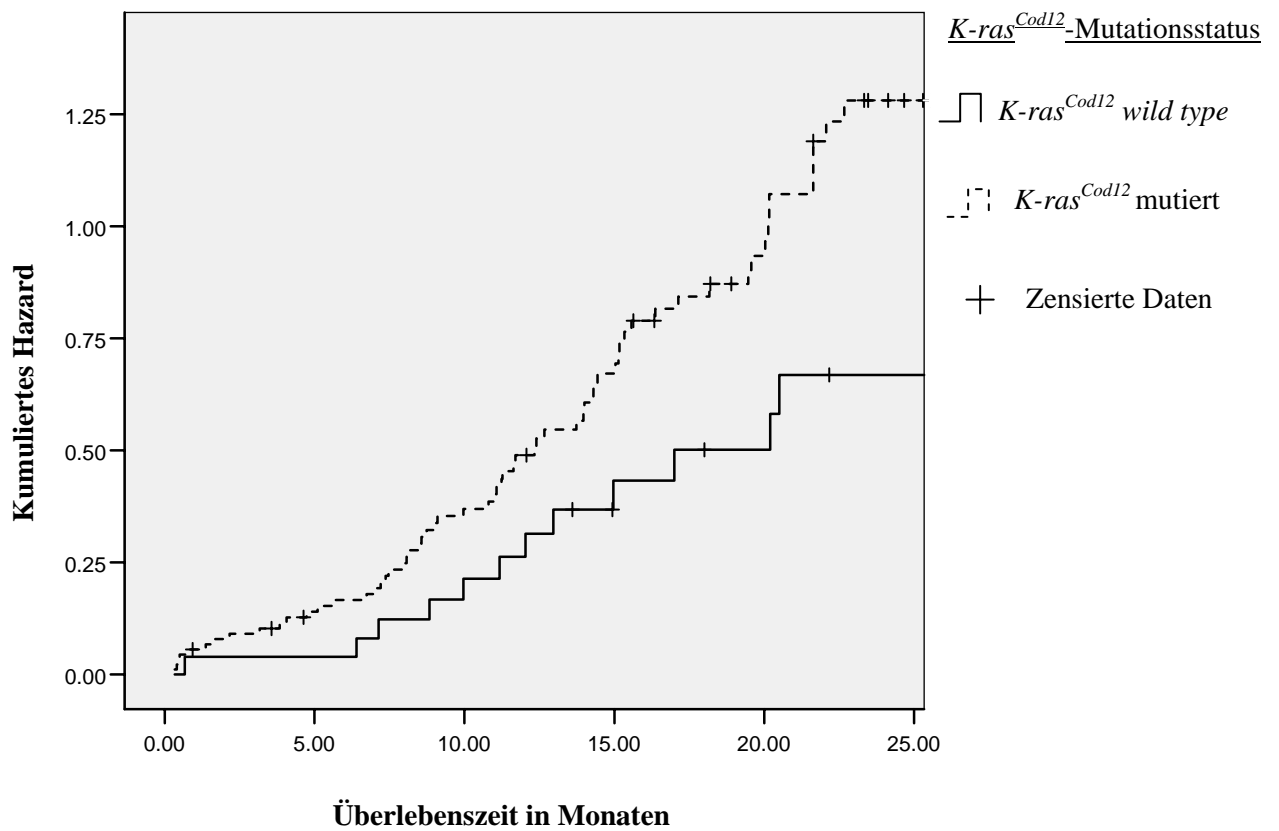


Abbildung 14: Risikoabschätzung von $K\text{-ras}^{Cod12}$ -Mutationen. Dargestellt ist die Hazardfunktion für einen Zeitraum von 2 Jahren nach Operation. $K\text{-ras}^{Cod12}$ -Mutationsträger unterliegen in diesem Intervall einer erhöhten Sterbewahrscheinlichkeit.

5-Jahresüberleben in Abhängigkeit vom $K-ras^{Cod12}$ -Mutationsstatus

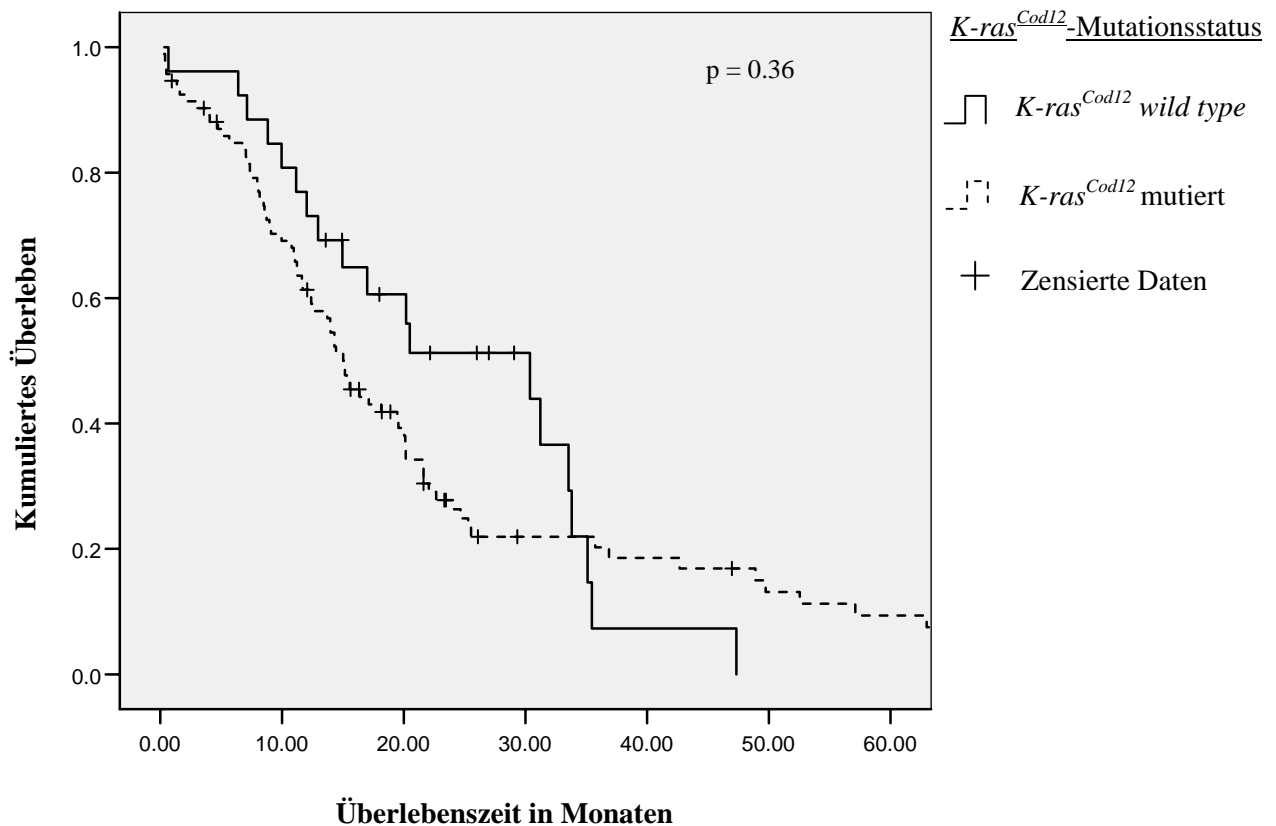


Abbildung 15: Überlebensanalyse von $K-ras^{Cod12}$ Mutationsträgern und nicht-mutierten $K-ras$ wild type Phänotypen über ein 5-jähriges postoperatives Intervall.

Abbildung 16 gibt die Hazardfunktion zur Risikoabschätzung der Sterbewahrscheinlichkeit $K-ras^{Cod12}$ mutierter Phänotypen nach 5 Jahren wieder. Auch hier wird deutlich, dass sich die Todeswahrscheinlichkeit in der direkten postoperativen Phase und nach einem postoperativen Intervall von rund drei Jahren kaum noch zwischen den unterschiedlichen $K-ras$ -Varianten unterscheidet. Der günstige Einfluss des nicht-mutierten $K-ras^{Cod12}$ wild type-Genotyps auf das Überleben scheint sich bei Verringerung der Fallzahl lediglich in den ersten 30 Monaten nach chirurgischer Therapie auszuwirken.

Abbildung 17 zeigt beispielhaft ein Foto des Bandenmusters einer PCR des $K-ras^{Cod12}$ -Protoonkogens, in Abbildung 18 wird ein Foto des Bandenmusters einer mit dem Enzym *BSTNI* durchgeführten RFLP-Analyse dargestellt.

Hazard-Funktion zur Risikoabschätzung von $K\text{-ras}^{Cod12}$ -Mutationen nach 5 Jahren

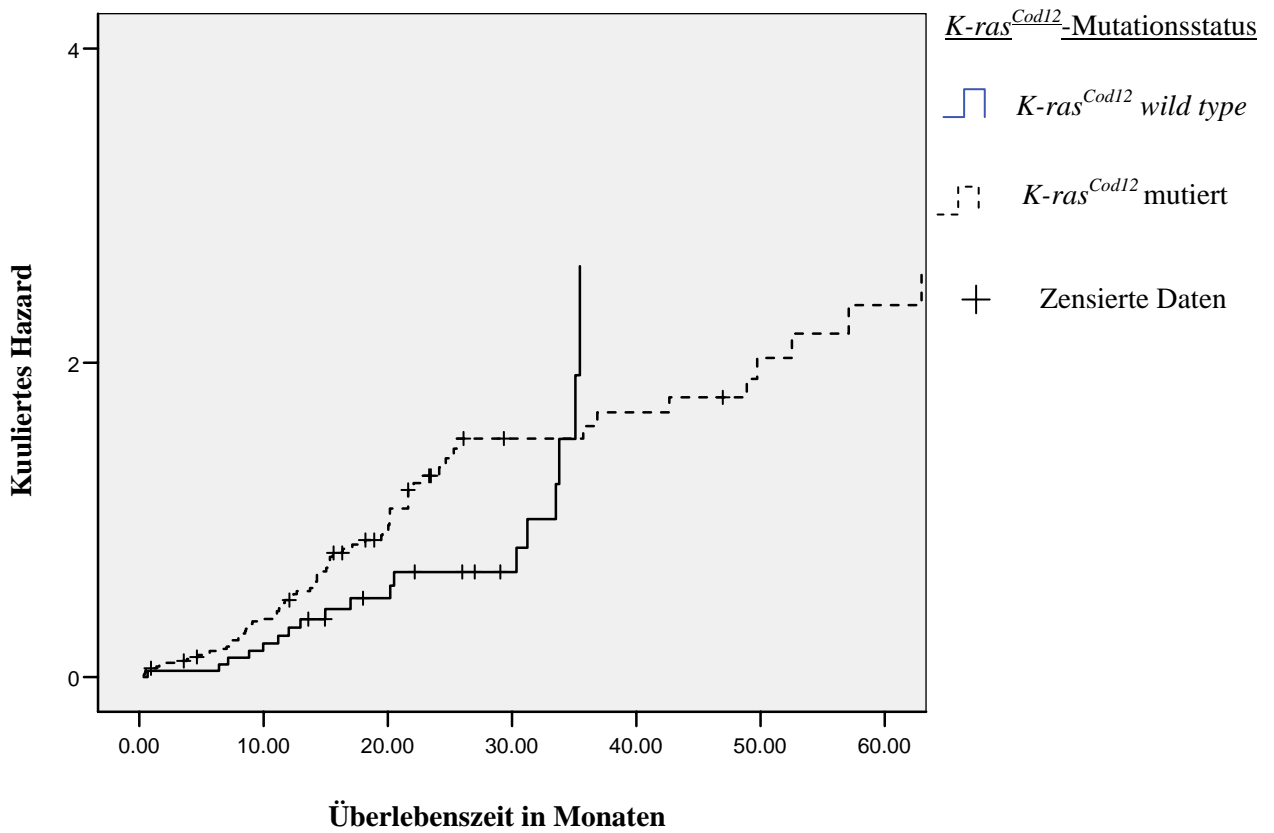


Abbildung 16: Risiko nach Hazardfunktion der $K\text{-ras}^{Cod12}$ Mutationsträger und des nicht-mutierten $K\text{-ras}$ wild type Genotyps nach 5 Jahren. Unterschiede in der Überlebenschance sind bei Fallzahlverringernung nur in den ersten 30 Monaten nach Operation zugunsten der nicht-mutierten $K\text{-ras}^{Cod12}$ -Variante auszumachen.

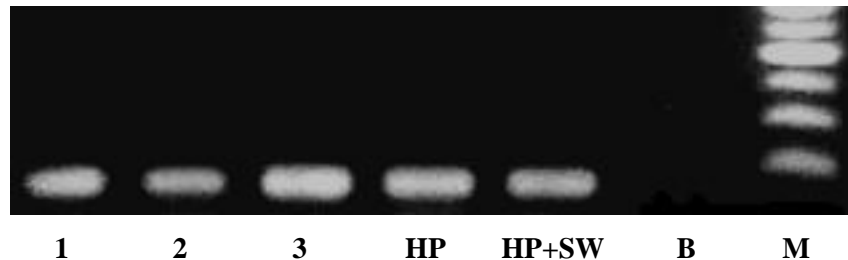


Abbildung 17: Beispiel einer PCR des *K-ras^{Cod12}*-Protoonkogens: Dargestellt sind PCR-Banden dreier Karzinomproben (1-3) sowie der Negativ- (HP) und Positivkontrolle (HP + SW). B = DNA-freie Blindprobe, M = DNA-Marker (100 base pairs).

