

Aus dem Instituts für Pathologie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Christoph Röcken),
aus der Sektion für Hämatopathologie und Lymphknotenregister
(Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram Klapper),
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der
solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktalem
Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-
mucinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des
Pankreas**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

LUKAS DOMANOWSKY

aus München

Kiel, 2018

1. Berichterstatter/in: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram Klapper

2. Berichterstatter/in: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Becker

Tag der mündlichen Prüfung 02.04.19

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 31.01.19

gez.:

Univ.-Prof. Dr. med. Johannes Roider
Vorsitzender der Prüfungskommission

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Kapitel 1: Einleitung.....	1
1.1 Solid pseudopapilläre Neoplasie des Pankreas	1
1.1.1 Tumorausbreitung	1
1.1.2 Makroskopie.....	1
1.1.3 Histologie	1
1.1.4 Immunhistochemie	2
1.1.5 Prognose	2
1.2 Duktales Adenokarzinom des Pankreas.....	2
1.2.1 Risikofaktoren	3
1.2.2 Tumorausbreitung	3
1.2.3 Makroskopie.....	3
1.2.4 Histologie	4
1.2.5 Immunhistochemie	4
1.2.6 Genetische Aberrationen	4
1.2.7 Prognose	5
1.3 Intraduktale papillär muzinöse Neoplasie des Pankreas (kurz IPMN)	5
1.3.1 Tumorausbreitung.....	6
1.3.2 Makroskopie	6
1.3.3 Histologie	6
1.3.4 Immunhistochemie	6
1.3.5 Prognose	7
1.4 WNT/ β -Catenin-Pathway	7
1.4.1 Regulation des WNT/ β -Catenin-Pathway	7
1.4.2 Die Rolle des WNT/ β -Catenin-Pathways in der Karzinogenese.....	8
1.4.3 Der WNT/ β -Catenin-Pathway in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem Adenokarzinom des Pankreas und der IPMN	8
1.5 Funktion und Bedeutung der Gene FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L.....	9
1.5.1 FLI-1	9
1.5.2 IGFBP3.....	9
1.5.3 PBK/TOPK.....	11
1.5.4 BCL9L.....	12
Kapitel 2: Fragestellung	14

Kapitel 3: Methoden und Materialien.....	15
3.1 Patientenauswahl	15
3.2 Material	15
3.2.1 Chemikalien/Sonstiges	15
3.2.2 Verbrauchsmaterialien	16
3.2.3 RT-PCR-Primer, -Sonden	16
3.2.4 Komplett-Systeme (Kits).....	16
3.2.5 Geräte	17
3.2.6 Software	17
3.3 Methoden	18
3.3.1 Manuelle Mikrodisektion.....	18
3.3.1 Laser-Mikrodisektion	18
3.3.2 Entparaffinierung aus Paraffinblöcken.....	18
3.3.3 Isolierung genomischer RNA aus Gewebe	19
3.3.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)	20
3.3.4.1 Kontrolle des Probengewebes auf Integrität	20
3.3.4.2 Ansatz und Durchführung der qualitativen PCR.....	20
3.3.4.3 Quantitative Real-Time-PCR	22
3.3.4.4 Kontrolle der Sonden	23
3.3.4.5 Ansatz und Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR	23
3.3.4.6 Relative Quantifikation mittels vergleichender Ct Methode	26
3.3.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse	28
Kapitel 4: Ergebnisse.....	29
4.1 Quantitative Analyse.....	29
4.1.1.1 FLI-1	31
4.1.1.2 IGFBP3	33
4.1.1.3 BCL9L	35
4.1.1.4 TOPK.....	37
4.2 Korrelation der berechneten Ergebnisse	38
4.2.1.1 Korrelation und deren Signifikanzniveau in der SPN.....	38
4.2.1.2 Korrelation und deren Signifikanzniveau im PDAC	40
4.2.1.3 Korrelation und deren Signifikanzniveau in der IPMN.....	42
Kapitel 5: Diskussion	44
5.1 Diskussion der Gene	44
5.2.1 FLI-1.....	44
5.2.2 TOPK	45
5.2.3 IGFBP3.....	46
5.2.4 BCL9L.....	47
5.3 Ausblick.....	48
Kapitel 6: Zusammenfassung	49

Literaturverzeichnis	51
Publikationen	55
Abgrenzung zur Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, IGFBP3 und TOPK in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas" ...	56
Ethikvotum	59
Eidesstaatliche Erklärung	60
Danksagung	61

Abkürzungsverzeichnis

6-FAM	6 – Carboxyfluorescein
AIB1	amplified in breast 1
AKT	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
AU	Artificial units
Bcl9L	B-cell CLL/lymphoma 9-like
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BRCA2	breast cancer 2, early onset
CA	Carbohydrate-Antigen 19-9
CCD	Charge Coupled Device
CD	Cluster of differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
c-erbB-2	cellular avian erythroblastosis homologue B2
CREB	cAMP-response element binding protein
Ct	Cycle threshold
CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein) beta 1 Gen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPC4	SMAD family member 4
ERK2	Extracellular signal-regulated kinase 2
ETS	E-twenty-six

EGF	Epidermal growth factor
EMA	epithelial membrane antigen
FAMM	familial atypical multiple mole melanoma
FFPE	Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
Fli-1	Friend leukemia integration 1
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin/Eosin
Her2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colon cancer
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IGFBP3	Insulin like growth factor binding protein 3
IGF-I	Insulin like growth factor I
IGF1R	Insulin like growth factor 1 receptor
IPMN	Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
Ki67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LEF	Lymphoid enhancer factor
MAP	Mitogen-activated protein
MCN	Muzinös-zystische Neoplasie
MGB	Minor Groove Binder
MLH1	MutL homolog 1

MKK4	Mitogen-activated protein kinase kinase 4
MSH2	MutS homolog 2
MYB	V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEP	Neutrale Endopeptidase
NFQ	Nicht fluoreszierender Quencher
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NTC	No Template Control
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBK	PDZ-binding kinase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinasen
PKB	Proteinkinase B
PNET	Pankreatische neuroendokrine Tumoren
PSCA	Prostate stem cell antigen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SPN	Solid Pseudopapilläre Pankreasneplasie
Src	Sarcoma
STK11	Serine/threonine kinase 11

TAG	Tumor-associated glycoprotein
TCF	T cell factor
TGF α	Transforming growth factor alpha
TGF β R2	Transforming growth factor, beta receptor II
TOPK	T-LAK-cell-originated protein kinase
WNT	Wingless und Int-1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionsweise der TaqMan-Reagenzien (Applied Biosystems, n.d.)	23
Abbildung 2: PCR-Programm des StepOne	26
Abbildung 3: Scatterplot der Genexpression von FLI1 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nach Herstellung einer Normalverteilung	33
Abbildung 4: Säulendiagramm der Expressionsverhältnisse von FLI1 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe	33
Abbildung 5: Scatterplot der Genexpression von IGFBP3 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nach Herstellung einer Normalverteilung	35
Abbildung 6: Säulendiagramm der Expressionsverhältnisse von IGFBP3 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe	35
Abbildung 7: Scatterplot der Genexpression von IGFBP3 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nach Herstellung einer Normalverteilung	37
Abbildung 8: Säulendiagramm der Expressionsverhältnisse von BCL9/L im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe	37
Abbildung 9: Korrelation von IGFBP3 und FLI1 in der SPN.....	39
Abbildung 10: Korrelation von BCL9L und FLI1 in der SPN.....	39
Abbildung 11: Korrelation von BCL9L und IGFBP3 in der SPN	39
Abbildung 12: Korrelation von BCL9L und IGFBP3 im PDAC	41
Abbildung 13: Korrelation von BCL9L und FLI1 im PDAC	41
Abbildung 14: Korrelation von IGFBP3 und FLI1 im PDAC	41
Abbildung 15: Korrelation von IGFBP3 und FLI1 in der IPMN	43
Abbildung 16: Korrelation von BCL9L und FLI1 in der IPMN	43
Abbildung 17: Korrelation von BCL9L und IGFBP3 in der IPMN	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer	21
Tabelle 2: Qualitative PCR.....	21
Tabelle 3: PCR-Programm des Thermal Cycler.....	22
Tabelle 4: Quantitative PCR.....	24
Tabelle 5: Verwendete Sonden und Primer	25
Tabelle 6: Genexpression im SPN-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe..	30
Tabelle 7: Genexpression im IPMN-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe	30
Tabelle 8: Genexpression im Pankreaskarzinom-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe	31

Kapitel 1: Einleitung

1.1 Solid pseudopapilläre Neoplasie des Pankreas

Die seltene solid pseudopapilläre Neoplasie des Pankreas (SPN) ist eine gering maligne Tumorentität des Pankreas, die vor allem junge Frauen betrifft (1,2). Sie macht etwa 1-2% aller Neoplasien des Pankreas, 5% der zystischen Neoplasien und weniger als 0,9-2,7% aller exokrinen Tumoren aus(1,3).

Es sind für die SPN weder spezifische Symptome, noch gesteigerte Tumormarker oder funktionelle endokrine Symptome bekannt(1,4). Endosonographisch und computertomographisch lassen sich scharf begrenzte, inhomogene, nicht septierte und in den Randbereichen teils verkalkte Raumforderungen nachweisen(1,4). Die Vaskularisierung ist vermindert oder nur mäßig gesteigert (1).

1.1.1 Tumorausbreitung

Eine Invasion der umgebenden Organe oder das Auftreten multipler Tumoren ist selten (1). Metastasen entstehen in 5-15% der Fälle, besonders in Peritoneum und Leber, aber nur ausgesprochen selten in Lymphknoten und Haut (1).

1.1.2 Makroskopie

Die SPN besteht aus soliden, zystischen und zentral hämorrhagischen Komponenten (1). Innerhalb des Pankreas sind die Läsionen sowohl in Pankreaskopf, -körper als auch -schwanz zu finden(4). Die Größe der meist gut von der Umgebung abgegrenzten Tumoren reicht von 0,5-25,0 cm bei einem Durchschnitt von 8-10 cm, wobei die kleineren Läsionen meist eine weniger gute Abgrenzung zum umgebenden Gewebe zeigen (1).

1.1.3 Histologie

Das histologische Bild der SPN weist ein Wachstumsmuster mit stark variierenden Anteilen an soliden, pseudopapillären, hämorrhagisch-nekrotischen und pseudozystischen Arealen auf (5). Die soliden Bereiche bestehen aus von Fremdkörperriesenzellen umgebenen Cholesterinkristallen sowie locker zusammenhängenden, monomorphen Zellen mit hyalinen bis muzinösen

Stromaverbindungen und dünnwandigen Blutgefäßen (5). Sie neigen zu Kalzifikation und Ossifikation (1). Histologisch sieht man nur eine geringe Mitoserate sowie Mikroinfiltrationen des umgebenden Pankreasgewebes ohne Befall der Gefäße und Nervenscheiden(1). Metastasen zeigen dasselbe morphologische Bild wie der Primarius, haben dabei aber pleomorphe Zellen und eine höhere Mitoserate (1).