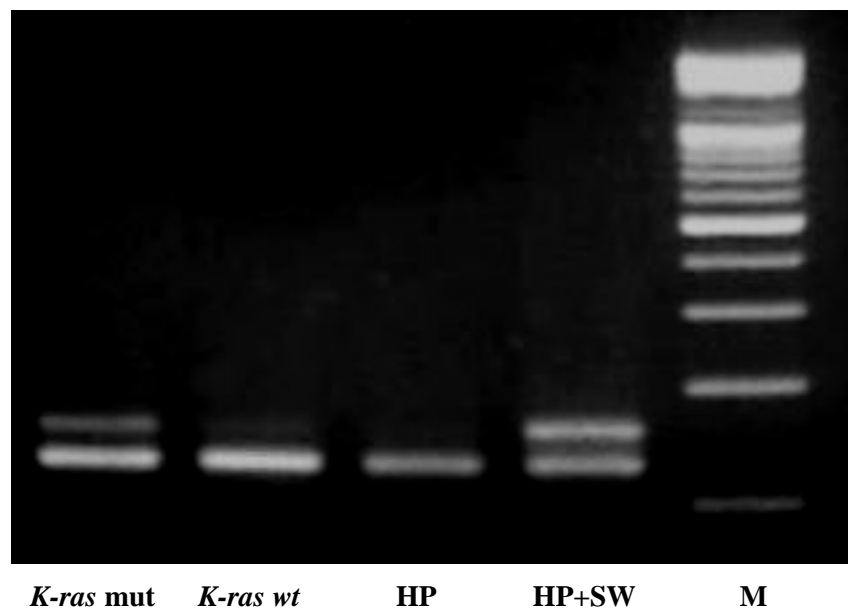


Abbildung 18: Beispiel einer RFLP-Analyse des *K-ras^{Cod12}*-Gens: Durch das mit Hilfe des Enzyms *BstNI* hervorgerufene Bandenmuster lässt sich der Mutationsstatus des *K-ras*-Gens bestimmen. *K-ras mut* weist ein mutiertes *K-ras*-Protoonkogen auf, während die *K-ras wt*-Variante an Codon 12 des *K-ras*-Gens nicht verändert ist. HP = Humane Plazenta-DNA ohne Mutation, HP+SW = Humane Plazenta-DNA, zugesetzt ist eine an Codon 12 mutierte Zelllinie. M = DNA-Marker.

4.5 Längenveränderungen des Mikrosatellitenmarkers *BAT25*

4.5.1 Follow up, demographische und klinisch-pathologische Beschreibung der *BAT25*-instabilen Patienten

Längenveränderungen des Mikrosatellitenlokus *BAT25* wurden mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Primer an der automatischen Sequenzmaschine PrismTM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) durch das zugehörige Datenverarbeitungsprogramm Genescan (Applied BioSystems, Foster City, Calif.) analysiert. Anhand einer laservermittelten Kapillarelektrophorese lassen sich Längenveränderungen des untersuchten Genlokus als Elektropherogramme darstellen (s. Kapitel 3). In Abbildung 19 werden die Elektropherogramme der betroffenen Patienten sowie eine Negativ- (unveränderter *BAT25*-Lokus) sowie eine Positivkontrolle (Zelllinie LoVo mit einem shift an *BAT25*) dargestellt.

Von den 119 Patienten zeigten acht (6,7 %) im Elektropherogramm einen shift des Genlokus *BAT25* bei unverändertem *BAT26*-Genort (s. Tabelle 14). Der Frauenanteil unterscheidet sich von dem des *BAT25*-unveränderten Patientenkollektivs nicht wesentlich (37,5 %). Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung liegt mit 61,1 Jahren etwas unter dem der an dem Genort *BAT25* unveränderten Gruppe (63,1 Jahre).

Tabelle 14: Demographische und klinisch-pathologische Charakterisierung der Patienten mit einem *shift* des Mikrosatellitenlokus *BAT25* und normalem *BAT26*-Genotyp

Fall ^{&}	Geschlecht	Alter [§]	<i>K-ras</i> Status [*]	T [#]	N ^{\$}	Stadium [°]	G ⁺	Überlebens-Status	Follow up-Periode [^]
1	M	46	mut	3	1	2b	2	Tot	36,8
2	M	68	wt	3	1	2b	3	Tot	8,8
3	F	67	mut	2	1	2b	2	Tot	78,7
4	M	54	mut	3	1	2b	2	Tot	0,3
5	M	58	mut	3	1	4	2	Tot	14,4
6	M	62	mut	2	1	2b	2	Tot	25,5
7	F	67	mut	3	1	2b	2	Tot	8,5
8	F	67	wt	3	0	2a	2	Tot	31,2

& M = Mann, F = Frau § in Jahren

^ Überlebenszeit nach Operation in Monaten

Tumorausdehnung nach AJCC-Klassifikation

\$ Lymphknotenstatus nach AJCC-Klassifikation

° Tumorstadium nach AJCC-Klassifikation

+ Differenzierungsgrad, G2 = mittelgradig differenziert, G3 = schlecht differenziert

* mut = mutierte Variante Codon 12 des *K-ras*-Gens, wt = nicht-mutierte Variante Codon 12 des *K-ras*-Gens

4.5.2 Immunhistochemische Analyse der *BAT25*-instabilen Fälle

Die acht Fälle, die eine Instabilität nur an dem Mikrosatellitenort *BAT25* aufwiesen, wurden mittels einer Immunhistochemie auf die Expression der *mismatch repair*-Proteine *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* und *PMS2* untersucht. Bei allen Fällen konnten diese Reparaturproteine nachgewiesen werden, so dass von einem Defekt des DNA-Reparatursystems nicht auszugehen ist.

4.6 Mikrosatelliteninstabilität des Pankreaskarzinoms: Längenveränderungen an *BAT25* und *BAT26*

4.6.1 Fallbeschreibung und histopathologische Charakterisierung

Von 119 duktalem Adenokarzinomen des Pankreas wies nur ein Fall (0,8 %) Längenveränderungen sowohl an dem Genort *BAT25* als auch an *BAT26* auf. Hierbei handelt es sich um eine 79-jährige Patientin, die im Juli 2001 am Istituto Clinico Humanitas, Mailand, aufgrund eines Pankreaskopfkarzinoms operiert wurde.

Im histologischen Befund wird ein duktales Adenokarzinom vom schlecht differenzierten Typ (G3) mit ausgedehnter Organnekrose und Infiltration in das peripankreatische Fettgewebe und die Arteria mesenterica beschrieben. Der Tumor infiltrierte das Duodenum bei gleichzeitigem peritumoralen, angioinvasiven Wachstum. Der Lymphknotenstatus war bei Befall von 6/19 peripankreatischen Lymphknoten positiv (N1). Die Patientin wies einen *K-ras^{Cod12}* mutierten Genotyp auf. Die pathologische Tumorverschlüsselung lautet damit: pT4, pN1, pM0, pG3, pV1, pL0 bei einem AJCC-Stadium III. Trotz kompletter R0-Resektion verstarb die Patientin wenige Tage nach dem chirurgischen Eingriff aufgrund von postoperativen Komplikationen. Die Elektropherogramme der Genorte *BAT25* und *BAT26* werden in Abbildung 20 zusammen mit einer mikrosatellitenstabilen (MSS-) Kontrolle dargestellt.

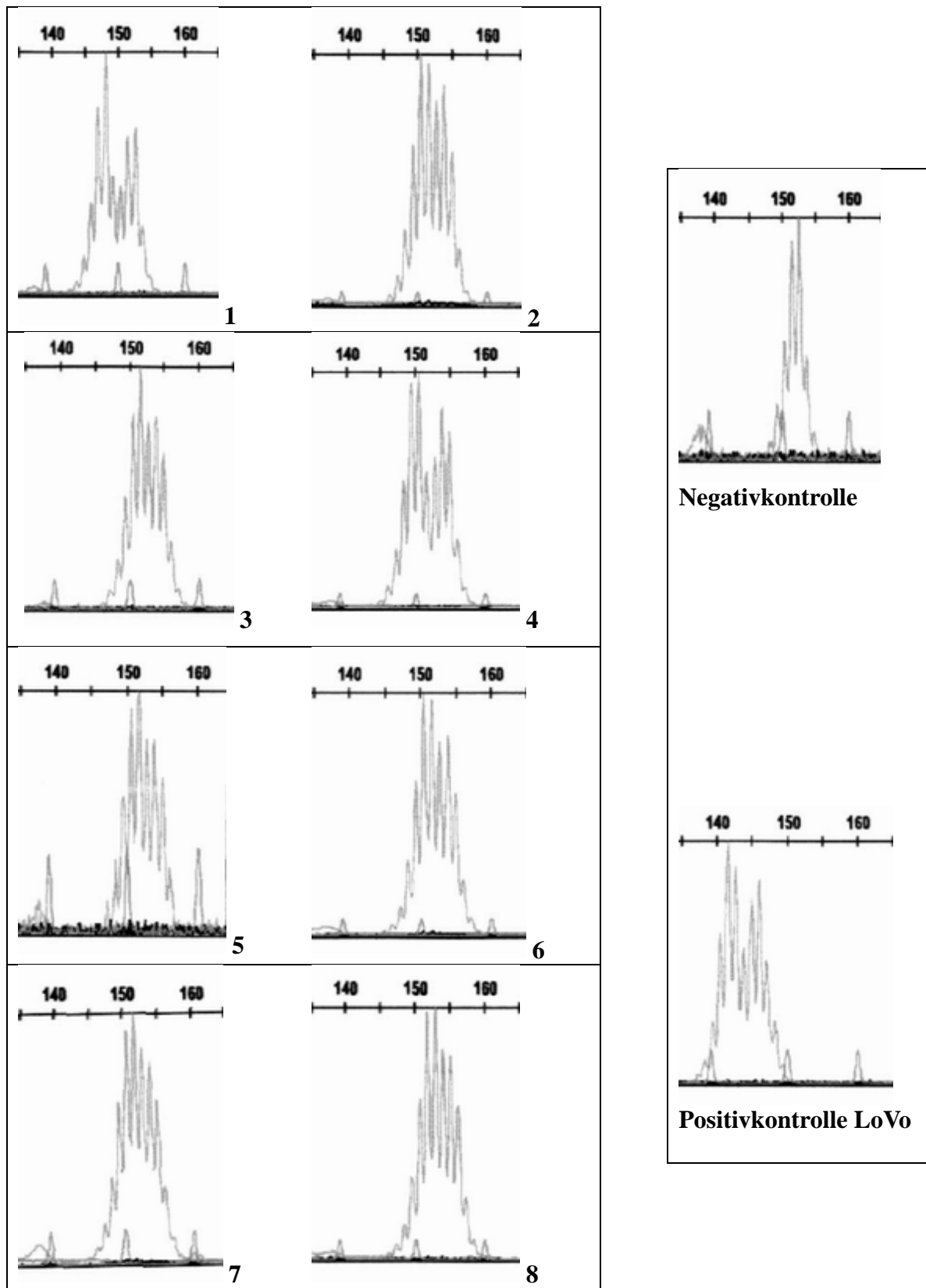
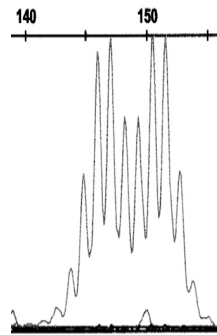
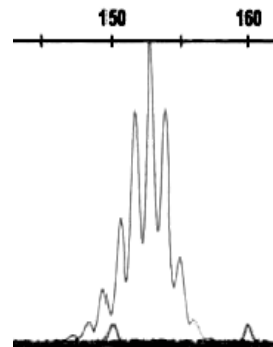


Abbildung 19: Elektropherogramme des *BAT25* Mikrosatellitenlokus. Links im Bild werden die Fälle dargestellt, die Längenveränderungen (*shifts*) an dem Mikrosatellitenort *BAT25* zeigen (1-8), sowie zum Vergleich eine Negativ- und eine Positivkontrolle. Die Zellelinie LoVo weist aufgrund einer biallelischen Deletion des DNA-Reparaturgens *hMSH2* einen shift an *BAT25* auf.