1.1.4 Immunhistochemie

In der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie wurde sowohl eine zytoplasmatische, als auch eine nukleäre Expression von dem Transkriptionsfaktor Friend leukemia integration 1 (FLI-1), dem die Proliferation fördernden Cyclin D1 und vor allem dem am WNT-Signalweg beteiligten, ebenfalls proliferationsfördernden β -Catenin nachgewiesen (6). Für die Tumorsuppressorgene p21 und p27 konnte in 100% bzw. 86% der untersuchten Fälle eine Expression nachgewiesen werden (6). Obwohl vor allem Frauen betroffen sind, konnte keine Expression von Östrogenrezeptor α nachgewiesen werden (1).

1.1.5 Prognose

Die SPN besitzt eine sehr gute Prognose und eine komplette chirurgische Entfernung ist in 85-95% der Fälle kurativ (1,7). Auch bei lokaler Ausbreitung, Rezidiven und Metastasierung wurden lange tumorfreie Perioden durch primäre Resektion erreicht (1).

1.2 Duktales Adenokarzinom des Pankreas

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist mit etwa 85-90% der häufigste Pankreastumor und variiert in seiner Inzidenz je nach Region und Geschlecht zwischen 1,0 und 20,8/100.000(8,9). Die Mortalität entspricht annähernd der Inzidenz(8).

Es gibt keine für das Pankreaskarzinom spezifischen Symptome. Unspezifische Zeichen können Abdominalschmerzen, Gewichtsverlust, Ikterus und Pruritus sein(8). In 70% der Fälle liegt ein seit weniger als 2 Jahren bestehender Diabetes mellitus vor(8). Spätsymptome entstehen durch Metastasierung oder Invasion in andere Organe und beeinträchtigen vor allem die Funktion des Gastrointestinaltraktes und der Leber (8). Außerdem können Aszites, Hypoglykämien und durch die hohe Thrombogenität des Pankreasgewebes rezidivierende Thrombophlebitiden auftreten (8).

Zur Diagnostik steht eine Reihe von bildgebenden Mitteln zur Verfügung. Eindeutige Tumormarker um das Pankreaskarzinom zu bestätigen oder auszuschließen sind bisher nicht bekannt.

1.2.1 Risikofaktoren

In mehreren Studien wurden Risikofaktoren für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms untersucht. Allen voran steigert Rauchen das Risiko um das 2- bis 3-fache(8,9). Weitere Risikofaktoren sind die chronische Pankreatitis, vorausgegangene operative Eingriffe am Magen, radioaktive Strahlung, verschiedene Chemikalien und Diabetes mellitus(8,9). Auch nutritive Faktoren wie eine fleisch- und fettreiche sowie folsäure- und faserarme Ernährung scheinen das Risiko zu steigern (8,10). Desweiteren besteht bei der hereditären Pankreatitis eine genetische Prädisposition zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms(11).

1.2.2 Tumorausbreitung

Aufgrund der unspezifischen oder fehlenden Frühsymptome und der raschen Progredienz wird das Adenokarzinom meist erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (8). Die Invasion des Umgebungsgewebes geschieht meist zunächst entlang der Nerven in das retroperitoneale Fettgewebe und anschließend in die retroperitonealen Gefäße und Nerven(8). Bei Korpus- und Schwanzkarzinomen sind vor allem Milz, Magen, Nebenniere, Kolon und Peritoneum betroffen (8). Das Adenokarzinom metastasiert erst lymphogen in die regionalen und anschließend in die hepatoduodenalen, zöliakalen und paraaortalen Lymphknoten (8). Hämatogen metastasiert es in Leber, Lunge, Nebennieren, Nieren, Knochen, Gehirn und Haut (8).

1.2.3 Makroskopie

Mit 60-70 % findet sich die Mehrzahl der Karzinome im Pankreaskopf, die übrigen wachsen im Pankreaskorpus oder –schwanz (8). Makroskopisch zeigt sich festes, unscharf begrenztes Gewebe, das selten mikrozystische Areale beinhaltet (8). Die Größe der Pankreaskopfkarzinome rangiert in der Regel zwischen 1,5 und 5 cm mit einem Durchschnitt bei 2,5 bis 3,5 cm (8). Karzinome im Korpus- und Schwanzbereich sind bei Diagnose meist etwas größer (8).

1.2.4 Histologie

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist meist mäßig bis schlecht differenziert (8). Der Differenzierungsgrad wird als G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert), G3 (wenig differenziert) oder G4 (undifferenziert) festgelegt. Typisch ist ein dichtes Stroma aus Fibroblasten und Entzündungszellen (9). Es zeigt sich ein vorwiegend glanduläres Wachstumsmuster mit gangartigen Strukturen und einem variierenden Ausmaß an Atypien und Differenzierung (9). Die neoplastischen Zellen besitzen ovale Kerne unterschiedlicher Größe sowie Nukleoli (8). Sowohl Kernpolymorphie als auch Mitoseaktivität steigen mit dem Grad der Dedifferenzierung (8). Die Muzinproduktion geht dagegen zurück (8). Durch die Obstruktion der Pankreasgänge kommt es zu einem sklerotischen Umbau des nichtneoplastischen Pankreasgewebes sowie zu einer chronischen obstruktiven Pankreatitis ohne intraduktale Verkalkungen (8).

1.2.5 Immunhistochemie

Es sind bisher keine Biomarker bekannt, mit denen ein Pankreaskarzinom eindeutig bestätigt oder ausgeschlossen werden kann. Der in den USA am häufigsten verwendete Serummarker ist CA 19-9 mit einer Sensitivität von etwa 80% und einer Spezifität von etwa 90% (12). Allerdings sinkt die Sensitivität sowohl bei kleinen Pankreaskarzinomen unter 3 cm als auch im Rahmen eines geringen Differenzierungsgrades (12). Die Verminderung der Spezifität beruht auf einer ebenfalls gesteigerten Expression bei obstruktivem Ikterus, chronischer Pankreatitis, Leberzirrhose, Cholangitis sowie verschiedenen Adenokarzinomen (12). Desweiteren können Muzine, beispielsweise MUC1 zur Diagnostik des PDAC und MUC5AC zur Differentialdiagnose, herangezogen werden (12).

1.2.6 Genetische Aberrationen

Die mit 90-95% am häufigsten in Pankreaskarzinomen vorkommenden Mutationen befinden sich im KRAS-Gen, einem Gen mit Einfluss auf Proliferation, Zellüberleben, Zytoskelettveränderungen und Motilität (10). Sie führen durch Störung der GTPase-Aktivität zu einem dauerhaft aktiven KRAS-Protein, das wiederum zur Aktivierung des RAF-MAPK Pathways und dadurch zur Proliferation der Zelle führt (10). Die KRAS-Mutationen gehören zu den frühesten Aberrationen in der Entstehung der Pankreaskarzinome (10). Die Mutationen können zwar auch im Serum nachgewiesen werden, allerdings nur mit geringer Spezifität und Sensitivität und erst bei

fortgeschrittenen und in der Regel nicht mehr resezierbaren Pankreaskarzinomen (12). Eine Untersuchung des Pankreassekrets u.a. auf KRAS ist aufgrund der hierfür notwendigen invasiven Diagnostik nicht als Screeningmethode praktikabel (12).

In 50-75% der dukталen Adenokarzinome des Pankreas kommt es zu Mutationen im p53-Gen (13). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch Mutation des p53-Gens unter anderem die Hemmung des Zellwachstums und die Alterungsprozesse der Zelle gestört werden können(13). Des weiteren zeigte sich ein deutlich gesteigertes Metastasierungspotential im Vergleich zu p53-knockout-Mäusen(13).

Weitere in Pankreaskarzinomen vermehrt exprimierte und an der Onkogenese beteiligte Gene sind beispielsweise c-Myc (20-30% der Pankreaskarzinome), MYB und EGFR (10).

1.2.7 Prognose

Die Prognose des Adenokarzinoms des Pankreas ist infaust. Je nach Therapie variiert die mittlere Überlebenszeit zwischen 4,5 und 24,1 Monaten (11). Das 5-Jahres-Überleben liegt auch trotz aggressiver Therapie bei unter 5 %(14). Die radikale Resektion ist die Therapie der Wahl(14). Palliativ können Chemotherapie und Radiochemotherapie oder eine Bypassoperation eingesetzt werden (8).

1.3 Intraduktale papillär muzinöse Neoplasie des Pankreas (kurz IPMN)

Die intraduktale papillär muzinöse Neoplasie des Pankreas entsteht in den großen Pankreasgängen und besteht aus epithelialen, muzinösen und zystischen Anteilen unterschiedlichen Ausmaßes (8). Man unterscheidet benigne, borderline, maligne nicht-invasive und maligne invasive Formen (8). Die IPMN machen etwa 1-3 % der Neoplasien des exokrinen Pankreas aus, treten überwiegend im Alter von 60 bis 79 Jahren auf und betreffen mehr Männer als Frauen (8). Aufgrund der geringen Inzidenz sind aber bisher kaum genaue epidemiologische Daten zu erheben (8). Wie bei dem Adenokarzinom des Pankreas wird möglicherweise auch das Risiko der Entwicklung einer IPMN durch Zigarettenkonsum gesteigert (8).

Die Symptome sind meist unspezifisch und können epigastrische Schmerzen, Pankreatitiden, Gewichtsverlust, Ikterus und einen Diabetes mellitus umfassen (8). Serumlipase und -amylase sind in der Regel gesteigert (8). Diverse bildgebende Diagnostik kann zur Aufstellung der Verdachtsdiagnose herangezogen werden (8). Sensitive und spezifische Tumormarker sind bisher keine bekannt. Einzig die chirurgische Resektion mit anschließender histologischen Aufarbeitung kann eine sichere Diagnose liefern (8).

Die IPMN ist zu unterscheiden von der muzinös zystischen Neoplasie (kurz MCN), die eher bei Frauen auftritt und üblicherweise keinen Anschluss an das Gangsystem hat (8).

1.3.1 Tumorausbreitung

Die benignen, borderline und high grade nicht-invasiven Tumoren können sich über das Gangsystem ausbreiten (8). Letztere sind dabei einem carcinoma in situ gleichzusetzen.

1.3.2 Makroskopie

IPMN sind zwischen 1 und 8 cm groß und haben ein zystisches Erscheinungsbild (8). Das durch den Tumor produzierte Muzin ist hochviskös und kann sich in gesunde Gänge ausbreiten (8). Bei ausgeprägter Erweiterung der Ductus können lockere Gewebepapillen in das Gangsystem ragen (8). Das umgebende Gewebe ist fest und zeigt Veränderungen einer chronisch obstruktiven Pankreatitis (8). Bei invasiven Neoplasien können Muzinseen im Umgebungsgewebe gesehen werden (8).

1.3.3 Histologie

Histologisch zeigen sich große, Muzin produzierende Zellen, die die dilatierten Gänge und zystischen Erweiterungen umgeben (8). Die Zellen bilden papilläre oder pseudopapilläre Strukturen aus (8). Im Rahmen einer intestinalen Metaplasie können Becher- oder Paneth-Zellen vorkommen (8). Man unterscheidet Hauptgang IPMN, Seitengang IPMN und gemischte Typen (15). Eine maligne Entartung zeigt sich vor allem bei den Hauptgang IPMN (15).

1.3.4 Immunhistochemie

In den meisten IPMN wird epithelial membrane antigen (kurz EMA) exprimiert (8). Nahezu alle IPMN produzieren Mucin-2 (kurz MUC2) (8). In IPMN wurde aberrantes

p53 immunohistochemisch in einem geringeren Ausmaß als in duktalem Adenokarzinomen nachgewiesen (8). Immunohistochemisch lassen sich vier Subtypen unterscheiden: die gastrische, intestinale, pankreatobiliäre und die onkozytische Form (16).

1.3.5 Prognose

Invasive Formen haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 40-60 % nach Resektion. Nicht-invasive Typen liegen bei 80-100 % nach Resektion (15). Die Prognose ist somit unabhängig von der Invasivität besser als die des duktalem Adenokarzinoms des Pankreas (15).

1.4 WNT/ β -Catenin-Pathway

Wingless and INT-1 (WNT)-Gene kodieren sezernierte Proteine, die an der Embryonalentwicklung und an der Regeneration verschiedener Gewebe beteiligt sind (17). Während Keimbahnmutationen zu Erbkrankungen führen, können somatische Mutationen zur Entstehung von Tumoren beitragen. Der WNT/ β -Catenin-Signalweg kontrolliert unter anderem Proliferation und Regeneration von Stamm- und Progenitorzellen des hämatopoetischen Systems, Schleimhautepithelzellen, Haarfollikelzellen und Knochenzellen (17,18).

In nahezu allen solid pseudopapillären Pankreasneoplasien wurde eine Überexpression von β -Catenin nachgewiesen, einem Protein des WNT/ β -Catenin-Pathway (6). Diese Überexpression ist meist auf eine Mutation des Catenin (cadherin-associated protein) beta 1 Gen (CTNNB1), das für β -Catenin kodiert, zurückzuführen (19). Die Mutation führt zu einer gestörten Degradation des β -Catenin, das dadurch akkumuliert (19). Daher scheinen Alterationen dieses Pathways eine zentrale Rolle in der Entstehung der SPN zu spielen. Auch in IPMN wird in einigen Fällen eine intranukleäre Akkumulation von β -Catenin und damit eine aberrante Expression gefunden (20).

1.4.1 Regulation des WNT/ β -Catenin-Pathway

WNT ist ein Glykoprotein, das durch die Interaktion mit Frizzled-Rezeptoren und low density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (kurz LRP5/6) eine Signalkaskade auslöst, die zur Rekrutierung des Axins aus dem Axin-Komplex führt (17). Der Axin-

Komplex phosphoryliert in Abwesenheit von WNT das zytoplasmatische β -Catenin, was die Ubiquitinierung und Degradation dieses Proteins zur Folge hat (17). Wird der Axin-Komplex durch die WNT vermittelte Rekrutierung und Inaktivierung des Axins deaktiviert, akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma und wird in den Nukleus transportiert (17). Dort bindet β -Catenin an die DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren lymphoid enhancer factor/T cell factor (LEF/TCF) (17). Diese Interaktion führt zur Transkriptionsaktivierung verschiedener Gene wie beispielsweise der Protoonkogene Cyclin D1 und c-Myc, zwei wichtigen Genen in der Karzinogenese (17). Eine Akkumulation von β -Catenin kann daher zu einer verstärkten Expression von Cyclin D1 und c-Myc führen und somit die Tumorgenese begünstigen. Die durch WNT ausgelöste Expressionsveränderung der Zielgene ist unter anderem auch vom Zelltyp abhängig (17).

1.4.2 Die Rolle des WNT/ β -Catenin-Pathways in der Karzinogenese

Verschiedene Mutationen in Genen des WNT/ β -Catenin-Pathways wurden bereits mit der Entstehung von Malignomen in Verbindung gebracht (19). Einige Mutationen, die zur Entstehung von sporadischen Kolonkarzinomen führen, betreffen das Catenin (cadherin-associated protein) beta 1 Gen (CTNNB1), das für β -Catenin kodiert (19). Die verschiedenen Mutationen verhindern eine Phosphorylierung mit anschließender Ubiquitinierung und Degradation des β -Catenin, das daher akkumuliert (19). Die Akkumulation führt zu einer gesteigerten nukleären Aktivität von β -Catenin und somit zu einer vermehrten Expression der durch LEF/TCF kontrollierten Protoonkogene (17).

1.4.3 Der WNT/ β -Catenin-Pathway in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem Adenokarzinom des Pankreas und der IPMN

Wie bereits erwähnt können Punktmutationen sowohl im β -Catenin-Gen, als auch im Axin- oder APC-Gen das Gleichgewicht zwischen Degradation und Akkumulation von β -Catenin stören und so zur vermehrten Transkription von potentiellen Onkogenen wie beispielsweise c-Myc und Cyclin D1 führen (19). 98% der soliden pseudopapillären Pankreasneoplasien weisen Mutationen im β -Catenin-Gen auf (6). 69% der SPN zeigen gleichzeitig eine Überexpression von Cyclin D1 (6). Die Überexpression von Cyclin D1, die in vielen Neoplasien eine Steigerung der Proliferationsrate zur Folge hat, führt in der solid pseudopapillären Neoplasie des Pankreas nur zu einem langsamen Wachstum (6). Es wird vermutet, dass die in 86 bzw. 100% der SPN nachgewiesene

vermehrte Expression von p21 und p27, funktionellen Antagonisten von Cyclin D1, eine Rolle bei dieser langsamen Wachstumsrate spielt (6). Auch in IPMN konnte eine intranukleäre Akkumulation von β -Catenin nachgewiesen werden, was auf einen aberrant exprimierten WNT/ β -Catenin-Pathway hinweisen könnte (20). In Adenokarzinomen des Pankreas sind Mutationen, die zur direkten Aktivierung des Signalweges führen, selten(21). Allerdings gibt es verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise durch Überexpression von Sulfatase-1, -2 (kurz SULF-1 und -2) und ataxia telangiectasia group-D complementing (kurz ATDC), die die autokrine und parakrine Auswirkung des WNT-Signals verändern(21).

1.5 Funktion und Bedeutung der Gene FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L

1.5.1 FLI-1

Friend leukemia integration 1 (FLI-1) ist ein Transkriptionsfaktor und Mitglied der E-twenty-six (ETS) Transkriptionsfaktorfamilie(22). Als frühester Blutgefäßmarker in der Embryogenese wird FLI-1 sowohl in endothelialen als auch in mesodermalen Geweben exprimiert(22). Eine aberrante FLI-1-Expression wurde in 63% der solid pseudopapillären Pankreasneoplasien sowie in pankreatischen neuroendokrinen Tumoren (PNET) und Merkelzellkarzinomen, neuroendokrinen Tumoren der Haut, nachgewiesen(22). Mit der aberranten FLI-1-Expression der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie ist eine gesteigerte Expression von Cyclin D1 korreliert, einem wichtigen, durch den WNT/ β -Catenin-Pathway kontrollierten, proliferationsaktivierenden Gen (6). Aufgrund der Tatsache, dass in der SPN nur eine geringe Proliferationsrate vorliegt, wurde geschlussfolgert, dass Cyclin D1 hier nicht die proliferationssteigernde Funktion aufweist, die in anderen Neoplasien beobachtet wird(6).

1.5.2 IGFBP3

Insulin like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) ist eines von sechs Mitgliedern der IGFBP-Familie, dessen Funktion darin besteht, den zirkulierenden insulin like growth factor I (IGF-I) mit hoher Affinität in einem Komplex zu binden und somit den Transport nach extravasal zu behindern (23). Dadurch verlängert sich die Halbwertszeit

von IGF-I und es bildet sich ein Reservoir, das keine Aktivität an einem Rezeptor aufweist(23). Gleichzeitig werden durch IGFBP3 die wachstumsfördernden Funktionen von IGF, zum Teil unabhängig von dessen Wirkung durch den insulin like growth factor 1 receptor (IGF1R), entweder gehemmt oder stimuliert(23).

IGF-I ist ein dem Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor mit multiplen endo-, para- und autokrinen Funktionen, der durch Aktivierung von IGF1R sowohl antiapoptotisch als auch proliferativ wirkt(23). Diese Funktion wird vor allem durch Aktivierung des PI3K-AKT Pathways (PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinasen; AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, auch bekannt als Proteinkinase B = PKB) vermittelt(24). Das Fusionsprotein EWS/FLI-1, das als aberranter Transkriptionsfaktor fungiert, kann durch Bindung an den IGFBP3-Promotor dessen Transkription reduzieren und steigert so die Menge des frei zirkulierenden IGF-I (25,26). In Pankreaskarzinomen konnte eine Überexpression von IGF-I und IGF1R nachgewiesen werden (27).

Da IGFBP3 IGF bindet und so dessen Aktivierung von IGF1R verhindert, hat IGFBP3 eine proapoptotische und antiproliferative Wirkung, da die IGF-vermittelten antiapoptotischen und proliferativen Effekte nicht ausgelöst werden können. In verschiedenen Geweben wie beispielsweise Prostata, Colon, Lunge und Mamma konnte eine Assoziation zwischen der verminderten IGFBP3-Konzentration und einer gesteigerten Entartungswahrscheinlichkeit gezeigt werden (23). Besonders für eine hohe IGF-I-Expression bei gleichzeitig niedriger IGFBP3-Expression konnte eine Steigerung des Pankreaskarzinomrisikos nicht ausgeschlossen werden (28). Somit scheint das Verhältnis zwischen IGF-I und IGFBP3 eine Rolle in der Kanzerogenese zu spielen. Neben seinem indirekten antiapoptotischen Wirkmechanismus hemmt IGFBP3 die Zellproliferation auch IGF-unabhängig (29). IGFBP3 bindet an einen eigenen Rezeptor und induziert zum einen Caspasen, darunter Effektor Caspase 7 und Initiator Caspase 8, und reguliert zum anderen die proapoptotischen Faktoren BAX und BAD herauf, sowie die antiapoptotischen Faktoren BCL-2 und BCL-xL herunter(29). Das Resultat ist eine IGF unabhängige Apoptoseinduktion(29).