A: BAT25

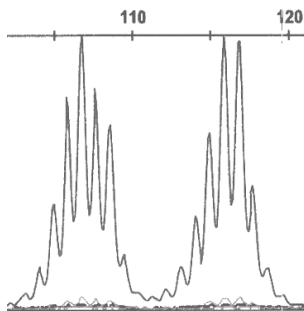


MSI-positiver Fall

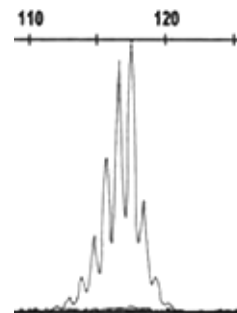


Mikrosatellitenstabile Kontrolle (MSS)

B: BAT26



MSI-positiver Fall



Mikrosatellitenstabile Kontrolle (MSS)

Abbildung 20: Elektropherogramme der Genorte *BAT25* und *BAT26*. In **A** werden das Elektropherogramm von *BAT25* des MSI-positiven Falles sowie eine mikrosatellitenstabile Kontrolle dargestellt. **B** zeigt das Elektropherogramm von *BAT26* desselben Falles und eine MSS-Negativkontrolle.

4.6.2 Immunhistochemische Analyse der *mismatch repair*-Proteine des *BAT25* und *BAT26* instabilen, MSI-positiven Falles

Mittels immunhistochemischer Analyse wurde der an *BAT25* und *BAT26* instabile Fall auf die Expression der *mismatch repair*-Proteine *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* und *PMS2* untersucht. Dabei wurde eine defekte Expression des *MMR*-Proteins *hMLH1* nachgewiesen. Abbildung 21 zeigt ein Foto einer Immunhistochemie mit normal exprimierten DNA-Reparaturproteinen und ein Beispiel, in dem ein Defekt eines der *MMR*-Proteine vorhanden ist.

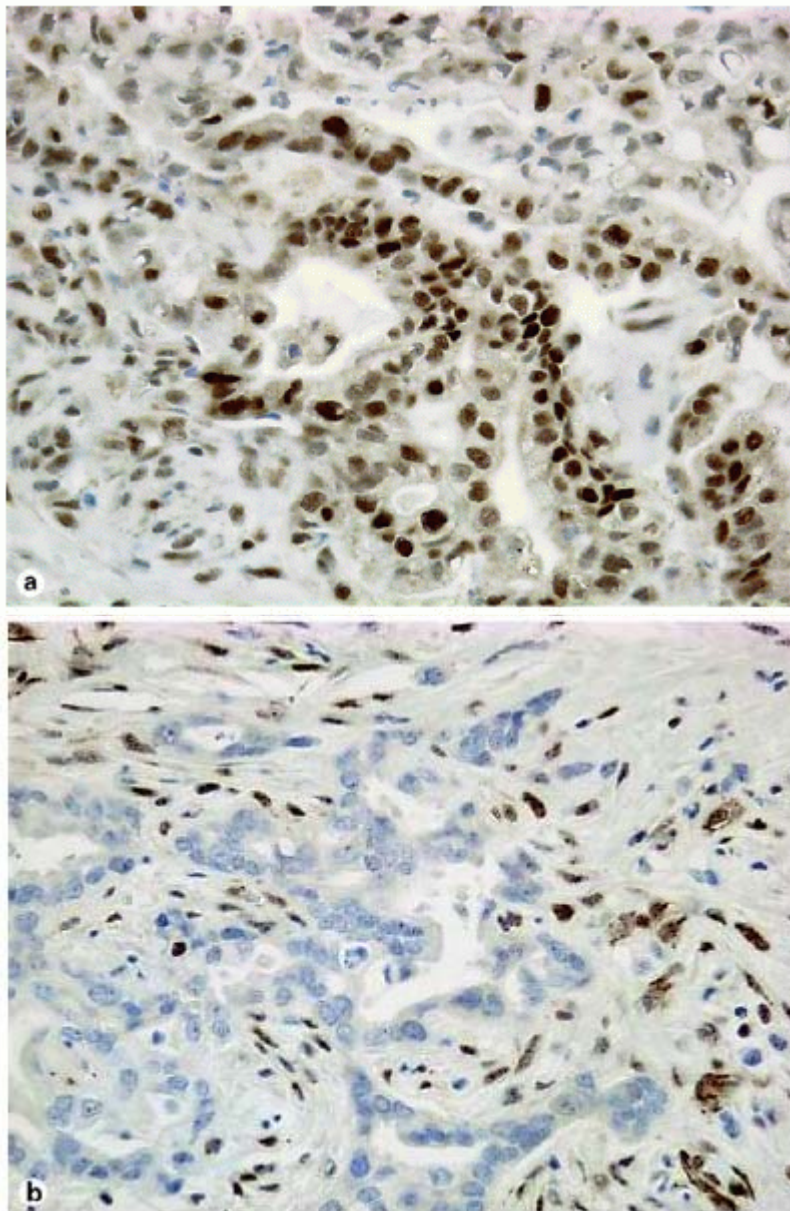


Abbildung 21: Immunhistochemie der DNA-Reparaturproteine. **a** Intakte Expression des *hMLH1* MMR-Proteins in Kern- und Stromazellen eines Adenokarzinoms des Pankreas. **b** Fehlende Expression des *hMLH1* MMR-Proteins. Die Stromazellen in **b** zeigen eine intakte *hMLH1*-Expression. Aus Maple et al., Defective DNA Mismatch Repair in Long-Term (>3 Years) Survivors with Pancreatic Cancer, *Pancreatology*, 2005, 5:220-228¹¹⁶.

5. Diskussion

5.1 Die prognostische Wertigkeit histopathologischer Parameter nach der TNM-Klassifikation

In den letzten Jahren konnte aufgrund verbesserter Operationstechniken die perioperative Mortalitätsrate von Pankreaskarzinomresektionen deutlich gesenkt werden. Der Anteil an Patienten, der als resektabel eingestuft wurde und damit von einer chirurgischen Therapie profitieren konnte, stieg jedoch trotz des Einsatzes hochsensitiver und spezifischer diagnostischer Mittel wie das CT, MRT und endoskopischer Sonographie nicht entscheidend an. Gründe hierfür liegen in der späten Präsentation von Krankheitssymptomen, die eine frühzeitige und für die Resektion rechtzeitige Diagnose in einem Großteil der Fälle ausschließt. Die Prognose des Pankreaskarzinoms bleibt daher unverändert eine der schlechtesten unter den Karzinomkrankungen und ein Langzeitüberleben von mehr als sieben Jahren ist auch nach chirurgischer Resektion die Ausnahme (Garcea et al.⁴³). In der vorliegenden Studie lag die 5-Jahresüberlebensrate mit 21,8 % relativ hoch, wobei die 5-Jahresüberlebensrate des Patientenkollektivs der Charité mit 24,2 % etwas über der des Kollektivs des Mailänder Istituto Clinico Humanitas liegt (19,3 %). Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Da die molekulargenetische Analyse an Gewebeproben von Operationspräparaten durchgeführt wurde, handelt es sich bei den analysierten Fällen ausnahmslos um als präoperativ resektabel eingestufte Adenokarzinome, an denen in einem Großteil der Fälle eine komplette R0-Resektion durchgeführt werden konnte. Weitere Gründe, die für die relativ hohe Überlebensraten sprechen könnten, sind eine hohe Spezialisierung und die hohen Standards der beiden Zentren. Garcea et al. fassen in einem Review aus dem Jahr 2008 Publikationen aus den letzten Jahren zusammen, in denen die Größe und ein hoher Spezialisierungsgrad der behandelnden Kliniken in einem Großteil der Studien als signifikanter favorisierender Faktor auf das Gesamtüberleben nach chirurgischer Therapie galten (Carcea et al.⁴³). 5-Jahresüberlebensraten nach Pankreatoduodenektomie in dieser Größenordnung finden sich auch in der Literatur und beschreiben 5-Jahresüberlebensraten von etwa 20 % (Yeo et al.⁷⁷; Ishikawa et al.⁷⁸), in einigen Fällen sogar von 30 % (Trede et al.⁷⁹, Nagakawa et al.⁸⁰; Miyazaki et al.⁸¹). In den letzteren Arbeiten wird jedoch zum Teil nur über ein selektiertes Patientenkollektiv mit T1/T2 und N0-Pankreaskarzinomen berichtet, bei denen eine R0-Resektion durchgeführt werden konnte.

In dieser Studie wurden zwei konsekutive, nicht-selektierte Patientenserien untersucht. Die meisten der Patienten befanden sich bereits in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, das aber in den meisten Fällen eine R0-Resektion erlaubte. Rund 74 % der Patienten wiesen regionale Lymphknotenmetastasen auf und nur 26 % waren in ein AJCC-Stadium von I_a oder niedriger einzuordnen. Bei etwa 80 % der Patienten wurde ein > 2 cm durchmessender Tumor diagnostiziert, der infiltrierend in das peripankreatische Gewebe einwuchs. Es ist anzunehmen, dass sich die 5-Jahresüberlebensrate bei einem höheren Anteil von niedrigen AJCC-Stadien (I und I_a), niedrigerer Tumorexpansion (T₁ und T₂) und einer geringeren Rate an Lymphknotenmetastasen eventuell noch günstiger darstellen würde.

Die vorliegende Studie zeigt, dass das Gesamtüberleben signifikant von den histopathologischen Parametern Tumorexpansion (T) und Stadium nach AJCC-Klassifikation ($p < 0.001$) abhängt. Han et al. berichtet 2006 von 123 Patienten, die ein günstigeres Gesamtüberleben nach Pankreasresektion in einem niedrigen AJCC-Stadium, einer geringen Tumorexpansion, einem negativen Lymphknotenstatus und hoher OP-Radikalität aufwiesen (Han et al.⁸²). Als allgemein anerkannte prognostische Indikatoren gelten in der Literatur die Charakteristika lokale Tumorexpansion, AJCC-Stadium und mit großem Konsens meist auch der Lymphknotenstatus. Das Tumorstadium und auch die lokale Tumorexpansion werden in den meisten Publikationen sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse als hochsignifikante Einflussfaktoren auf das Überleben beschrieben. Auch eine komplette Tumorfreiheit der Resektionsränder gilt in vielen, aber nicht allen Studien, als starker Einflussfaktor (Yeo et al.⁷⁷, Han et al.⁸², Jarufe et al.⁸³, Ridwelski et al.⁸⁴, Westgaard et al.⁸⁵, Ferrone et al.⁸⁶, Cleary et al.⁸⁷, Kolb et al.⁸⁸).

In den meisten Studien spielt ebenfalls der Lymphknotenstatus eine zentrale Rolle für das Überleben (Jarufe et al.⁸³, Winter et al.⁸⁹, Cleary et al.⁸⁷, Sohn et al.⁹⁰, Lim et al.⁹¹). Ein Trend von einem positiven Lymphknotenbefall mit sinkender postoperativer Überlebenszeit findet sich auch in dieser Studie, ein statistisch signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht gezeigt werden, was unter Umständen an einer zu geringen Patientenzahl und an einem zu geringen Anteil an Lymphknoten-negativen Patienten liegt. Eine Fallzahlerhöhung könnte hier zur Klärung beitragen.

Einen Zusammenhang zwischen Tumordifferenzierung und dem Gesamtüberleben werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Han et al., ebenso wie andere verschiedene Studien, konnte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem histologischen Differenzierungsgrad und

dem Überleben nachweisen (Ridwelski et al.⁸⁴, Ferrone et al.⁹⁰). Ein niedriger Differenzierungsgrad gilt in vielen Publikationen hingegen als signifikanter, ungünstiger prognostischer Marker (Jarufe et al.⁸³, Westgaard et al.⁸⁵, Cleary et al.⁸⁷, Sohn et al.⁹⁰, Lim et al.⁹¹, Winter et al.⁸⁹). Eine mögliche Rolle des histologischen Differenzierungsgrades als Einflussfaktor auf das Überleben war in dieser Studie mit einem p-Wert von > 0.05 nicht auszumachen.

Auch wenn sich in dieser, wie auch in anderen Studien, Ausnahmen darstellen und Patienten trotz eines niedrigen Tumorstadiums frühzeitig versterben oder Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium vereinzelt zu den Langzeitüberlebenden gehören können, ist das Gesamtüberleben insgesamt signifikant mit einem niedrigen Tumorstadium und einer geringen lokalen Tumorexpansion verbunden. Eine frühzeitige Diagnosestellung und eine damit verbundene rechtzeitige chirurgische Therapie spielen daher die zentrale Rolle für eine Verbesserung des Gesamtüberlebens von Pankreaskarzinompatienten.

5.2 *K-ras* Mutationen und Überleben

Die weitaus größte *K-ras* Mutationsrate aller Neoplasien findet sich im duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Meistens handelt es sich um aktivierende Punktmutationen des Codon 12 des *K-ras* Gens, die über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu ungehemmten Wachstums- und Differenzierungsprozessen der Zelle führen. Die in dieser Studie gefundene *K-ras* Mutationsrate von 78,2 % deckt sich mit der in der Literatur berichteten Mutationsfrequenz. Die italienische Patientenserie unterscheidet sich mit einer Mutationsrate von 77,4 % kaum von der des deutschen Patientenkollektivs (79,7 %). In der Literatur finden sich Mutationshäufigkeiten von 75-90 % (Hruban et al.¹⁶, Wilentz et al.¹⁷, Slebos et al.¹⁸, Dergham et al.⁶⁹, Lemoin et al.⁹²).