Das bereits genannte EWS/FLI-1 Fusionsgen spielt nicht nur in der Regulation des IGF-I-Signalweges, sondern auch in der Regulation von IGFBP3 eine wichtige Rolle (26). Mit Hilfe eines Luziferase-Assays in der SFT12.1 Ewing-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass dieses Fusionsprotein den IGFBP3-Promotorbindet und direkt dessen Transkription inhibiert(26). Durch das veränderte Gleichgewicht zwischen IGFBP3 und

IGF wird der antiapoptotische und proliferative Effekt an Zellen mit IGF1R verstärkt. Die in Ewing Sarkomen beobachtete EWS/FLI-1-vermittelte Verminderung der Expression von IGFBP3 konnte in der SPN nicht nachgewiesen werden(30).

1.5.3 PBK/TOPK

PDZ-binding kinase/T-LAK-cell-originated protein kinase PBK/TOPK ist eine Serin-Threonin-Kinase, die in testikulären, neuralen und embryonalen Geweben sowie in verschiedenen Neoplasien, wie hämatopoetischen Neoplasien, Mamma-Karzinomen und Melanomen, exprimiert wird (25,31). TOPK fungiert unter anderem durch die Phosphorylierung und Aktivierung von p38, einer mitogen-activated protein (MAP) Kinase, ebenfalls als MAP-Kinase (32). Die Aktivierung von p38 ist mit einer IGF-vermittelten Steigerung der Zellmotilität, mit der Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden und in Malignomen mit dem invasiven Potential assoziiert (33). Eine Reduktion der Expression von TOPK führt daher zu einer gesteigerten Empfindlichkeit der DNA gegenüber schädigenden Einflüssen(33). Da TOPK besonders während der Mitose aktiv ist und durch Aktivierung von DNA-Reparatur-Proteinen indirekt DNA-Schäden behebt, hat die Kinase eine bedeutende Rolle beim Verhindern von Tumorgenese und –progression(33). Sowohl in gesundem Gewebe, als auch in Tumorzellen konnte nachgewiesen werden, dass die TOPK-Expression durch IGF gesteigert wird(33). In Geweben mit Überexpression von IGF1R wurde eine höhere TOPK-Konzentration gemessen, verglichen mit Zellen ohne Expression von IGF1R(33).

Desweiteren hat TOPK über p53, extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) und den PI3K/AKT-Pathway Einfluss auf die neoplastische Entwicklung. Das Tumorsuppressorprotein p53, das die DNA-Reparatur aktivieren kann, kann durch TOPK gebunden und so gehemmt werden (31). Die Hemmung der Transkriptionsaktivität von p53 durch TOPK führt zu einer Reduktion des proapoptotisch wirkenden p21 und zur Steigerung des antiapoptotischen Bcl-xL(31). In Zellen mit unterdrückter TOPK-Expression wurde eine p53/p21 abhängige Verlangsamung der Zellteilung sowie eine gesteigerte Apoptoserate nachgewiesen(31). Da TOPK über verschiedene Wege die Expression von p21 und p27 vermindern kann und in der SPN sowohl eine gesteigerte Expression von p21 und p27, als auch eine signifikant verminderte Expression von TOPK nachgewiesen wurde, könnte die

gutartige Klinik der SPN auf eine niedrige Expression von TOPK zurückgeführt werden(6,30,31,34,35).

Ebenso wie für IGFBP3 konnte auch für TOPK eine Regulation durch das EWS/FLI-1 Fusionsprotein nachgewiesen werden(25). Durch die Bindung von EWS/FLI-1 an den TOPK-Promotor kann dieser aktiviert werden und steigert so die Expression von TOPK(25).

1.5.4 BCL9L

B-cell CLL/lymphoma 9-like (kurz BCL9L) kodiert für ein Protein, das die Transkriptionsaktivität von β -Catenin steigert(36). Es konnte bereits eine physische Interaktion zwischen β -Catenin und BCL9L nachgewiesen werden (36). Immunhistochemisch wurde nachgewiesen, dass sich β -Catenin ohne BCL9L gleichmäßig in der Zelle verteilt(36). Die Zugabe von BCL9L führte zu einer Konzentration von sowohl β -Catenin als auch BCL9L im Nukleus (36). In einer weiteren Arbeit führte die Suppression der BCL9L-Expression durch small interfering RNA (kurz siRNA) in Kolonkarzinomzellreihen zur Reduktion des nukleären β -Catenins (37). Aufgrund der Ergebnisse beider Arbeiten wurde die Vermutung aufgestellt, dass BCL9L an der Translokation von β -Catenin in den Nukleus beteiligt sein könnte (36,37).

In Human Embryonic Kidney Cells (kurz HEK) konnte gezeigt werden, dass BCL9L die β -Catenin abhängige Transkription vervielfachen kann (37). Desweiteren konnte durch Stimulation des WNT/ β -Catenin Pathways auch die Transkription von BCL9L gesteigert werden(38). Innerhalb des WNT/ β -Catenin Pathways hat BCL9L also sowohl die Funktion eines Zielgens als auch eines Verstärkers der Transkription(38). Daher wird vermutet, dass es zumindest in Kolonkarzinomen zu einer positiven Rückkopplung und darauf folgender Hyperaktivierung des WNT/ β -Catenin Pathways kommt (38).

In Zellreihen mit (Kolonkarzinomzellen) und ohne (Myelomzellen) veränderten WNT/ β -Catenin-Pathway konnte gezeigt werden, dass die Expression des verwandten BCL9 sowohl die β -Catenin vermittelte Transkription von Zielgenen des WNT/ β -Catenin-Signalweges als auch die Proliferation der untersuchten Zellreihen steigerte(39). Außerdem konnte ein gesteigertes Migrations- sowie invasives Potential beobachtet werden (39). In einem Xenograft-Modell mit besagten Kolonkarzinom- und

Myelomzellen führte die Suppression von BCL9 zu einem gesteigerten Überleben der behandelten Mäuse sowie zu einer reduzierten Metastasierungsrate der Tumoren(39).

In einem weiteren Versuchsmodell wurde BCL9 aus dem Komplex mit β -Catenin verdrängt (40). Mit einem WNT-spezifischen Reporter-Assay konnte daraufhin eine Reduktion der WNT-induzierten Transkriptionsaktivität gezeigt werden (40). Die Unterbindung der Interaktion hatte außerdem zur Folge, dass die Proliferation in den untersuchten Zellreihen abnahm (40). Auch in Xenograft-Modellen konnte eine Reduktion von Tumorwachstum, Angiogenese und Invasivität der Tumorzellen nachgewiesen werden (40). Aufgrund der Verwandtschaft zu BCL9 könnte das hier untersuchte BCL9L ein ähnliches onkogenes Potential besitzen.

Kapitel 2: Fragestellung

In dieser Arbeit sollen in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, der intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas die Expression von Fli-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L im Vergleich zum gesunden Pankreasgewebe, untersucht werden. Ziel dieser Arbeit ist die Erstellung eines Expressionsprofils der untersuchten Gene in den verschiedenen Neoplasien.

Auftretende Unterschiede beim Vergleich der Expressionsprofile der verschiedenen Entitäten miteinander sollen Aufschluss über die veränderten Signalwege in den untersuchten Neoplasien geben.

Hierdurch sollen Rückschlüsse auf die molekulargenetischen Grundlagen gezogen werden, die die unterschiedliche Dignität der Entitäten bedingen. Außerdem soll der Zusammenhang zwischen dem Wnt/ β -catenin Pathway und den untersuchten Genen diskutiert werden.

Kapitel 3: Methoden und Materialien

3.1 Patientenauswahl

Für die Arbeit wurden 11 Proben mit Normalgewebe, 18 Proben mit SPN-Tumorgewebe, 12 Proben mit Duktalem Adenokarzinom und 12 Proben mit IPMN des Pankreas verwendet. Die Gewebeproben kamen aus dem Archiv des ehemaligen Direktors des Pathologischen Instituts der Uniklinik Kiel (Prof. Dr. G. Klöppel) und dem Archiv des Instituts für Hämatopathologie Hamburg und entstammten den Jahrgängen 2005 bis 2013 (Tumorgewebe) bzw. 2006-2010 (Normalgewebe).

Als Tumorgewebe wurde ausschließlich Pankreasgewebe mit einem Anteil an den untersuchten Tumorentitäten von mindestens 50% ausgewählt. Proben mit Infiltration durch andere Tumoren oder Inflammationsreaktionen wurden nicht verwendet. Es wurden jüngere Proben (ab 2005) ausgewählt, da das in älteren Proben verwendete ungepufferte Paraffin zu einer stärkeren Degradation der RNA führte.

Bei dem verwendeten gesunden Pankreasgewebe wurde ebenfalls darauf geachtet, dass keine Infiltrationen durch andere Tumoren oder Entzündungen vorlagen und die Paraffinblöcke nicht zu alt waren.

Als Kontrollproben für die qualitative RNA-Analyse wurde aus überschüssigem Blut extrahierte RNA aus dem allgemeinen Eingang verwendet, da RNA in Blut leicht nachweisbar ist.

3.2 Material

3.2.1 Chemikalien/Sonstiges

Ethanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
RNase freies Wasser	Ambionlife Technologies, Carlsbad, Californien, USA
Xylol p.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Biosphere Filterspitzen 100, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf Research Pipetten 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten 0,5-10µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten 10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg
Feather Standard Scalpel	pfmmedical, Köln
Filterspitzen 10µl	Starlab, Hamburg
Membranslides für Lasermikrodissektion	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
MicroAmp Optical 8-Cap Strip	Applied Biosystems life Technologies, Carlsbad, Californien, USA
MicroAmp Optical 8-Tube Strip 0,2 ml	Applied Biosystems life Technologies, Carlsbad, Californien, USA
Multiply Pro Gefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Safe Seal Gefäß 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht

3.2.3 RT-PCR-Primer, -Sonden

Primer	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin
Sonden	Applied Biosystems lifetechnologies, Carlsbad, Californien, USA

3.2.4 Komplett-Systeme (Kits)

OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
--------------------	----------------

QuantiTect Probe RT-PCR Kit Qiagen, Hilden

RNeasy FFPE-Kit Qiagen, Hilden

3.2.5 Geräte

Genetic Analyzer 3130 Applied Biosystems life Technologies, Carlsbad, Californien, USA

HarmonyVortex Mixer VTX-3000L medigene, Puchong, Selangor DE, Malaysia

Hettich Mikro200 Zentrifuge Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

Lineares Färbegerät Leica ST4040 Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Laser Microdissection System LMD6500 Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

StepOne Real-Time PCR System Applied Biosystems life Technologies, Carlsbad, Californien, USA

Thermal Cycler 2720 Applied Biosystems life Technologies, Carlsbad, Californien, USA

Thermomixer compact Eppendorf, Hamburg

3.2.6 Software

Mendeley Version 1.7 Mendeley Ltd., London, UK

Microsoft Excel 2007 Microsoft, Redmond, USA

3.3 Methoden

3.3.1 Manuelle Mikrodissektion

Die manuelle Mikrodissektion diente dazu, das Tumorgewebe in ausreichender Reinheit von dem Normalgewebe zu trennen. Von den formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Präparateblöcken wurden vier Serienschritte angefertigt, die je fünf µm dick waren, und anschließend einer der Schnitte im linearen Färbegerät Leica ST4040 von Leica Microsystems mit Hämatoxylin/Eosin (HE) nach Mayer angefärbt (Hämalaun nach Mayer, Eosin 1%). In dem angefärbten Schnitt wurde von einem Pathologen mithilfe eines Lichtmikroskopes nach dem veränderten Gewebe der SPN gesucht und dieses mit einem Permanent-Marker eingekreist. Der so markierte Schnitt wurde als Schablone genutzt und unter die ungefärbten Schnitte gelegt. Entlang der Markierung konnte aus den ungefärbten Schnitten das Gewebe herausgetrennt werden. Dazu wurde ein rundes Skalpell verwendet, womit die Konturen der Schablone auf dem ungefärbten Schnitt nachgefahren wurden. Anschließend wurde das betroffene Gewebe in 1,5 ml große Reaktionsgefäße mittels des Skapells übertragen.

3.3.1 Laser-Mikrodissektion

Die Laser-Mikrodissektion diente dazu Tumorgewebe zu isolieren, das in den Präparaten ein zu kleines Areal für eine gezielte manuelle Mikrodissektion bot. Dazu wurden Serienschritte der in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcke angefertigt und eingefroren. Diese wurden auf für die Lasermikrodissektion geeignete Leica Membran-Objektträger aufgezogen, in Ethanol fixiert und nach Mayer gefärbt. Anschließend wurden sie in Wasser und Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Eine Schablone wurde wie auch für die manuelle Mikrodissektion hergestellt. Das gesuchte Gewebe wurde auf den Membranen unter 10-facher Vergrößerung markiert und geschnitten. Das so isolierte Material wurde in Reaktionsgefäßen aufgefangen.

3.3.2 Entparaffinierung aus Paraffinblöcken

Um die RNA aus den Proben analysieren zu können, musste das Gewebe zunächst von Paraffin befreit werden.

Zu diesem Zweck wurden 950 µl Xylol in die Reaktionsgefäße mit dem ausgekratzten Gewebe gegeben, die Gefäße zehn Sekunden lang gevortext, fünf Minuten bei 20-25°C

mit 19.000xg zentrifugiert und der Überstand durch vorsichtiges Pipettieren mit einer 100µl Pipette abgetragen und verworfen.

Zur Entfernung des Xylols aus dem Gewebe wurden danach zwei Waschschriffe durchgeführt. In beiden Waschschriffen wurden 950 µl 100%iges Ethanol in die Reaktionsgefäße pipettiert, der Inhalt zehn Sekunden lang gevortext, fünf Minuten bei 20-25°C mit 19.000xg zentrifugiert und der Überstand durch vorsichtiges Pipettieren mit einer 100µl Pipette abgetragen und verworfen.

Die Pellets wurden 20 Minuten lang bei 40°C und offenem Deckel im Thermomixer compact der Firma Eppendorf getrocknet.

Damit die RNA, die bisher in Paraffin konserviert war, durch den Kontakt mit RNasen aus der Luft nicht degradiert wird, wurden die Proben nach der Entparaffinierung bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.3.3 Isolierung genomischer RNA aus Gewebe

Zur Isolierung der RNA aus dem entparaffinierten Gewebe mithilfe des RNeasy FFPE-Kits (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (tissue)) von Qiagen wurden die Pellets mit 150µl PKD-Puffer und zur Verdauung der Proteine mit 10 µl Proteinase K versetzt. Die Proben wurden mit Hilfe des Vortex gemischt und anschließend 1 Stunde lang bei 55°C im Thermomixer compact der Firma Eppendorf gerüttelt und inkubiert. Zur Reduktion der Formaldehyd-Modifikation von Nukleinsäuren wurden die inkubierten Proben für 15 Minuten bei 80°C in einem Wasserbad erhitzt, kurz zentrifugiert und anschließend mit 320 µl RBC-Puffer, ebenfalls im Kit enthalten, versetzt. Das Lysat wurde mit einer Pipette gut gemischt und auf eine gDNA-Eliminator-Spinsäule gegeben, die in einem 2 ml Sammelröhrchen steckte. Die Proben wurden 30 Sekunden lang bei 8.000xg zentrifugiert, dem Durchfluss mit einer Pipette 720 µl 100%iges Ethanol untergemischt und das Gemisch auf eine RNeasyMinEluteSpinsäule gegeben. Diese wurde für 15 Sekunden bei 8000xg zentrifugiert. Anschließend wurde die Membran mit der daran gebundenen RNA gewaschen. Zuerst wurden in zwei Durchläufen je 500 µl RPE-Puffer in die RNeasyMinEluteSpinsäule gegeben. Die Probe wurde 15 Sekunden lang bei 8000xg zentrifugiert. Danach wurden 500 µl 80%iges Ethanol zu der RNeasyMinEluteSpinsäule gegeben. Die Probe wurde 15 Sekunden lang bei 8000xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die RNeasyMinEluteSpinsäule vorsichtig aus dem Reaktionsgefäß entfernt, so dass die Säule keinen Kontakt mit dem Durchfluss

bekam und kein Ethanol verschleppt wurde, und in eine neues Reaktionsgefäß gesteckt. Anschließend wurde das Gefäß zum Trocknen 5 Minuten lang bei voller Geschwindigkeit und mit offenem Deckel zentrifugiert. 30 µl RNase freies Wasser direkt auf die Spinsäulenmembran gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit befand sich die RNA im Eluat.

3.3.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Um eine Aussage über die vorhandene Menge an RNA in dem untersuchten Gewebe zu erhalten wurde nun eine Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) mit der isolierten RNA durchgeführt. Die Polymerase Kettenreaktion wird genutzt um DNA zu vervielfältigen. Man unterscheidet eine DNA-PCR von einer Reverse Transkriptase-PCR, die mit RNA als Ausgangsmaterial durchgeführt wird. Beide können sowohl qualitativ als auch quantitativ durchgeführt werden.

3.3.4.1 Kontrolle des Probengewebes auf Integrität

Zur Kontrolle des zu untersuchenden Probengewebes wurde das Housekeepinggen HPRT verwendet, das sich in der Länge dessen PCR-Produktes (135 bp) nur geringfügig von der Länge der nachzuweisenden PCR-Produkte von Fli-1 (127 bp), IGFBP3 (110 bp), TOPK (156 bp) und BCL9L (136 bp) unterscheidet. Das in der Fragmentanalyse zu erreichende Signal wurde auf eine Mindestintensität von 1000 AU festgelegt. Ein positiver Nachweis bildete sich durch eine eindeutige Signalbande ausreichender Stärke in der richtigen Länge von 135 bp ohne unspezifische zusätzliche Banden ab.

3.3.4.2 Ansatz und Durchführung der qualitativen PCR

Um sicher zu stellen, dass trotz der Formalinfixierung der Paraffinblöcke noch ausreichend intakte RNA für die quantitative Analyse im Eluat der RNA-Isolierung vorhanden war, wurde eine RT-PCR des Housekeeping-Gens Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) mit anschließender Fragmentanalyse durchgeführt. HPRT ist als Housekeeping-Gen essenziell für den Zellstoffwechsel. Durch die Länge des PCR-Produktes und die niedrige Genexpression eignet es sich als empfindlicher Nachweisparameter für die Qualität der RNA in unseren Gewebe-Proben. Zur Amplifikation der HPRT-RNA wurde das OneStep RT-PCR Kit von Qiagen verwendet. Um Fehler frühzeitig zu erkennen wurde bei jeder PCR sowohl eine Positiv- als auch

eine Negativkontrolle durchgeführt, wobei die Positivkontrolle aufgrund der leicht nachweisbaren RNA mit Patientenblut angesetzt wurde.

Primer	Sequenz
hprtfor:	CTC ATG GAC TAA TTA TGG ACA G
hprtrev:	TGA TGT AAT CCA GCA GGT CAG

Tabelle 1: Verwendete Primer

Schritt	Durchführung
Master Mix (pro Probe)	7,8 µl RNase freies Wasser 4,0 µl 5xPuffer 4,0 µl Q-Solution 0,8 µl 10 mM dNTPs 0,8 µl hprt forward Primer 0,8 µl hprt reverse Primer 0,8 µl Enzym-Mix (Taq-Polymerase, Reverse Transkriptase)
Markierung	des reversen Primers mit 6-FAM, einem fluoreszierenden Farbstoff
Versuchsansatz	Mischen von 19 µl Master-Mix und 1µl der zu untersuchenden RNA
Amplifikation	Im Thermal Cycler von Applied Biosystems
Fragmentanalyse	Im Genetic Analyzer von Applied Biosystems

Tabelle 2: Qualitative PCR

Zyklen	1		45			1	
	(Reverse Transkription)		(Denaturierung, Hybridisierung, Elongation)				
°C	50	95	95	60	72	72	10
Min	30:00	15:00	00:15	00:30	00:30	5:00	∞

Tabelle 3: PCR-Programm des Thermal Cycler

Alle Proben, die ein Signal zeigten, wurden weiter verwendet.

3.3.4.3 Quantitative Real-Time-PCR

Mit der quantitativen Real-Time-PCR wird die Menge an neu gebildeter RNA bereits während der PCR gemessen. Dies geschieht mithilfe von TaqMan-Sonden. Diese Oligonukleotid-Sonden hybridisieren an die DNA und besitzen sowohl einen Reporterfarbstoff, der am 5'-Ende angebracht ist, als auch einen Quencher, der am 3'-Ende sitzt. Der Quencher unterdrückt abgestrahlte Fluoreszenz von Reportern in seiner Nähe, solange die Sonde intakt ist. Das geschieht durch den sogenannten Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET; Förster-Resonanz, Förster, V.T. 1948). Durch die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase wird die Sonde während der Extension gespalten. Dadurch werden Reporterfarbstoff und Quencher voneinander getrennt. Das Fluoreszenzsignal des Reporters steigt an und die Sonde wird von der Zielsequenz gespalten. Da mit jedem Zyklus mehr Reportermoleküle von ihren Quenchern getrennt werden steigt die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge der produzierten Ziel-DNA. Je größer die anfängliche Kopienzahl der Zielsequenz ist, desto früher ist eine Verstärkung der Fluoreszenz festzustellen. Somit ist diese Methode sowohl spezifisch für die untersuchte Sequenz als auch genau, da zu jeder Zeit die Fluoreszenz gemessen und dadurch ein Rückschluss auf die DNA-Menge gezogen werden kann.