Über einen möglichen Zusammenhang zwischen einem alterierten *K-ras*-Gen und bestimmten klinisch-pathologischen Parametern wie TNM-Stadium, histologische Differenzierung und OP-Radikalität herrscht in der Literatur bisher kein Konsens. In der Vergangenheit haben mehrere Studien versucht, diesbezüglich eine Aussage treffen zu können. Ein Zusammenhang zwischen Patientenüberleben oder besonderen histopathologischen Parametern und dem Vorhandensein von *K-ras*-Mutationen konnte häufig nicht gezeigt werden (Hruban et al.¹⁶, Dergham et al.⁶⁹, Ghaneh et al.⁷⁰).

Castells et al. analysierte Plasma DNA-Proben von 44 Patienten mit einem Pankreaskarzinom und konnte zeigen, dass sowohl das Tumorstadium und die Existenz von Fernmetastasen als auch das Gesamtüberleben negativ von dem *K-ras^{Cod12}*-Status abhing ($p < 0.05$) (Castells et al.⁶⁷). Yamada et al. fand in einer ähnlichen Studie einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen *K-ras^{Cod12}*-Mutationen in Plasma-DNA-Proben und einer aggressiveren lokalen Tumorexpanansion (T). Andere histopathologische Parameter (N, M, Tumorstadium) konnten hingegen nicht mit einem positiven *K-ras^{Cod12}*-Status korreliert werden (Yamada et al.⁹³).

In der vorliegenden Studie zeigte sich in der klinisch-pathologischen Charakterisierung kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mutationsträgern und den nicht-mutierten *K-ras^{Cod12} wild type*-Merkmalsträgern. Dennoch lässt sich ein Trend einer höheren *K-ras*-Mutationsrate mit aggressiveren Tumorcharakteristika, wie ein niedriger Differenzierungsgrad, positiver Lymphknotenbefall und Fernmetastasen sowie einer nicht-kompletten Resektion ausmachen. Die allgemeine Mutationsrate macht 78,2 % aus und liegt damit unter der der G3-differenzierten Karzinome. 86,5 % (32/37) der schlecht differenzierten Tumoren (G3) weisen aktivierende *K-ras^{Cod12}* Mutationen auf, während nur 13,5 % des G3-Typs die nicht-mutierte *K-ras^{Cod12} wild type*-Variante aufweist. Unter den gut differenzierten Karzinomen machen *K-ras^{Cod12}*-Mutationsträger hingegen mit 40 % den geringeren Anteil aus. Der p-Wert ist hier grenzwertig mit $p = 0.053$ und könnte bei einer Erhöhung der Fallzahl an Signifikanz gewinnen.

Patienten mit lokoregionären Lymphknotenmetastasen waren häufiger Merkmalsträger eines mutierten *K-ras*-Protoonkogens (81,8 %) als einer nicht-mutierten *K-ras wild type*-Variante (67,7 %), während bei Patienten mit tumorfreien Lymphknoten (N0) *K-ras*-Mutationen seltener aufzufinden waren als ein *K-ras* negativer *wild type*-Phänotyp (18,2 % vs. 32,3 %).

Wie in den meisten anderen Studien konnte auch hier kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen *K-ras*-Mutationsstatus und histopathologischen Charakteristika nicht erbracht werden (Howe et al.⁹⁴). Auch Slebos et al. konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich Tumorgrading oder Mitoseindex feststellen, identifizierten aber einen Trend von höherer *K-ras*-Mutationsrate mit steigendem Tumorstadium (Slebos et al.¹⁸). Auch in der vorliegenden Studie kann dieser Trend ausgemacht werden. Alle Patienten, die Fernmetastasen oder einen Tumorbefall nicht-lokoregionärer Lymphknoten aufwiesen, waren Träger eines mutierten *K-ras^{Cod12}*-Protoonkogens. Da in die Analyse nur resektable Patienten eingeschlossen wurden, ist die Fallzahl an M1-Patienten, Patienten, bei denen intraoperativ der Befall nicht-lokoregionärer Lymphknoten oder eine Peritonealkarzinose festgestellt wurde, zu gering, um

Aussagen über einen möglichen Zusammenhang treffen zu können. Ebenso verhält es sich mit dem Parameter der OP-Radikalität. R2-Resektionen, also Resektionen, die weder mikroskopisch noch makroskopisch im Gesunden stattgefunden haben, wurden alle an *K-ras*^{Cod12}-mutierten Patienten durchgeführt.

Die prognostische Aussagekraft von aktivierenden *K-ras*^{Cod12}-Mutationen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In einer Studie von Kim et al. wurde der *K-ras*-Mutationsstatus in Resektionsrändern (alle R0) von 70 Patienten evaluiert und mit dem postoperativen Überleben assoziiert. Patienten, die *K-ras*-Mutationen in den Resektionsrändern aufwiesen, überlebten signifikant kürzer als diejenigen mit einem negativen *K-ras*-Status (15 vs. 55 Monate, $p = 0.0008$). (Kim et al.⁹⁵). Niedergethmann et al. konnten in einer Studie zeigen, dass Patienten mit einem positiven *K-ras*-Mutationsstatus nach Pankreatoduodenektomie ein signifikant schlechteres Überleben zeigten und eine Rezidivrate von 100 % aufwiesen (Niedergethmann et al.⁶⁸). In einer Studie, in der Biopsien von lokalen und fermetastasierten Karzinomen genommen und miteinander verglichen wurden, überlebten Patienten mit einem negativen *K-ras*^{Cod12}-Mutationsstatus signifikant länger und wiesen eine Mutationsrate von nur 56 % (14/25) auf, während Patienten mit Fernmetastasen zu 88 % Träger eines mutierten *K-ras*-Gens waren (Finkelstein et al.⁹⁶). Weitere Studien konnten einen positiven *K-ras*-Mutationsstatus in Plasma-DNA mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben oder einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit assoziieren (Castells et al.⁶⁷, Yamada et al.⁹³). Die Diskussion um die Funktion von *K-ras*-Mutationen als prognostischen Faktor ist jedoch bislang kontrovers und die meisten Studien können einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen einem ungünstigeren Gesamtüberleben und *K-ras*-Mutationen nicht nachweisen (Hruban et al.¹⁶, Dong et al.⁹⁷, Allison et al.⁹⁸, Dergham et al.⁶⁹, Ghaneh et al.⁷⁰).

In der vorliegenden Studie wiesen Patienten mit einem mutierten *K-ras*^{Cod12}-Protoonkogen nach einer Follow up-Periode von zwei Jahren einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil auf ($p = 0.049$). Nach 2 Jahren lebten noch 53,8 % (14/26) der Patienten mit einem nicht-mutierten *K-ras*-Gen, von den *K-ras*^{Cod12}-Mutationsträgern waren nach 2 Jahren hingegen nur noch 32,2 % am Leben. Je kleiner die Fallzahl über den Zeitraum des postoperativen Intervalls wird, desto mehr verlieren die Unterschiede in der Überlebenschance an Signifikanz. Nach fünf Jahren bestehen statistisch keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den beiden *K-ras*-Varianten. Eventuell wirken sich Überlebensvorteile besonders in dem postoperativen Zeitraum von rund 30 Monaten aus und ist für das Langzeitüberleben nicht signifikant, sondern eher Parameter wie

Tumorgröße, lokale Tumorexpansion und Tumorstadium. Da nach 60 Monaten aber nur noch 21,8 % der operierten Patienten am Leben waren, könnte auch das statistisch nicht-signifikante Ergebnis in der Analyse der 5-Jahresüberlebensrate durch eine zu geringe Fallzahl zu erklären sein.

Die Frage nach einer möglichen Assoziation von *K-ras*-Mutationen mit bestimmten klinisch-pathologischen Parametern bleibt weiterhin ungeklärt. In dieser Studie sowie in zahlreichen anderen Publikationen zeigt sich jedoch ein deutlicher Trend eines positiven *K-ras*-Mutationsstatus zu aggressiveren Tumorcharakteristika wie ein schlechter Differenzierungsgrad, eine erhöhte Rate von Lymphknoten- sowie Fernmetastasen und eine geringere Chance auf eine vollständig im Gesunden durchgeführte Resektion. Die Überlebenschance ist laut der vorliegenden Resultate für *K-ras*-negative Varianten besonders während der ersten zwei Jahre signifikant günstiger als für *K-ras*-positive Phänotypen. Für das Langzeitüberleben scheinen aber die Faktoren Tumorstadium und Tumorexpansion von zentraler Bedeutung zu sein.

Die Resektion ist die einzig mögliche Therapie mit kurativem Ansatz. Eine Verbesserung von diagnostischen Verfahren und die Etablierung von geeigneten Screeningverfahren sind daher von zentraler Bedeutung für eine Diagnosestellung in niedrigen, resektablen Tumorstadien und für eine Verbesserung des Langzeitüberlebens. Die verhältnismäßig niedrige Inzidenzrate des Pankreaskarzinoms limitiert die Möglichkeiten eines Screeningverfahrens für die Gesamtbevölkerung. Für eine Hochrisikogruppe, zum Beispiel Raucher oder Patienten mit chronischer Pankreatitis, könnten *K-ras*-Mutationen jedoch eine Chance für die Etablierung einer Früherkennungsmethode für eine maligne Entartung des Pankreas sein. Auch wenn die prognostische Wertigkeit dieser Mutationen nicht hinreichend geklärt ist, gilt nach heutiger Studienlage gesichert, dass *K-ras* Mutationen in 75-90 % der Pankreaskarzinome vorhanden sind, sie bereits frühzeitig in der Krankheitsprogression zu finden sind und dieser häufig sogar vorausgehen (Kahn et al.⁸⁵). Molekulargenetische Untersuchungen könnten demnach in Zukunft zu einer früheren Diagnosestellung verhelfen und eine kurative Therapie mit besseren Langzeitergebnissen ermöglichen.

Ansätze sind bereits in verschiedenen Studien erkennbar, die *K-ras*-Mutationen aus dem Blutplasma, Galle, Pankreassaft oder Stuhl analysieren (Talar-Wojnorowska et al.¹⁰⁰). Berthelemy et al. konnten zeigen, dass mutierte *K-ras*-Gene aus dem Pankreassekret mehr als einem Jahr vor klinischer Manifestation eines Pankreaskarzinoms gewonnen werden können (Berthelemy et al.¹⁰¹). Die diagnostische Durchführbarkeit von *K-ras*-Mutationen aus

Pankreassekret oder Stuhlproben wird jedoch limitiert durch eine geringe Sensitivität. Diese Methode konnte in der Vergangenheit Patienten mit einem Pankreaskarzinom in nur 38 % der Fälle identifizieren (Trümper et al.¹⁰²). Eine höhere diagnostische Sicherheit und eine Chance für eine frühzeitige Diagnose bietet eine Probengewinnung durch eine Feinnadelbiopsie während einer endoskopischen Endosonographie (Fry et al.¹⁰³). Auch wenn es sich bei einem *K-ras*-positiven Befund nur um Patienten mit chronischer Pankreatitis handeln sollte, so gehört dieses Patientenklientel doch zu einer Hochrisikogruppe (Arvanitakis et al.¹⁰⁴), die sich in regelmäßigen Abständen weiterer und wiederholter Diagnostik unterziehen sollte. Aufgrund der hohen Prävalenzrate von *K-ras*-Mutationen, die sich unter anderem in der vorliegenden Studie gezeigt hat, könnte sich ein Screening in Form molekulargenetischer Untersuchungen in Hochrisikogruppen als sinnvoll erweisen und könnte in Zukunft eine frühere Diagnosestellung ermöglichen oder zumindest zur Einschätzung eines überdurchschnittlichen Erkrankungsrisikos verhelfen.

5.3 Mikrosatelliteninstabilität und DNA-Reparaturdefekte im Adenokarzinom der Pankreas

Der molekulare Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität ist gekennzeichnet durch *frame shift* Mutationen an kurzen repetitiven Sequenzen an zumeist intergenischen DNA-Abschnitten und gilt als spezifischer molekularer Marker eines defekten DNA-Reparatursystems. Diese Längenveränderungen an Mikrosatellitenloki wurden erstmals 1993 im Kolonkarzinom beschrieben und wenig später ursächlich mit einer defekten Proteinexpression der MMR-Gene *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* und *PMS2* in Verbindung gebracht (Thibodeau, Bren, Schaid⁷, Ionov et al.⁸, Aaltonen et al.⁹). Eine zentrale Rolle spielt dieser molekulare Phänotyp in dem hereditären Karzinomsyndrom hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) mit einer Rate an MSI-positiven Tumoren von rund 90 %. Auch unter den sporadischen Kolonkarzinomen ist der Anteil von MSI-positiven Phänotypen mit etwa 15 % relativ hoch (Söreide et al.¹⁰⁵). MSI-positive Karzinome, sowohl hereditärer als auch sporadischer Natur, zeigen besondere histopathologische Charakteristika wie eine geringe histologische Differenzierung, invasives Tumorstadium, eine ausgeprägte Tumorexpansion (häufig T3-Tumoren) und eine muzinöse Zelldifferenzierung. Paradoxerweise sind diese als aggressiv eingestuftes Malignitätscharakteristika in MSI-positiven Kolonkarzinomen mit einer geringeren

Wahrscheinlichkeit für Fernmetastasen und einem wesentlich günstigeren Gesamtüberleben assoziiert (Söreide et al.¹⁰⁵, Malesci et al.¹⁰⁶, Popat et al.¹⁰⁷, Anwar et al.¹⁰⁸).