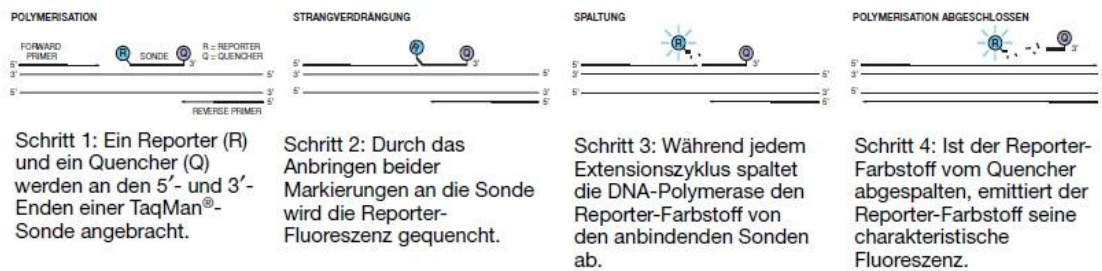


Abbildung 1: Funktionsweise der TaqMan-Reagenzien (Applied Biosystems, n.d.)

3.3.4.4 Kontrolle der Sonden

Mithilfe der validierten Primer wurden die Sonden in einer qRT-PCR auf Sensitivität und Spezifität für die jeweiligen Gene geprüft. Für jede untersuchte Sonde zeigten sich eine gleichmäßig verlaufende Signalkurven mit ungebrochenem sigmoidalen und steilen Anstieg, welche die Funktionalität bestätigte.

3.3.4.5 Ansatz und Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR

Zur quantitativen Bestimmung der RNA-Expression von FLI-1, TOPK, IGFBP3 und BCL9L wurde eine quantitative RT-PCR mithilfe des QuantiTect Probe RT-PCR Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.

Schritt	Durchführung
Master-Mix (pro Probe)	4,8 µl RNase freies H ₂ O 10 µl mitgelieferter Mix aus dem QuantiTect Probe RT-PCR Kit (HotStarTaq DNA Polymerase, QuantiTect Probe RT-PCR Buffer, ROX passive referencedye, dNTP Mix und MgCl ₂) 1 µl forward Primer 1 µl reverse Primer 1 µl MGB-Sonde (FAM) 0,2 µl Enzymen (Reverse Trankriptase und DNA-Polymerase)
Ansatz (doppelt je Probe)	18 µl Master-Mix mit 2 µl RNA
Zu jedem Ansatz	Positiv-Kontrolle mit Patientenblut Negativ-Kontrolle mit H ₂ O

Tabelle 4: Quantitative PCR

Die quantitative Analyse wurde im StepOne von Applied Biosystems durchgeführt.

Folgende Primer wurden verwendet:

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Sonde
GAPDH	TTT GGT ATC GTG GAA GGA CTC	GAA CAT CAT CCC TGC CTC TAC	CAT GCC ATC ACT GCC
FLI-1	CCA GAT CCG TAT CAG ATC CTG	CAA CGC CAG CTG TAT CAC CT	CAG ATC CAG CTG TGG CAA
IGFBP3	ACT ACG AGT CTC AGA GCA CAG	GAC ACA CTG AAT CAC CTG AAG	ACG GCA GGG ACC ATA
TOPK	TGT TAT TAC TGA CAA GGC AGA C	GAT GAA GCA TAC TAT GCA GCG	ATG ACT TTA TCG ATT CCA C
BCL9L	CAC AAT GCC ATC AAG ACC ATC	AGT TCA GGT GCA TCT GGC TG	TCA GAC GAC GAG CTG C

Tabelle 5: Verwendete Sonden und Primer (Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.)

Das PCR-Programm lief ab wie folgt:

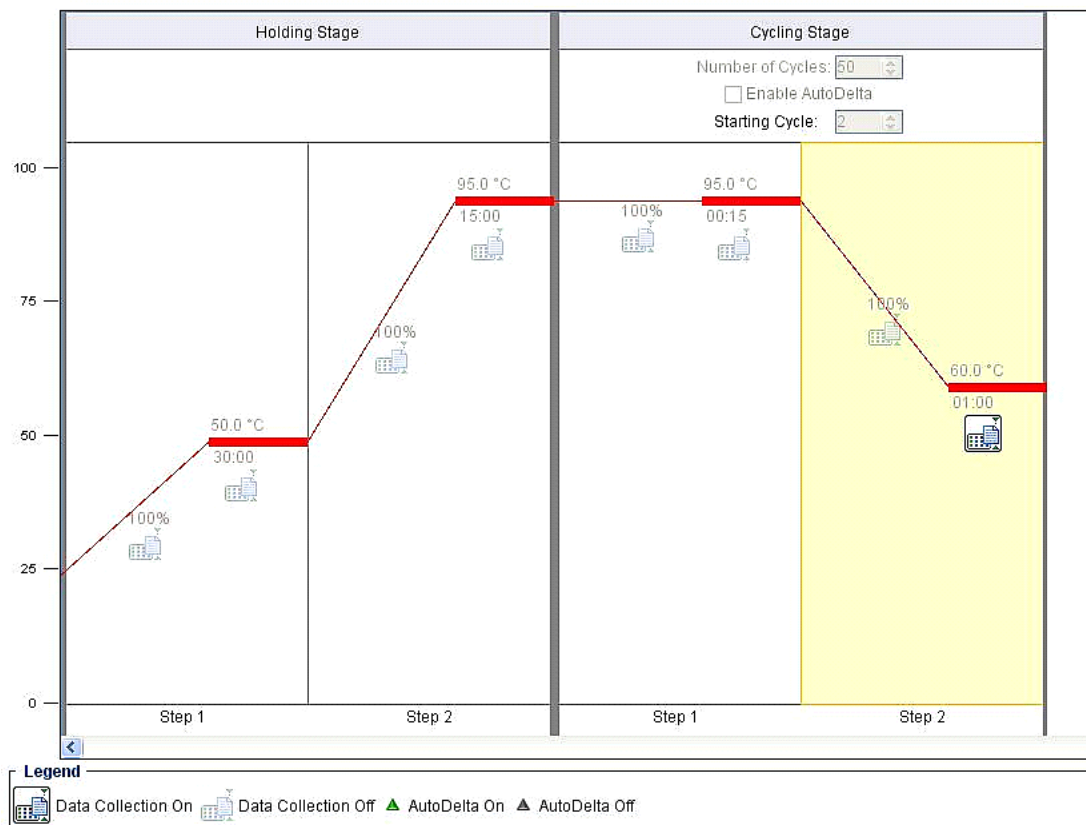


Abbildung 2: PCR-Programm des StepOne

3.3.4.6 Relative Quantifikation mittels vergleichender Ct Methode

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der untersuchten Gene mit der Expression eines Housekeeping-Gens, das als interne Referenz fungiert, normalisiert, indem die Expression beider Gene in Relation zu einander gesetzt wird. Dadurch werden unterschiedliche Ausgangsmengen der RNA in verschiedenen Geweben vergleichbar gemacht. Der Vorteil dieser Normalisierung liegt in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der Reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Housekeeping-Gen betreffen.

Als interne Referenz diente das Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Dazu wurde die Expression von GAPDH im gepoolten Normalgewebe in dreifacher Ausführung gemessen, um aus den erhaltenen Werten den mittleren in die Berechnung der Expression im Kontrollgewebe einfließen zu lassen.

Desweiteren wurde das gepoolte Normalgewebe verwendet, um die Expression jeden untersuchten Gens in je drei Ansätzen zu messen und daraus ebenfalls den mittleren Wert in die Berechnung der Expression im Kontrollgewebe einfließen zu lassen.

Bei der Durchführung der relativen Quantifikation werden Ct-Werte (Cycle threshold = Schwellenwert-Zyklus, also der Zyklus, in dem das Reportersignal einen Schwellenwert überschreitet) ermittelt, die angeben, nach wie vielen Zyklen die Fluoreszenz der Sonden erstmals die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Es wurde für jedes Gen die Messung in den verschiedenen Tumorgeweben zweimal angesetzt, um anschließend den Mittelwert in die Berechnung einfließen zu lassen. Neben einem dadurch erhaltenen Durchschnittswert konnten so Fehler in der Probenverarbeitung rechtzeitig erkannt werden.

Die Normalisierung wurde durchgeführt, indem die Differenz der Schwellenwert-Zyklen Ct für ein untersuchtes Zielgen (FLI-1, IGFBP3, TOPK oder BCL9L) zu unserem Referenzgen (siehe Formel 1) sowohl für Tumorgewebe, als auch für normales Pankreasgewebe (Normalgewebe) berechnet wurde. Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.

Formel 1: Normalisierung

$$\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$$

Normales Pankreasgewebe wurde für alle Proben als Kontrollgewebe verwendet, um einen allgemeinen Bezugspunkt für die unterschiedliche Expression der verschiedenen Gene in den SPN-Tumoren zu schaffen. Die errechneten ΔCt -Werte für Normalgewebe wurden von denen des Tumorgewebes abgezogen, um den Expressionsunterschied zu erhalten (siehe Formel 2). Zuletzt wurde, unter der Annahme einer optimalen qRT-PCR-Effizienz mit Verdopplung der DNA in jedem Zyklus, der relative Expressionsunterschied berechnet (siehe Formel 3). (41)

Formel 2: Expressionsunterschied

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct \text{ Tumorgewebe} - \Delta Ct \text{ Kontrollgewebe}$$

Formel 3: Relativer Expressionsunterschied

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ Tumorgewebe} - \Delta Ct \text{ Kontrollgewebe})}$$

3.3.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Um die Signifikanz der Messwerte zur unterschiedlichen Expression von Fli-1, TOPK, BCL9L und IGFBP3 in SPN, PDAC und IPMN im Vergleich zur Expression der Gene in gesundem Pankreasgewebe zu berechnen erfolgte eine statistische Evaluierung der Daten mittels zweiseitigem Einstichproben-t-Test (engl.: one sample t-test) und zweiseitigem Zweistichproben-t-Test (engl.: two sample t-test). Für die Durchführung des Tests wurde das Programm GraphPadPrism 5 verwendet. Es wurde ein zweiseitiger Test durchgeführt, da die Richtung der Expressionsveränderung nicht bekannt war.