Zahlreiche darauffolgende Studien konnten den molekularen MSI-Phänotyp auch in anderen Karzinomtypen nachweisen. Die Prävalenz unter den einzelnen malignen Neoplasien konnte jedoch bisher nicht befriedigend und in breiter Übereinstimmung beschrieben werden (Söreide et al.¹⁰⁵). Während Patienten mit einem MSI-positiven Magenkarzinom überwiegend in Zusammenhang mit einem besseren Gesamtüberleben gesehen werden, werden Ovarialkarzinome mit dieser molekularen Eigenschaft eher mit einer ungünstigeren Prognose und aggressiveren histopathologischen Parametern assoziiert (Gazvoda et al.¹⁰⁹, Beghelli et al.¹¹⁰, An et al.¹¹¹, Dellas et al.¹¹²). In einer der ersten Studien, in der die Prävalenz des MSI-Phänotyps in anderen Karzinomarten untersucht wurde, wurden Längenveränderungen an Mikrosatellitenorten, die aus Dinukleotidwiederholungen bestehen, analysiert. Diese als genetische Instabilität beschriebenes Phänomen fand sich vor allem in Magenkarzinomen (22/57 Fällen), aber auch in einigen Pankreaskarzinomen (3/9). Vor allem Magenkarzinome vom schlecht differenzierten Typ konnte mit diesem molekularen Phänotyp in Verbindung gebracht werden. Andere Karzinomtypen wie das Mammakarzinom (26 Fälle), das hepatozelluläre Karzinom (29 Fälle), das Zervixkarzinom (13 Fälle) und Ovarialkarzinome (19 Fälle) zeigten keine Längenveränderungen der untersuchten Dinukleotid-Mikrosatellitenorte (Han et al.¹¹³).

Bislang gibt es nur wenige Studien, die sich mit dem molekularen Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität in der pankreatischen Onkogenese befassen. Die angegebene Prävalenz weicht in der Literatur stark voneinander ab und umfasst Spannen von 0 % (0/27) bis 50 % (4/8) (Seymour et al.⁷¹, Brentnall et al.⁷²). Die Gründe für diese deutlichen Differenzen in der Prävalenz liegen vor allem in einer uneinheitlichen Verwendung von Mikrosatellitenmarkern. Bislang gibt es keine Empfehlungen für die Verwendung von speziellen Mikrosatellitenmarkern für die MSI-Diagnostik des Pankreaskarzinoms und es finden sich in der Literatur kaum Studien, die das gleiche Studienprotokoll unter Einsatz identischer MSI-Marker verwenden. Durch die abweichende Verwendung verschiedener Marker in den vorliegenden Studien ist in der Vergangenheit Verwirrung bezüglich Prävalenz und Signifikanz geschaffen worden. So berichtete Goggins et al. eine Prävalenz von 3,7 % (3/82), während eine Studie von Nakata et al. 17,4 % (8/46) MSI-positive Karzinome angab (Goggins et al.⁵⁰, Nakata et al.⁵¹). Ghimenti et al. konnte ebenso wie Seymour (0/27) keinen Fall mit MSI identifizieren (Ghimenti et al.⁷³). 2001 fand Yamamoto et al. eine Prävalenz von 13 % (13/100) in sporadischen

Pankreaskarzinomen und 100 % (3/3) in HNPCC-Pankreaskarzinomen (Yamamoto et al.⁴⁹). Ouyang et al. zeigte ähnlich Daten mit einer angegebenen Prävalenz von 15 % (9/60) (Ouyang et al.⁷⁴). Eine Übersicht über die einzelnen Studien gibt Tabelle 15.

Tabelle 15: Übersicht über die Studien zur Prävalenz des molekularen MSI-Phänotyps im Adenokarzinom des Pankreas und ihre Charakteristika

Studie	Jahr	Nat. [°]	Verwendete Marker	Charakteristika Patientenserie	Prävalenz % (n)	Analyse MMR-Defekt
Seymour et al. ⁷¹	1994	USA	Dinukleotidm.*	Nicht-selektiert	0% (0/27)	-
Brentnall et al. ⁷²	1995	USA	Dinukleotidm.	Nicht-selektiert	50% (4/8)	-
Goggins et al. ⁵⁰	1998	USA	<i>BAT26</i> + Dinukleotidm	Nicht-selektiert	2,4% (2/82) [#]	-
Ouyang et al. ⁷⁴	1998	Japan	<i>BAT25/BAT26</i> + Dinukleotidm.	Nicht-selektiert	15% (9/60)	-
Ghimenti et al. ⁷³	1999	Italien	Dinukleotidm.	Nicht-selektiert	0% (0/27)	ICH ⁺
Wilentz et al. ⁷⁵	2000	USA	<i>BAT25</i> + <i>BAT26</i>	Nicht-selektiert Medullärer Typ	0% (0/77) 7% (1/13)	ICH ⁺
Yamamoto et al. ⁴⁹	2001	Japan	<i>BAT25/BAT26</i> + Dinukleotidm.	Nicht-selektiert HNPCC	13% (13/100) 100% (3/3)	MMR-Gene [^]
Nakata et al. ⁵¹	2002	Japan	Dinukleotidm.	Nicht-selektiert	17,4% (8/46)	-
Maple et al. ¹¹⁷	2005	USA	<i>BAT25/BAT26</i> + Dinukleotidm.	Nicht-selektiert HNPCC	0% (0/32) 100% (3/3)	ICH ⁺

[°] Nationalität; Sitz der Studieneinrichtung

* Dinukleotidmarker

[#] Angegebene Prävalenz 3,7 % (3/82), ein Patient davon entwickelte zwei metachrone Kolonkarzinome, wahrscheinlich im Rahmen eines hereditären Karzinomsyndroms

+ Immunhistochemische Analyse

[^] Mutationsanalyse der *mismatch repair*-Gene

Der bis vor kurzem noch häufig verwendete Terminus „MSI-low (MSI-L)“-Phänotyp beschreibt Längenveränderungen an wenigen Mikrosatellitenloki, die meistens aus polymorphen, das heißt interindividuell unterschiedlich langen, Dinukleotidwiederholungen bestehen. Da dieser Phänotyp weder eine Korrelation mit einem defekten *MMR*-System noch besondere klinische, pathologische oder molekularbiologische Ausprägungen zeigt, wird sein Vorhandensein in letzter Zeit verstärkt angezweifelt (Umar et al.³³, Yamamoto et al.⁴⁹). Gerade die Studien, die eine auffallend hohe Rate an MSI-positiven Phänotypen im Pankreaskarzinom berichten, sind meistens unter Verwendung von Dinukleotidmarkern durchgeführt worden, obwohl die Unterlegenheit dieser Marker in zahlreichen Studien im Vergleich zu den spezifischeren Mononukleotidmarkern *BAT25* und *BAT26* beschrieben wurde (Oda et al.¹¹³, Zhou et al.³⁵⁺³⁷).

Der molekulare Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität gilt als Indikator für ein defektes DNA-Reparatursystem, welches den eigentlichen ursächlichen Faktor in der Karzinogenese darstellt. Die meisten Studien stützen sich jedoch nur auf die Analyse von Längenveränderungen an den Mikrosatellitenorten ohne diesen zentralen Faktor in der Onkogenese, nämlich die defekte Expression der *MMR*-Proteine aufgrund von Mutationen der zugehörigen *MMR*-Gene, zu analysieren (s. Tabelle 14). Der direkte Nachweis von *MMR*-Proteindefekten in der Immunhistochemie gilt jedoch gerade angesichts der vorherrschenden Diskussion um Art und Anzahl der zu testenden Mikrosatellitenloki und der damit verbundenen Unsicherheit in der Definition eines MSI-positiven Phänotyps als sichere Nachweismethode und kann Fehlinterpretationen und falsch positive Resultate verhindern. Gerade bei den Studien, die auf der Verwendung von Dinukleotidmarkern zur MSI-Testung beruhen, ist daher anzunehmen, dass die wirkliche Rate an MSI-positiven Fällen deutlich unter den angegebenen Prävalenzen liegt.

In dieser Studie wurden die Mononukleotidmarker *BAT25* und *BAT26* für die Analyse des molekularen MSI-Phänotyps verwendet. Die MSI-Marker *BAT25* und *BAT26* sind nach heutigem Wissenstand quasimonomorphe und interindividuell stabile Mikrosatellitenloki. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Längenveränderungen an diesen Genorten das Vorliegen des genomweiten MSI-Phänotyps („MSI-high, MSI-H“) zu 99,5 % nachweisen konnten (Zhou et al.³⁵, Hoang et al.³⁶, Zhou et al.³⁷). Dieser MSI-Phänotyp ist in der Literatur unbestritten in der Karzinogenese des Kolonkarzinoms ursächlich mit einem defekten *MMR*-System verbunden und weist spezifische histopathologische, klinische und molekularbiologische Parameter auf. Um eventuelle falsch-positive Resultate bei Verwendung von Dinukleotidmarkern zu vermeiden, kamen in vorliegender Studie nur die Mononukleotidmarker

BAT25 und *BAT26* mit anschließender immunhistochemischer Analyse der *MMR*-Proteinexpression zum Einsatz.

Von 119 Adenokarzinomen des Pankreas wies nur ein Fall (0,8 %) *frame shift* Mutationen an beiden Markern auf. In der Immunhistochemie wurde eine defekte Expression des DNA-Reparatur Proteins *hMLH1* nachgewiesen. Dieser Fall wies also Längenveränderungen an *BAT25* und *BAT26* sowie eine defekte *MMR*-Genexpression in der Immunhistochemie auf und erfüllte damit die Kriterien eines MSI-positiven Phänotyps. Unbekannt ist, ob die Patientin eventuell an einem hereditären Pankreaskarzinom und/ oder eventuell an HNPCC gelitten hat. Auffällig ist jedoch, dass in diesem Fall alle bisher beschriebenen histopathologischen Charakteristika von MSI-positiven Karzinomen erfüllt wurden. Die Patientin wies ein Karzinom im AJCC-Tumorstadium III auf mit MSI-typischer aggressiver Tumornatur bei schlechtem Differenzierungsgrad (G3-Karzinom), infiltrierender Tumorexpansion (T4), ausgeprägter Organnekrose und organüberschreitendem invasiven Wachstum. Analog zu vergleichbaren Studien über das MSI-positive Kolonkarzinom und dem beschriebenen Fall und konnte auch Yamamoto et al. eine Assoziation zwischen geringem Differenzierungsgrad und dem MSI-positiven Status des Pankreaskarzinom ausmachen (Yamamoto et al.⁴⁹). Laut dieser Studie wiesen MSI-positive Patienten einen signifikanten Überlebensvorteil auf ($p < 0.05$). Ähnliche Resultate berichtete auch Goggins et al, der ein verbessertes Gesamtüberleben und bestimmte histopathologische Parameter wie invasives Wachstum, schlechte histologische Differenzierung und synzytielles Wachstum mit MSI-positiven Pankreaskarzinomen in Verbindung bringen konnte (Goggins et al.⁵⁰). Nakata et al. wiesen unter Verwendung von Dinukleotidmarkern und immunhistochemischer Analyse eine mikrosatelliteninstabile Rate an Dinukleotidwiederholungen von 17,4 % auf (8/46). In der multivariaten Analyse zeigte sich diese molekulare Besonderheit als unabhängiger prädiktiver Wert für das Gesamtüberleben (Hazard ratio = 5,5, $p = 0.007$) (Nakata et al.⁵¹). Wilentz et al. untersuchte in einer Studie 13 Pankreaskarzinome vom medullären histologischen Typ, das heißt, Karzinome mit einem schlechten Differenzierungsgrad, invasiven Wachstumsverhalten, ausgedehnter Nekrose und hoher Tumorexpansion. Er fand eine MSI-Prävalenz in dieser Gruppe von 7 % (1/13). In der Vergleichsgruppe von 77 Patienten ohne medullären Differenzierungstyp konnte kein MSI-positiver Fall gefunden werden (0/77). Zu beachten ist, dass die bisher genannten Studien häufig nur sehr kleine Fallzahlen umfassen. Brentnall et al. beschreiben lediglich acht Patienten in ihrer Studie, Wilentz et al. 13 Fälle. Neben der Tatsache, dass die meisten Studienergebnisse auf der Verwendung von Dinukleotidmarkern beruhen, die zu falsch positiven Ergebnissen und einer

höhere MSI-Mutationsrate führen können, muss ebenfalls bedacht werden, dass in einigen Fällen eine selektiertes Patientenkollektiv, beispielsweise Patienten mit einem medullären Phänotyp oder mit HNPCC, untersucht worden sind und so eine verhältnismäßig hohe Rate an MSI-positiven Pankreaskarzinomen präsentiert werden konnte.

Die auffallend deutlichen Unterschiede der Prävalenz, die sich in der Literatur finden, sind wahrscheinlich Folge einer unterschiedlichen Testung an Anzahl und Lokalisation der Mikrosatelliten-Genorte und ursächlich mit der Verwendung unterschiedlicher Testmethoden verbunden. Auch die Studiendurchführung ohne Analyse der *MMR*-Proteine und damit ohne den Nachweis des eigentlichen karzinogenen Mechanismus spielt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine zentrale Rolle für die angegebenen hohen Prävalenzraten in einigen Studien. Auffällig ist auch, dass Studien, die über eine hohe Prävalenz an MSI-positiven Pankreaskarzinomen berichten, vorrangig in Japan durchgeführt wurden. So wiesen Ouyang et al. eine Rate von 15 % (9/60), Yamamoto et al. eine Rate von 13 % (13/100) und Nakata et al. eine Prävalenz von 17,4 % auf. Eventuell könnte der molekulare Phänotyp in asiatischen Ländern eine übergeordnete Rolle in der Onkogenese spielen und eine höhere Mutationsrate als in westlichen Ländern aufweisen, ähnlich einer Studie von Dong et al., die eine unterschiedliche Mutationsrate und molekulare Eigenschaften von *K-ras* Mutationen zwischen asiatischen und westlichen Ländern fanden (Dong et al.¹¹⁵). Studien, die an kaukasischen Patienten durchgeführt wurden, unterliegen zahlenmäßig weit den asiatischen Publikationen und zeigen ein deutlich unterschiedliches Ergebnis. Eine MSI-Rate nicht-selektierter Patienten und unter Verwendung von Mononukleotidmarkern findet sich hier in höchstens 3,7 % (Goggins et al.) der Fälle (3/82). Von diesen drei Fällen entstanden im postoperativen Verlauf bei einem Patient zwei metachrone Kolonkarzinome, so dass dieser Patient wahrscheinlich an einem hereditärem Karzinomsyndrom, möglicherweise HNPCC, gelitten hat. Die tatsächliche Prävalenz liegt somit eher bei 2/82 (2,4 %). Die verbleibenden wenigen Studien, die unter den gleichen Bedingungen wie die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, nämlich an nicht-selektierten Patientenserien unter Verwendung der Mononukleotidmarker *BAT25* und *BAT26* und Durchführung einer immunhistochemischen Analyse der DNA-Reparaturproteine, weisen eine Prävalenzrate des MSI-Phänotyps von 0 % auf (Maple et al. 0/32 Fälle, Seymour et al. 0/27 Fällen, Ghimenti et al. 0/27 Fälle, Wilentz et al. 0/77 Fällen).

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie und anderer westlicher Publikationen stellt der molekulare Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität im Pankreaskarzinom in kaukasischen

Bevölkerungen eine Seltenheit dar und spielt insgesamt in der pankreatischen Onkogenese nur in Ausnahmefällen eine Rolle. HNPCC-assoziierte Pankreaskarzinome und Karzinome vom medullären histologischen Typ stellen hingegen möglicherweise eine eigene Entität mit einer hohen MSI-Prävalenzrate und einem defekten DNA-Reparatursystem dar.

5.4 Shifts des Mikrosatellitenmarkers *BAT25*

Im Gegensatz zum Kolonkarzinom gibt es bislang keine gesicherten Erkenntnisse und damit keine Empfehlungen zur Auswahl der Mikrosatellitenmarker zur Testung des molekularen Phänotyps der Mikrosatelliteninstabilität im Pankreaskarzinom. Die Folge sind eine uneinheitliche Verwendung von Mikrosatellitenmarkern und die damit verbundene Heterogenität der beschriebenen Prävalenz. In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass für die MSI-Testung Marker, die Längenveränderungen an bestimmten Mononukleotidwiederholungen im Genom nachweisen, den Dinukleotidmarkern überlegen sind. Besonders die quasimonomorphen Marker *BAT25* und *BAT26* erwiesen sich in der Vergangenheit als sensitive und spezifische Marker und konnten bei Längenveränderungen an diesen Genorten das Vorliegen des molekularen MSI-Phänotypen und damit Defekte der DNA-Reparaturmechanismen zu 99,5 % nachweisen (Umar et al.³³, Zhou et al.³⁵, Hoang et al.³⁶, Zhou et al.³⁷, Pyatt et al.¹¹⁸). Daher wurden diese Marker auch zur Durchführung der vorliegenden Studie verwendet und bei Längenveränderungen eine immunhistochemische Analyse der entsprechenden *MMR*-Proteine durchgeführt.

Überraschenderweise zeigten acht der 119 Patienten in der molekularbiologischen Analyse einen *shift* an *BAT25*, ohne dass Längenveränderungen an *BAT26* festgestellt werden konnte. Weder in Publikationen über MSI-Analysen im Kolonkarzinom noch in Arbeiten zur MSI-Testung in anderen Karzinomarten wurde bisher ein solches Ergebnis beschrieben. Da in der immunhistochemischen Analyse eine Expression der bisher beschriebenen bedeutsamen *MMR*-Proteine nachgewiesen werden konnte, ist nicht von einem Defekt der zugehörigen DNA-Reparaturgene auszugehen. Diese Fälle können daher nicht als MSI-positiv klassifiziert werden. In der demographischen und klinisch-pathologischen Klassifizierung lassen sich Unterschiede zu den *BAT25* stabilen Fällen bei ähnlichem Geschlechterverhältnis, Durchschnittsalter und Gesamtüberleben nicht feststellen. Es zeigt sich aber eine höhere Rate an Lymphknotenmetastasen (87,5 % vs. 73,9 %) und ein Trend zu einer aggressiveren lokalen

Tumorexpan­­sion (6/8 T3, 75 %). Die *K-ras* Mutationsrate liegt mit 75 % etwa bei der des Gesamtkollektiv (78,2 %). Alle *BAT25*-instabilen Patienten sind im Verlauf des postoperativen Intervalls verstorben. Bei einer allgemein schlechten Überlebensrate, einer geringen Fallzahl (acht) und nicht-normalverteilten Überlebenszeiten können jedoch keine Rückschlüsse auf einen eventuellen Überlebensnachteil getroffen werden.

Eine Kontamination mit genetischem Material anderen Ursprungs, die fälschlicherweise zu *shifts* an diesem Genlokus geführt haben könnte, kann ausgeschlossen werden, da jede Analyse mindestens dreimal wiederholt wurde. Auch ein Defekt auf Ebene eines nicht untersuchten *MMR*-Gens ist unwahrscheinlich. Entweder wurde der Mikrosatellitenmarker *BAT25* in den letzten Jahren in der Literatur in seiner Eigenschaft als monomorpher, das heißt interindividuell stabiler Mikrosatellitenmarker überschätzt oder die erwähnten acht Fälle sind alle Polymorphismen des *BAT25* Genlokus. In ersterem Fall müsste davon ausgegangen werden, dass *BAT25*-Polymorphismen sehr viel häufiger auftreten, als bisher beschrieben und zukünftige Studien müssten unter Aussparung dieses Markers durchgeführt werden, um falsch-positive Resultate und damit ein fälschlicherweise hohe MSI-positive Rate zu vermeiden. Da dieser Fall jedoch bisher in der Literatur trotz zahlreicher Studien nicht beschrieben wurde, ist eher wahrscheinlich, dass diese acht Patienten Träger eines polymorphen *BAT25* Genlokus sind. Obwohl genaue Zahlen nicht bekannt sind, gelten sowohl *BAT25* als auch *BAT26*-Polymorphismen als sehr selten. Da Publikationen, die unter gleichen Studienbedingungen (MSI-Testung durch *BAT25* und *BAT26*) bislang zahlenmäßig sehr begrenzt sind, gibt es momentan keine vergleichbaren Ergebnisse aus der Forschung über das Pankreaskarzinom. Sicher ist nur, dass dieses Phänomen in den zahlreichen MSI-Studien über das Kolonkarzinom nicht erwähnt wurde und deshalb davon auszugehen ist, dass sich dort eine andere Situation darstellt. Eventuell könnte das bedeuten, dass das Pankreaskarzinom mit einer überdurchschnittlich hohen Rate von Polymorphismen an diesem Genort verbunden ist, die unter Umständen eine Malignitätsentstehung und Krankheitsprogression des Pankreaskarzinoms begünstigen. Weitere Untersuchungen mit einer höheren Fallzahl sind nötig, um die Rolle dieses molekularen Phänotyps in der Onkogenese abzuklären. Auch im Hinblick auf eventuelle diagnostische und prognostische Besonderheiten sind weiterführende Forschungsansätze von großem Interesse und sollten an großen Patientenkollektiven fortgeführt werden.

6. Zusammenfassung

Einleitung: Jährlich erkranken in Deutschland etwa 12.600 Menschen an einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Die einzige Behandlungsmöglichkeit mit kurativem Ansatz stellt bisher die chirurgische Therapie dar. Trotz des Einsatzes hochsensitiver und spezifischer diagnostischer Mittel wie das CT, MRT und endoskopischer Sonographie, kann jedoch nur ein geringer Anteil von lediglich 10-20 % der Fälle als resektabel eingestuft werden und damit von einer chirurgischen Therapie profitieren. Gründe hierfür liegen in der späten Präsentation von Krankheitssymptomen, die eine frühzeitige und für die Resektion rechtzeitige Diagnose in einem Großteil der Fälle ausschließt. Neueste Daten aus dem Jahr 2008 zeigen zwar eine deutlich gesunkene perioperative Mortalitätsrate nach Pankreatoduodenektomie seit den 70-er Jahren und eine leicht ansteigende, postoperative 5-Jahresüberlebensrate seit dem Jahr 1990 bis heute, die Prognose des Pankreaskarzinoms bleibt jedoch trotz verbessertem Verständnis der Krankheitsentstehung und –progression unverändert eine der schlechtesten unter den Karzinomerkrankungen und ein Langzeitüberleben ist auch nach chirurgischer Resektion die Ausnahme.

Das Tumorstadium nach AJCC-Kriterien und die lokale Tumorexpansion (T) gelten nach heutigem Wissensstand als gesicherte Faktoren auf das Überleben, während die Rolle anderer histopathologischer Parameter wie Lymphknotenstatus (N), histologischer Differenzierungsgrad (G) und Operationsradikalität (R) als prognostische Indikatoren in bisherigen Studien nicht immer bewiesen werden konnte. Mit einer Prävalenz von 75-100 % stellen Mutationen des *K-ras^{Cod12}*-Gens die häufigste Protoonkogen-Mutation des duktalem Adenokarzinoms des Pankreas dar. Während über die Häufigkeit dieser Mutation gesicherte Aussagen existieren, finden sich in der Literatur bislang keine fundierten Ergebnisse über die prognostische Wertigkeit dieses molekularen Phänotyps und über eine eventuelle Korrelation mit bestimmten histopathologischen Parametern wie lokale Tumorexpansion, Tumorstadium, Lymphknotenstatus, histologische Differenzierung und Radikalität des chirurgischen Eingriffs. Der molekulare Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität (MSI), gekennzeichnet durch Längenveränderungen an kurzen, repetitiven Genabschnitten, stellt bisher eine prognostische und in Bezug auf seine Prävalenz ungeklärte Entität im Pankreaskarzinom dar. Kennzeichnend als molekularer Marker der hereditary non-polyposis colorectal cancer- (HNPCC-) Kolonkarzinome, steht dieser molekulare Phänotyp für ein defektes DNA-Reparatursystem und ist in Kolonkarzinomen verbunden mit

einer besseren Prognose trotz histologisch aggressiven Tumorcharakteristika wie einem schlechten Differenzierungsgrad und einem invasiven Tumorwachstum. Bisher existieren nur wenige Publikationen über den MSI-Phänotyp im duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Die angegebene Prävalenz umfasst in der Literatur je nach Analysebedingungen und Anzahl und Art der getesteten Genorte 0 % bis 50 %. Gesicherte Aussagen über die prognostische Wertigkeit und eine mögliche Assoziation mit bestimmten histopathologischen Parametern können aufgrund der geringen Anzahl von Publikationen bisher nicht getroffen werden.