Da die Ratios logarithmisch verteilt sind, für den t-Test aber eine Normalverteilung Voraussetzung ist, wurde der Logarithmus zur Basis 2 der Ratios für den Test verwendet. Dadurch ergibt sich für das Pankreas-Normalgewebe eine ratio von 0 ($=\log_2(1)$). Die Normalverteilung der Ratios wurde mittels D'Agostino-Pearson Test (Normalitätstest) überprüft, ebenfalls unter Verwendung von GraphPadPrism 5.

Um eine Verzerrung der Daten zu vermeiden wurde von jedem Patienten nur ein Wert verwendet. Lagen durch die Untersuchung mehrerer Gewebeproben (Paraffinblöcke) eines Patienten mehrere Werte (Ratios) vor, wurde der jeweilige Medianwert für die Durchführung der Test benutzt.

Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.

Kapitel 4: Ergebnisse

4.1 Quantitative Analyse

Zur Beurteilung der Expression der untersuchten Gene wurden in allen Gewebeproben quantitative PCRs für jeden Transkriptionsfaktor durchgeführt. Hierzu wurden die zuvor validierten Primer und Sonden verwendet(30). Um Messungenauigkeiten zu minimieren wurde die Expression jeden Gens in allen Gewebeproben zweifach bestimmt und der jeweilige Mittelwert zur Auswertung verwendet. Eine gemessene Genexpression von 1 entspricht der Expression im Normalgewebe. Um die inhärente Ungenauigkeit der Methode zu berücksichtigen, wurde erst eine Verdopplung der Expression als signifikanter Anstieg gewertet, während eine Halbierung der Expression als signifikante Verminderung festgelegt wurde. Diese Schwellenwerte entsprachen in der qRT-PCR-Reaktion etwa einem Unterschied von einem Zyklus.

Messergebnisse der quantitativen Analyse von SPN, DAC und IPMN:

SPN Probe	FLI-1 (2 ^{-ΔΔCt})	IGFBP3 (2 ^{-ΔΔCt})	BCL9L (2 ^{-ΔΔCt})
1	10,6	2,5	0,27
2	0,49	0,17	0,71
3	23	11	0,76
4	14	2,4	0,31
5	28	3,4	0,76
6	20,5	0,46	0,25
7	2,3	0,28	1,74
8	48,5	2,75	0,66
9	3	0,49	0,23
10	4,9	1,1	0,62
11	16,1	1,5	0,57
12	1,9	0,14	0,33
13	2,3	1	1
14	24,5	1,98	0,47
15	5,7	1,87	0,33
16	13,5	1,21	0,19
17	7,5	3,03	0,38
18	0,13	0,04	0,06

Tabelle 6: Genexpression im SPN-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/β-Catenin-Signalweg" verwendet.)

IPMN Probe	FLI-1 (2 ^{-ΔΔCt})	IGFBP3 (2 ^{-ΔΔCt})	BCL9L (2 ^{-ΔΔCt})
1	1,07	3,73	0,54
2	7,46	55,72	0,02
3	1,32	24,25	1,52
4	2,14	9,19	2,83
5	1,07	3,73	0,93
6	4,59	4,29	2,3
7	2,00	6,96	0,001
8	2,83	3,73	1,23
9	2,83	8	1,23
10	2,83	3,48	0,001
11	3,25	12,13	2
12	2,83	0,0001	0,001

Tabelle 7: Genexpression im IPMN-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/β-Catenin-Signalweg" verwendet.)

DAC Probe	FLI-1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	IGFBP 3 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	BCL9L ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	TOPK ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
1	5,66	1,74	10,56	0,05
2	1,32	25,99	5,66	2
3	2,46	51,98	0,93	2,3
4	8,57	157,59		0,35
5	0,33	2,64	0,57	1,07
6	0,76	14,93	3,73	3,48
7	1,32	19,7	5,66	1,74
8	0,81	18,38	1,41	0,03
9	1,32	48,5	1,52	1,62
10	3,25	68,59	7,46	1,87
11	4,29	17,15	19,7	1,23
12	1,32	16	0,22	1,41

Legende:

Grün: verminderte Expression

Rot: gesteigerte Expression

Weiß: im Bereich des
Normalgewebes
($>0,5$ - bis $<2,0$ -fache
Expression)

Tabelle 8: Genexpression im Pankreaskarzinom-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.)

4.1.1.1 FLI-1

Von den achtzehn untersuchten SPN-Gewebeproben lag in fünfzehn Fällen eine Überexpression von FLI-1 vor (Probe 1, 3-11, 13-17). Die Ergebnisse lagen hier zwischen 2,3- und 48,5-facher Überexpression im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe. In den Proben 2 und 18 wurde eine 0,13- bzw. 0,49-fach verminderte Expression gemessen und Probe 12 lag mit 1,9-facher Expression im Normalbereich. Die statistische Auswertung ergab eine hoch signifikante Steigerung der Expression von FLI-1 in der SPN im Vergleich zum Normalgewebe ($p(\text{FLI1}) < 0,0001$).

In fünf der zwölf untersuchten PDAC-Gewebeproben zeigte sich eine Überexpression von FLI-1 (Probe 1, 3-4, 10-11). Die Ergebnisse lagen hier zwischen 2,46- und 8,57-facher Überexpression im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe. In Probe 5 wurde eine 0,33-fach verminderte Expression gemessen. Eine Expression im Normalbereich fand sich in sechs Fällen (Probe 2, 6-9, 12). Die Werte lagen hier im Bereich von 0,76- bis 1,32-facher Expression im Vergleich zum Normalgewebe. Die statistische Auswertung ergab keine signifikante Expressionsveränderung von FLI-1 im PDAC im Vergleich zum Normalgewebe ($p=0,078$).

Bei neun der zwölf IPMN-Gewebeproben in denen die RNA-Expression von FLI-1 gemessen wurde, lag eine Überexpression vor (Probe 2, 4, 6-12). Die Ergebnisse lagen zwischen 2,00- und 7,46-facher Überexpression im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe. In drei Fällen (Probe 1, 3, 5) wurde eine unveränderte Expression mit Werten von 1,07- bis 1,32-facher Expression im Vergleich zum gesunden Pankreasgewebe gemessen. Eine verminderte Expression wurde nicht detektiert. Für die Expressionsabweichung von Fli-1 in der IPMN ergab sich eine hoch signifikante Steigerung im Vergleich zum Normalgewebe ($p=0,0006$).

Somit lag in 83,33% der untersuchten SPN-, 41,67% der PDAC- und 75,00% der IPMN-Fälle eine Überexpression vor. In 55,56% der SPN-, 50,00% der PDAC- und 25,00% der IPMN-Proben lag die Expression im Bereich des Normalgewebes. 11,11% der SPN- und 8,33% der PDAC-Fälle zeigten eine verminderte Expression, während sich in den IPMN-Proben keine verminderte Expression nachweisen ließ.

Es zeigte sich eine signifikante Expressionssteigerung von FLI1 in der SPN im Vergleich zur IPMN ($p=0,047$). Desweiteren zeigte sich eine signifikante Expressionssteigerung von FLI-1 in der SPN im Vergleich zum PDAC ($p=0,015$). In Bezug auf FLI1 zeigte sich kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen der IPMN und dem PDAC ($p=0,35$).

Im Vergleich zum Normalgewebe zeigte sich eine hoch signifikante Expressionssteigerung in der SPN ($p<0,0001$) sowie in der IPMN ($p=0,0006$). Im PDAC zeigte sich keine signifikante Änderung der Expression von FLI1 ($p=0,078$).

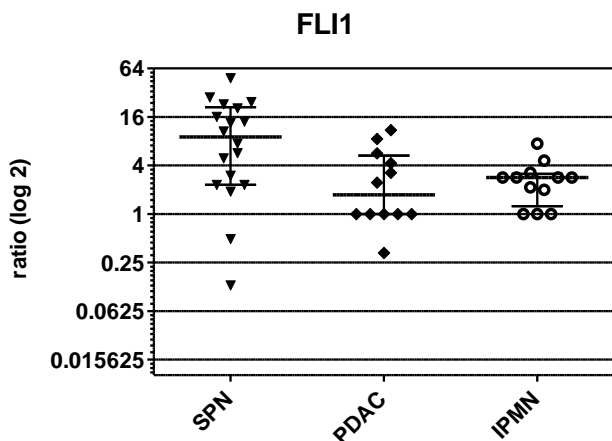


Abbildung 3: Scatterplot der Genexpression von FLI1 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nach Herstellung einer Normalverteilung (Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.)

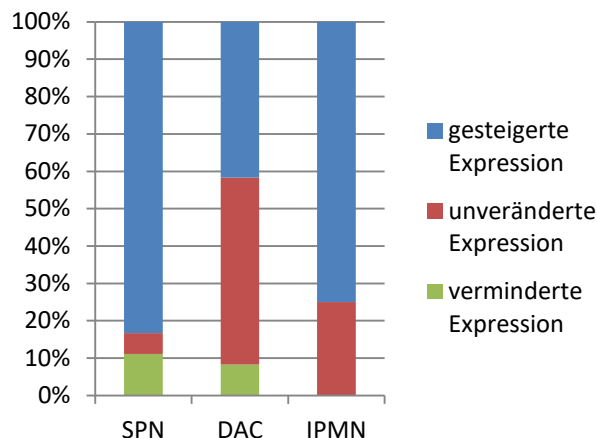


Abbildung 4: Säulendiagramm der Expressionsverhältnisse von FLI1 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.)

Wie der Scatterplot in Abb. 3 zeigt, lagen sowohl die größte Schwankung der Messwerte als auch die höchsten gemessenen Werte in der SPN. Die geringsten Schwankungen lagen in der IPMN vor. Im Säulendiagramm in Abb. 4 sieht man, dass vor allem in SPN und IPMN die Fälle mit einer Überexpression von FLI-1 überwiegen.

Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.

4.1.1.2 IGFBP3

Von den achtzehn untersuchten SPN-Gewebeproben lag bei einem Drittel der Fälle (Probe 2, 6, 7, 9, 12, 18) eine verminderte Expression von IGFBP3 mit Werten von

0,04- bis 0,49-facher Expression vor. Eine Überexpression wurde in einem weiteren Drittel der Fälle Fällen (Probe 1, 3-5, 8, 17) detektiert. Die Ergebnisse zeigten hier 2,4- bis 11,00-fache Überexpression im Vergleich zu gesundem Gewebe. Im letzten Drittel der Fälle (Probe 10-11, 13-16) lag die Expression im Bereich des Normalgewebes. Die statistische Auswertung ergab allerdings keine signifikante Veränderung der Expression im Vergleich zum Normalgewebe ($p=0,98$).