Methode: In dieser Studie wurden zwei konsekutive internationale Patientenkollektive mit einer Fallzahl von $n = 119$ auf Mutationen des *K-ras*^{Cod12}-Protoonkogens untersucht. Dazu diente die etablierte Methode der RFLP-PCR Analyse unter Verwendung der Primer RAS-A-1 FW MUT (*forward primer*) und RAS Rev Dig (*backward primer*) sowie der Restriktionsendonuklease *BSTNI*. Der molekulare Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität wurde mittels Amplifikation der Mikrosatellitenorte *BAT25* und *BAT26* durch eine PCR und anschließender Analyse von Längenveränderungen dieser Genloki an der automatischen Sequenzmaschine mittels laservermittelter Kapillarelektrophorese bestimmt. Anhand einer immunhistochemischen Analyse wurden die Fälle mit Längenveränderungen an den Mikrosatellitenloki auf eine defekte Expression der DNA-Reparaturproteine untersucht. Die prognostische Aussagekraft der Ergebnisse wurde im Anschluss mittels der Kaplan-Meier Methode und des Log Rank-Tests ausgewertet. Für die Untersuchung einer möglichen Korrelation beider molekulargenetischer Phänotypen mit den gängigen histopathologischen Parametern wurde der Chi-Quadrat-Test (Fisher's exact test) verwendet.

Ergebnisse: Ein Jahr nach chirurgischer Therapie lebten noch 64,7 % der Patienten, die 2-Jahres- und 3-Jahresüberlebensrate lagen bei 37 % bzw. 27,7 %. Fünf Jahre nach chirurgischer Therapie lebten nur noch 21,8 % der operierten Patienten. Bezüglich der postoperativen Überlebensrate wiesen die beiden Patientenkollektive keine signifikanten Unterschiede auf. Unter den histopathologischen Tumorcharakteristika stellten sich lediglich die Parameter Tumorstadium und lokale Tumorexansion (T) in der univariaten Analyse als signifikante prognostische Faktoren auf das Überleben dar ($p < 0.001$). In der multivariaten Analyse war die lokale Tumorexansion als einziger unabhängiger prognostischer Faktor ($p < 0.003$) zu werten.

Die gefundene *K-ras*^{Cod12}-Mutationsrate lag analog zu der in bisherigen Publikationen berichteten Mutationsfrequenz bei 78,2 %. Träger dieser Protoonkogenmutation wiesen nach einer follow up-Periode von 2 Jahren eine statistisch signifikante kürzere Überlebenszeit im

Vergleich zu der *K-ras*^{Cod12} nicht-mutierten *wild type* Variante auf ($p = 0.049$). Die Hazard-Funktion zur Risikoabschätzung zeigte dementsprechend eine deutlich erhöhte Sterbewahrscheinlichkeit der *K-ras*^{Cod12}-Mutationsträger während des postoperativen Intervalls von 2 Jahren. *K-ras*^{Cod12}-Mutationsträger zeigten einen deutlichen Trend zu einem schlechteren Differenzierungsgrad (G3), mit einem grenzwertigen p -Wert von $p = 0.05$. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der *K-ras*^{Cod12}-mutierten Variante und bestimmten histopathologischen Parametern konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, auch wenn *K-ras*^{Cod12}-Mutationen gehäuft mit ungünstigeren prognostischen Indikatoren wie positiver Lymphknotenstatus und höherem Tumorstadium einhergingen.

Von 119 duktalem Adenokarzinomen des Pankreas wies nur ein Fall (0,8 %) den molekularen MSI-Phänotyp mit Längenveränderungen der Genorte *BAT25* und *BAT26* sowie eine defekte Expression des DNA-Reparaturgens *hMLH1* auf. Histologisch fand sich analog der bisher beschriebenen MSI-Tumorhistologie ein Karzinom im AJCC-Tumorstadium III mit MSI-typischer aggressiver Tumornatur bei schlechtem Differenzierungsgrad (G3-Karzinom), infiltrierender Tumorexpansion (T4), ausgeprägter Organnekrose und organüberschreitendem invasiven Wachstum. Die gefundene Prävalenz deckt sich mit den bisherigen Daten aus westlichen Publikationen, die gleiche Analysebedingungen auswiesen, d.h. die unter Verwendung der Marker *BAT25* und *BAT26* durchgeführt wurden und deren Ergebnisse durch eine immunhistochemische Analyse der MMR-Proteine erweitert wurden (0 % bis maximal 2,4 %).

Im Rahmen der MSI-Analyse zeigten überraschenderweise acht der 119 Patienten in der molekularbiologischen Analyse einen *shift* an *BAT25*, ohne dass Längenveränderungen an *BAT26* festgestellt werden konnte. Da in der immunhistochemischen Analyse keine defiziente Expression der MMR-Proteine gefunden wurde, handelt es sich bei diesen Fällen am wahrscheinlichsten nicht um MSI-positive Phänotypen, sondern um Polymorphismen des *BAT25*-Genlokus, die in den verschiedenen Studien über MSI-Karzinome anderer Organsysteme in der Literatur bisher nie erwähnt worden sind. Möglicherweise ist das Pankreaskarzinom mit einer überdurchschnittlich hohen Rate von Polymorphismen an diesem Genort verbunden, die unter Umständen eine Malignitätsentstehung und Krankheitsprogression des Pankreaskarzinoms begünstigen.

Fazit: In dieser Studie konnte analog zu bisherigen Publikationen gezeigt werden, dass das Überleben signifikant von den Faktoren Tumorstadium und lokaler Tumorexpansion (T)

abhängt. *K-ras*^{Cod12}-Mutationen finden sich in etwa 78 % der Pankreaskarzinome und könnten aufgrund der hohen Prävalenzrate zukünftig als frühe Indikatoren und Screeningmarker in Hochrisikogruppen, wie zum Beispiel Rauchern, dienen. Ihre Mutationsträger weisen in einer follow up-Periode von 2 Jahren einen signifikanten Überlebensnachteil und ein deutlich höheres Sterberisiko auf. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie und anderer westlicher Publikationen lassen darauf schließen, dass der molekulare Phänotyp der Mikrosatelliteninstabilität in sporadischen dukalen Adenokarzinomen des Pankreas eine Rarität darstellt und nur in Ausnahmefällen an der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms beteiligt ist. Eine eventuelle Rolle der beschriebenen *BAT25*-Polymorphismen in der Tumorentstehung bietet Anlass zu weiteren Untersuchungen und sollte angesichts der ausgesprochen ungünstigen Prognose des Pankreaskarzinoms im Hinblick auf mögliche neue Erkenntnisse in der Malignitätsentstehung und Krankheitsprogression Gegenstand weiterer Untersuchungen bilden.

7. Literatur

1. Robert Koch- Institut, Krebsinzidenzschätzungen für Deutschland bis 2002
2. Deutsches Krebsforschungsinstitut Heidelberg (DKFZ)
3. Knudson AG Jr. Overview: genes that predispose to cancer. *Mutat Res.* 1991 Apr;247(2):185-90.
4. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID), Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends, 5. Auflage, 2006.
5. 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 Sep 1;319 (9):525-32.
6. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer.* 1992 Sep 15;70(6 Suppl):1727-31.
7. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993 May 7;260(5109):816-9.
8. 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 Jun 10;363(6429):558-61.
9. 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 May 7;260(5109):812-6.
10. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Jun;79(11):3637-40.
11. Mu DQ, Peng YS, Xu QJ. Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World J Gastroenterol.* 2004 Feb 15;10(4):471-5.
12. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 2000 Oct 15;351 Pt 2:289-305.

13. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut*. 2007 Aug;56(8):1134-52.
14. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;7(4):295-308.
15. NCBI, OMIM- (Online Mendelian Inheritance in Man-) Datenbank, Johns Hopkins University. V-KI-RAS2 KIRSTEN RAT SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG; KRAS. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=190070>.
16. Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol*. 1993 Aug;143(2):545-54.
17. 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 Jan 1;82(1):96-103.
18. Slebos RJ, Hoppin JA, Tolbert PE, Holly EA, Brock JW, Zhang RH, Bracci PM, Foley J, Stockton P, McGregor LM, Flake GP, Taylor JA. K-ras and p53 in pancreatic cancer: association with medical history, histopathology, and environmental exposures in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Nov;9(11):1223-32.
19. Zhou XP, Hoang JM, Li YJ, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M, Lothe RA, Gleeson CM, Russell SE, Muzeau F, Fléjou JF, Hoang-Xuan K, Lidereau R, Thomas G, Hamelin R. Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998 Feb;21(2):101-7.
20. Sammalkorpi H, Alhopuro P, Lehtonen R, Tuimala J, Mecklin JP, Järvinen HJ, Jiricny J, Karhu A, Aaltonen LA. Background mutation frequency in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer Res*. 2007 Jun 15;67(12):5691-8.
21. Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:101-33.

22. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):1027-38.
23. 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 Sep 16;365(6443):274-6 Erratum in: *Nature* 1994 Apr 7;368(6471);569.
24. 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 Aug 15;54(16):4308-12.
25. Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*. 2001 Apr 15;61(8):3230-9.
26. De la Chapelle A. Microsatellite instability. *N Engl J Med*. 2003 Jul 17;349(3):209-10.
27. Perucho M. Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med*. 1996 Jun;2(6):630-1.
28. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopoulos N, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet*. 1995 Jan;9(1):48-55.
29. 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 Jul 21;95(15):8698-702.
30. Eshleman JR, Lang EZ, Bowerfind GK, Parsons R, Vogelstein B, Willson JK, Veigl ML, Sedwick WD, Markowitz SD. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene*. 1995 Jan 5;10(1):33-7.
31. Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, Groden J, Meuth M. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 5;91(14):6319-23.
32. Bertholon J, Wang Q, Galmarini CM, Puisieux A. Mutational targets in colorectal cancer cells with microsatellite instability. *Fam Cancer*. 2006;5(1):29-34.

33. 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 Feb 18;96(4):261-8.
34. 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 Jan 1;59(1):249-56.
35. Zhou XP, Hoang JM, Cottu P, Thomas G, Hamelin R Allelic profiles of mononucleotide repeat microsatellites in control individuals and in colorectal tumors with and without replication errors. *Oncogene.* 1997 Oct 2;15(14):1713-8.
36. 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 Jan 15;57(2):300-3.
37. Zhou XP, Hoang JM, Li YJ, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M, Lothe RA, Gleeson CM, Russell SE, Muzeau F, Fléjou JF, Hoang-Xuan K, Lidereau R, Thomas G, Hamelin R. Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998 Feb;21(2):101-7.
38. Brennetot C, Buhard O, Jourdan F, Fléjou 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 Jan 20;113(3):446-50.
39. Hiddemann W, Huber H, Bartram, CR. *Die Onkologie.* Springer-Verlag. 2004
40. Schneider G, Lersch C, Schmid RM. Pancreatic carcinogenesis. Clinical implications. *Chirurg.* 2003 Mar;74(3):165-70 [Article in German].
41. Moore PS, Beghelli S, Zamboni G, Scarpa A. Genetic abnormalities in pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2003 Jan 7;2:7.
42. Michl P, Pauls S, Gress TM Evidence-based diagnosis and staging of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006 Apr;20(2):227-51.

43. Garcea G, Dennison AR, Pattenden CJ, Neal CP, Sutton CD, Berry DP. Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature. *J Pancreas (Online)* 2008; 9(2):99-132.
44. S3- Leitlinie "Exokrines Pankreaskarzinom" 2007. Springer Verlag.
45. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2004 Mar 27;363(9414):1049-57.
46. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006 Apr;20(2):197-209.
47. 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 Apr;20(2):253-83.
48. Berrington de Gonzalez A, Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2003 Aug 4;89(3):519-23.
49. 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*. 2001 Apr 1;61(7):3139-44.
50. 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*. 1998 Jun;152(6):1501-7.
51. 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*. 2002 Aug;8(8):2536-40.
52. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Ritchey J, Stewart AK, Winchester DP, Talamonti MS. Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database. *Cancer*. 2007 Aug 15;110(4):738-44.
53. Rösch T, Lightdale CJ, Botet JF, Boyce GA, Sivak MV Jr, Yasuda K, Heyder N, Palazzo L, Dancygier H, Schusdziarra V, et al. Localization of pancreatic endocrine tumors by endoscopic ultrasonography. *N Engl J Med*. 1992 Jun 25;326(26):1721-6.

54. Balci NC, Semelka RC. Radiologic diagnosis and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Radiol.* 2001 May;38(2):105-12.
55. Yeo CJ, Abrams RA, Grochow LB, Sohn TA, Ord SE, Hruban RH, Zahurak ML, Dooley WC, Coleman J, Sauter PK, Pitt HA, Lillemoe KD, Cameron JL. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: postoperative adjuvant chemoradiation improves survival. A prospective, single-institution experience. *Ann Surg.* 1997 May;225(5):621-33.
56. Von Hoff DD, Evans DB, Hruban RH. Pretreatment diagnostic evaluation. *Pancreatic Cancer.* Jones and Bartlett Publishers, 1st edition 2005; pp.266-267.
57. Burris HA 3rd. Recent updates on the role of chemotherapy in pancreatic cancer. 1: *Semin Oncol.* 2005 Aug;32(4 Suppl 6):S1-3.
58. Schumacher G, Hoffmann J, Cramer T, Spinelli A, Jacob D, Bahra M, Pratschke J, Pfitzmann R, Schmidt S, Lage H. Antineoplastic activity of 2-methoxyestradiol in human pancreatic and gastric cancer cells with different multidrug-resistant phenotypes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Sep;22(9):1469-73.
59. Bahra M, Jacob D Surgical palliation of advanced pancreatic cancer.: *Recent Results Cancer Res.* 2008;177:111-20.
60. Riede UN, Schaefer HE, Werner M. *Allgemeine und spezielle Pathologie.* Georg Thieme Verlag, 5. Auflage 2004.
61. Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie.* Urban & Fischer Verlag, 3. Auflage 2004.
62. Cubilla AL, Fitzgerald PJ. Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. *Cancer Res.* 1976 Jul;36(7 PT 2):2690-8.
63. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 Aug;6(8):2969-72.
64. Kern S, Hruban R, Hollingsworth MA, Brand R, Adrian TE, Jaffee E, Tempero MA. A white paper: the product of a pancreas cancer think tank. *Cancer Res.* 2001 Jun 15;61(12):4923-32.
65. Wendt LR, Osvaldt AB, Bersch VP, Schumacher RC, Edelweiss MIA, Rohde L. Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice. Effects of alcohol and caffeine. *Acta Cir. Bras.* vol.22 no.3. May/June 2007.

66. 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 May 20;53(4):549-54.
67. Castells A, Puig P, Móra J, Boadas J, Boix L, Urgell E, Solé M, Capellà G, Lluís F, Fernández-Cruz L, Navarro S, Farré A. K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol*. 1999 Feb;17(2):578-84.
68. Niedergethmann M, Rexin M, Hildenbrand R, Knob S, Sturm JW, Richter A, Post S. Prognostic implications of routine, immunohistochemical, and molecular staging in resectable pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2002 Dec;26(12):1578-87.
69. Dergham ST, Dugan MC, Kucway R, Du W, Kamarauskiene DS, Vaitkevicius VK, Crissman JD, Sarkar FH. Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol*. 1997 Apr;21(2):127-43.
70. Ghaneh P, Kawesha A, Evans JD, Neoptolemos JP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2002;9(1):1-11.
71. Seymour AB, Hruban RH, Redston M, Caldas C, Powell SM, Kinzler KW, Yeo CJ, Kern SE. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma: *Cancer Res*. 1994 May 15;54(10):2761-4.
72. 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 Oct 1;55(19):4264-7.
73. 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 Apr;80(1-2):11-6.
74. 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 Apr;4(4):1071-4.
75. 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 May;156(5):1641-51.
76. Schimanski CC, Linnemann U, Berger MR. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. *Cancer Res.* 1999 Oct 15;59(20):5169-75.
 77. Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, Sitzmann JV, Hruban RH, Goodman SN, Dooley WC, Coleman J, Pitt HA. Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients. *Ann Surg.* 1995 Jun;221(6):721-31; discussion 731-3.
 78. Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S, Sasaki Y, Kameyama M, Nakamori S, Kabuto T, Furukawa H. Regional chemotherapy to prevent hepatic metastasis after resection of pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology.* 1997 Nov-Dec;44(18):1541-6.
 79. Trede M, Saeger HD, Schwall G, Rumstadt B. Resection of pancreatic cancer--surgical achievements. *Langenbecks Arch Surg.* 1998 Apr;383(2):121-8.
 80. Nagakawa T, Konishi I, Ueno K, Ohta T, Akiyama T, Kayahara M, Miyazaki I. Surgical treatment of pancreatic cancer. The Japanese experience. *Int J Pancreatol.* 1991 Summer;9:135-43.
 81. Miyazaki I, Nagakawa T, Ohta T. Extensive radical surgery for carcinomas of the head of the pancreas. *Gan To Kagaku Ryoho.* 1992 Dec;19(14):2333-7.
 82. 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 Apr;32(3):271-5.
 83. 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):202-9. Epub 2004 Jun 24.
 84. Ridwelski K, Meyer F, Schmidt U, Lippert H. Results of surgical treatment in ampullary and pancreatic carcinoma and its prognostic parameters after R0-resection. *Zentralbl Chir.* 2005 Aug;130(4):353-61[Article in German].
 85. 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 Jan 14;8:5.

86. Ferrone CR, Brennan MF, Gonen M, Coit DG, Fong Y, Chung S, Tang L, Klimstra D, Allen PJ. Pancreatic Adenocarcinoma: The Actual 5-Year Survivors. *J Gastrointest Surg.* 2007 Nov 20.
87. Cleary SP, Gryfe R, Guindi M, Greig P, Smith L, Mackenzie R, Strasberg S, Hanna S, Taylor B, Langer B, Gallinger S. Prognostic factors in resected pancreatic adenocarcinoma: analysis of actual 5-year survivors. *J Am Coll Surg.* 2004 May;198(5):722-31.
88. Kolb A, Kleeff J, Friess H, Büchler MW. The effect of R1 resection in the hepatobiliary pancreatic system *Chirurg.* 2007 Sep;78(9):802-9.
89. Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, Arnold MA, Chang DC, Coleman J, Hodgins MB, Sauter PK, Hruban RH, Riall TS, Schulick RD, Choti MA, Lillemoe KD, Yeo CJ. 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *J Gastrointest Surg.* 2006 Nov;10(9):1199-210.
90. Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, Sauter PK, Coleman J, Hruban RH, Lillemoe KD. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg.* 2000 Nov-Dec;4(6):567-79.
91. Lim JE, Chien MW, Earle CC. Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: a population-based, linked database analysis of 396 patients. *Ann Surg.* 2003 Jan;237(1):74-85.
92. Lemoine NR, Jain S, Hughes CM, Staddon SL, Maillet B, Hall PA, Klöppel G. Ki-ras oncogene activation in preinvasive pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 1992 Jan;102(1):230-6.
93. Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, Oshima S, Aoki T, Higaki N, Sugimoto K, Akagi K, Fujiwara Y, Nishisho I, Sakon M, Gotoh M, Monden M. Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res.* 1998 Jun;4(6):1527-32.
94. Howe JR, Conlon KC. The molecular genetics of pancreatic cancer. *Surg Oncol.* 1997;6(1):1-18.
95. Kim J, Reber HA, Dry SM, Elashoff D, Chen SL, Umetani N, Kitago M, Hines OJ, Kazanjian KK, Hiramatsu S, Bilchik AJ, Yong S, Shoup M, Hoon DS. Unfavourable

- prognosis associated with K-ras gene mutation in pancreatic cancer surgical margins. *Gut*. 2006 Nov;55(11):1598-605.
96. Finkelstein SD, Przygodzki R, Pricolo VE, Sayegh R, Bakker A, Swalsky PA, Keller G. K-ras-2 topographic genotyping of pancreatic adenocarcinoma. *Arch Surg*. 1994 Apr;129(4):367-72.
 97. Dong M, Nio Y, Tamura K, Song MM, Guo KJ, Guo RX, Dong YT. Ki-ras point mutation and p53 expression in human pancreatic cancer: a comparative study among Chinese, Japanese, and Western patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Mar;9(3):279-84.
 98. Allison DC, Piantadosi S, Hruban RH, Dooley WC, Fishman EK, Yeo CJ, Lillemoe KD, Pitt HA, Lin P, Cameron JL. DNA content and other factors associated with ten-year survival after resection of pancreatic carcinoma. *J Surg Oncol*. 1998 Mar;67(3):151-9.
 99. Kahn S, Yamamoto F, Almoguera C, Winter E, Forrester K, Jordano J, Perucho M. The c-K-ras gene and human cancer (review). *Anticancer Res*. 1987 Jul-Aug;7(4A):639-52.
 100. Talar-Wojnarowska R, Malecka-Panas E. Molecular pathogenesis of pancreatic adenocarcinoma: potential clinical implications. *Med Sci Monit*. 2006 Sep;12(9):RA186-93.
 101. Berthélemy P, Bouisson M, Escourrou J, Vaysse N, Rumeau JL, Pradayrol L. Identification of K-ras mutations in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Intern Med*. 1995 Aug 1;123(3):188-91.
 102. Trümper L, Menges M, Daus H, Köhler D, Reinhard JO, Sackmann M, Moser C, Sek A, Jacobs G, Zeitz M, Pfreundschuh M.. Low sensitivity of the ki-ras polymerase chain reaction for diagnosing pancreatic cancer from pancreatic juice and bile: a multicenter prospective trial. *J Clin Oncol*. 2002 Nov 1;20(21):4331-7.
 103. Fry LC, Mönkemüller K, Malfertheiner P. Molecular markers of pancreatic cancer: development and clinical relevance. *Langenbecks Arch Surg*. 2008 Feb 12.
 104. Arvanitakis M, Van Laethem JL, Parma J, De Maertelaer V, Delhaye M, Devière J. Predictive factors for pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis in association with K-ras gene mutation. *Endoscopy*. 2004 Jun;36(6):535-42.
 105. Söreide K, Janssen EA, Söiland H, Körner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg*. 2006 Apr;93(4):395-406.

106. Malesci A, Laghi L, Bianchi P, Delconte G, Randolph A, Torri V, Carnaghi C, Doci R, Rosati R, Montorsi M, Roncalli M, Gennari L, Santoro A. Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Jul 1;13(13):3831-9.
107. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 20;23(3):609-18.
108. Anwar S, Frayling IM, Scott NA, Carlson GL. Systematic review of genetic influences on the prognosis of colorectal cancer. *Br J Surg.* 2004 Oct;91(10):1275-91.
109. Gazvoda B, Juvan R, Zupanic-Pajnic I, Repse S, Ferlan-Marolt K, Balazic J, Komel R. Genetic changes in Slovenian patients with gastric adenocarcinoma evaluated in terms of microsatellite DNA. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Dec;19(12):1082-9.
110. Beghelli S, de Manzoni G, Barbi S, Tomezzoli A, Roviello F, Di Gregorio C, Vindigni C, Bortesi L, Parisi A, Saragoni L, Scarpa A, Moore PS. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with better prognosis in only stage II cancers. *Surgery.* 2006 Mar;139(3):347-56.
111. 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 Jun;31(6):846-53.
112. Deltas A, Puhl A, Schraml P, Thomke SE, Rüschoff J, Mihatsch MJ, Moch H. Molecular and clinicopathological analysis of ovarian carcinomas with and without microsatellite instability. *Anticancer Res.* 2004 Jan-Feb;24(1):361-9.
113. 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 Nov 1;53(21):5087-9.
114. Oda S, Zhao Y, Maehara Y. Microsatellite instability in gastrointestinal tract cancers: a brief update. *Surg Today.* 2005;35(12):1005-15.
115. Dong M, Nio Y, Tamura K, Song MM, Guo KJ, Guo RX and Dong YT. Ki-ras Point Mutation and p53 Expression in Human Pancreatic Cancer: A Comparative Study among Chinese, Japanese, and Western Patients. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* Vol. 9, 279-284, March 2000.

116. 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):220-7.
117. 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 Jan 15;57(2):300-3.
118. Pyatt R, Chadwick RB, Johnson CK, Adebamowo C, de la Chapelle A, Prior TW. Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. Implications for microsatellite instability testing. *Am J Pathol*. 1999 Aug;155(2):349-53.

Danksagung

Für das Zustandekommen der vorliegenden Dissertation möchte ich mich für die breite Unterstützung und Hilfe bedanken. An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Privat-Dozent Dr. Guido Schumacher herzlich danken für die Überlassung des Themas, die umfassende und hilfreiche Betreuung und die Möglichkeit der Promotion an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Virchow-Klinikums, Universitätsmedizin Charité unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Neuhaus. Ebenfalls mein Betreuer Dr. Antonino Spinelli hat mich in meinem Vorhaben stets unterstützt und war mir bei der Durchführung der Dissertation richtungweisend. Die Gewebeschnitte wurden mir freundlicherweise von Prof. Christoph Röcken und Dr. Ilona Gräntzdörffer des pathologischen Institutes der Universitätsmedizin Charité und von Prof. Massimo Roncalli des Istituto Clinico Humanitas zur Verfügung gestellt. Dafür und für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit möchte ich mich herzlich bedanken. Für die Einarbeitung in die praktischen Grundlagen der Arbeit im Labor gilt mein großer Dank ebenfalls den Betreuern und Mitarbeitern des Labors Dr. Luigi Laghi, Dr. Ann Randolph und Dr. Paolo Bianchi. Weiterhin sei Dr. Marcus Bahra herzlich gedankt für die große Hilfe in der Gewinnung der Patientendaten und dem Zugang zu der Datenbank und dem Klinkarchiv, sowie Herrn Michael Hippler-Benscheid für die Beratung in statistischen Fragen. Mein großer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets unterstützt und mir mein Studium ermöglicht haben. Zum Schluss sei meinen Freunden und meinem Freund gedankt für die Geduld und Aufmunterung während der Versuchsphase im Labor und während der Erstellung der Arbeit.

Erklärung an Eides Statt

Die vorliegende Dissertation "Prävalenz und prognostische Wertigkeit von *K-ras* Codon 12-Genmutationen und des molekularen Phänotyps der Mikrosatelliteninstabilität im duktalem Adenokarzinom des Pankreas" wurde von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur wurden vollständig angegeben.

Berlin, 06.08.2008

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.