Von den zwölf untersuchten PDAC-Gewebeproben, in denen die Expression von IGFBP3 gemessen wurde, lag bei elf Fällen (Probe 2-12) eine gesteigerte Expression mit Werten von 2,64- bis 157,59-facher Expression vor. Eine unveränderte Expression im Vergleich zum Normalgewebe mit einem Wert von 1,74 fand sich ausschließlich in Probe 1. Eine verminderte Expression wurde nicht registriert. Die statistische Auswertung ergab eine hochsignifikante Expressionssteigerung im Vergleich zum Normalgewebe ($p<0,0001$).

Von den zwölf IPMN-Gewebeproben, in denen die Expression von IGFBP3 gemessen wurde, lag bei elf Fällen (Probe 1-11) eine gesteigerte Expression mit Werten von 3- bis 55,72-facher Expression vor. Eine verminderte Expression zeigte sich in Probe 12 mit einem Wert von 0,0001-facher Expression. Eine unveränderte Expression im Vergleich zum Normalgewebe wurde nicht detektiert. Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Steigerung der Expression im Vergleich zum Normalgewebe ($p=0,022$).

Somit lag in 33,33% der untersuchten SPN-, 91,17% der PDAC- und 91,17% der IPMN-Fälle eine Überexpression vor. In 33,33% der SPN- und 8,33% der PDAC-Proben lag die Expression im Bereich des Normalgewebes, während es keinen IPMN-Fall mit unveränderter Expression gab. 33,33% der SPN- und 8,33% der IPMN-Fälle zeigten eine verminderte Expression, während sich in den PDAC-Proben keine verminderte Expression nachweisen ließ.

Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression von IGFBP3 in der IPMN im Vergleich zur SPN ($p=0,0175$). Desweiteren zeigte sich eine hoch signifikante Steigerung der Expression von IGFBP3 im PDAC im Vergleich zur SPN ($p<0,0001$). Für die Expression von IGFBP3 zeigte sich auch eine signifikante Expressionssteigerung im PDAC im Vergleich zur IPMN ($p=0,042$).

Im Vergleich zum Normalgewebe zeigte sich eine hoch signifikante Expressionssteigerung im PDAC ($P<0,0001$) sowie eine signifikante

Expressionssteigerung in der IPMN ($p=0,022$). In der SPN zeigte sich keine signifikante Expressionsveränderung ($p=0,98$).

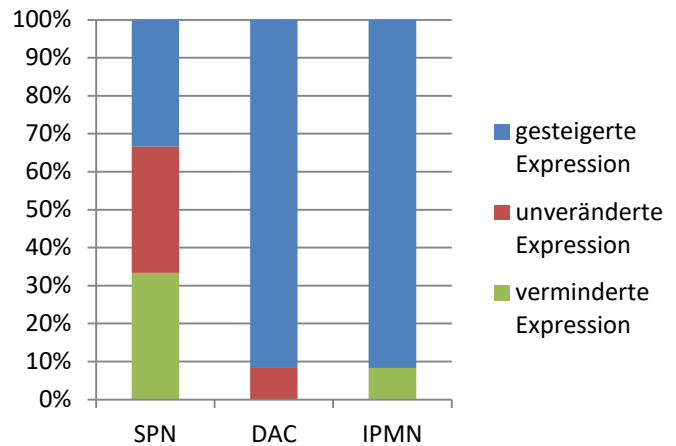
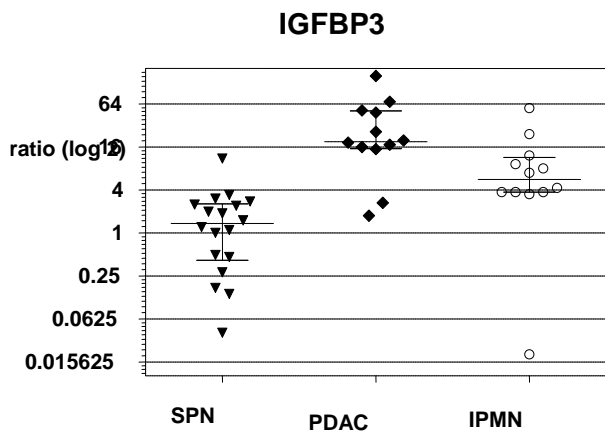


Abbildung 5: Scatterplot der Genexpression von IGFBP3 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nach Herstellung einer Normalverteilung
Abbildung 6: Säulendiagramm der Expressionsverhältnisse von IGFBP3 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe

Wie der Scatterplot in Abb. 5 zeigt lag die größte Schwankung der Messwerte in der IPMN und die höchsten Werte in der PDAC vor. Im Säulendiagramm in Abb. 6 sieht man, dass in PDAC und IPMN die gesteigerte Expression von IGFBP3 gegenüber den anderen beiden Gruppen überwiegt, während Über-, unveränderte und verminderte Expression in der SPN ausgewogen sind.

4.1.1.3 BCL9L

Von den achtzehn untersuchten SPN-Gewebeproben, in denen die Expression von BCL9L gemessen wurde, lag in zehn Fällen (Probe 1, 4, 6, 9, 12, 14-18) eine verminderte Expression mit Werten von 0,06- bis 0,47-facher Expression vor. In den restlichen acht Proben (Probe 2-3, 5, 7-8, 10-11, 13) lag die Expression im Bereich des Normalgewebes. Eine Überexpression wurde nicht detektiert. Die statistische Auswertung ergab eine hochsignifikante Verminderung der Expression im Vergleich zum Normalgewebe ($p=0,0005$).

Von den zwölf untersuchten PDAC-Gewebeproben, in denen die Expression von BCL9L gemessen wurde, lag in sechs Fällen (Probe 1-2, 6-7, 10-11) eine gesteigerte Expression mit Werten von 3,73- bis 19,7-facher Expression vor. Eine unveränderte Expression wurde in vier Fällen (Probe 3, 5, 8-9) mit Werten von 0,57- bis 1,52-facher

Expression detektiert. In einem Fall (Probe 12) lag eine verminderte Expression vor. Probe 4 konnte aus Mangel an Gewebe nicht in die Berechnungen einfließen. Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Steigerung der Expression ($p=0,04$).

Von den zwölf untersuchten IPMN-Gewebeproben, in denen die Expression von BCL9L gemessen wurde, lag in drei Fällen (Probe 4, 6, 11) eine gesteigerte Expression mit Werten von 2,0 bis 2,83-facher Expression vor. Eine unveränderte Expression zeigte sich in fünf Fällen (Probe 1, 3, 5, 8-9) mit Werten zwischen 0,54 und 1,52 vor. Eine verminderte Expression lag in vier Fällen (Probe 2, 7, 10, 12) mit Werten von 0,001- bis 0,02-facher Expression vor. Die statistische Auswertung ergab keine signifikante Änderung der Expression im Vergleich zum Normalgewebe ($p=0,08$).

Somit lag in 50,0% der PDAC- und 25,0% der IPMN-Fälle eine Überexpression vor. In der SPN konnte keine Überexpression gemessen werden. In 44,44% der SPN-, 33,33% der PDAC- und 41,67% der IPMN-Proben lag die Expression im Bereich des Normalgewebes. 55,55% der SPN-, 83,33% der PDAC- und 33,33% der IPMN-Fälle zeigten eine verminderte Expression.

Es zeigte sich keine signifikante Expressionsveränderung für BCL9L in der SPN im Vergleich zur IPMN ($p=0,24$). Desweiteren zeigte sich eine hoch signifikante Steigerung der Expression von BCL9L im PDAC im Vergleich zur SPN ($p=0,0001$), sowie eine signifikante Verminderung der Expression von BCL9L in der IPMN im Vergleich zur PDAC ($p=0,02$).

Im Vergleich zum Normalgewebe zeigte sich eine hoch signifikante Verminderung der Expression in der SPN ($p=0,0005$), sowie eine signifikante Expressionssteigerung im PDAC ($p=0,04$). In der IPMN zeigte sich keine signifikante Expressionsveränderung ($p=0,08$).

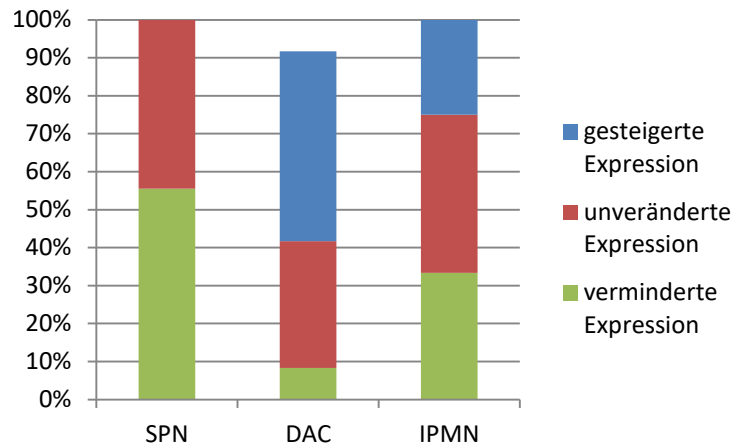
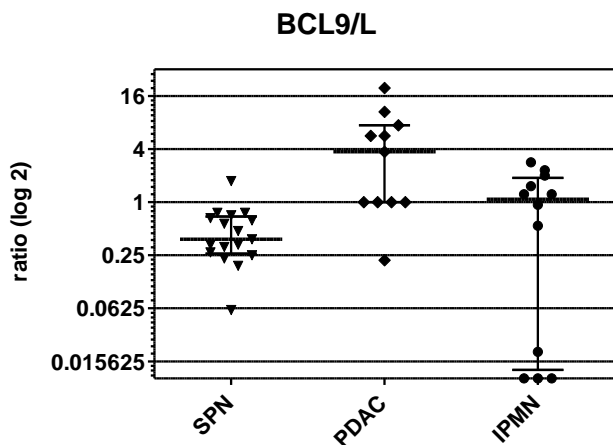


Abbildung 7: Scatterplot der Genexpression von IGFBP3 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nach Herstellung einer Normalverteilung

Abbildung 8: Säulendiagramm der Expressionsverhältnisse von BCL9/L im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe

Wie der Scatterplot in Abb. 7 zeigt lag die größte Schwankung der Messwerte in der IPMN und die höchsten Werte in der PDAC vor. Im Säulendiagramm in Abb. 8 sieht man, dass in der IPMN ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Über-, unveränderter und verminderter Expression besteht, während in PDAC kaum eine verminderte und in SPN keine gesteigerte Expression nachgewiesen werden konnte.

4.1.1.4 TOPK

Es wurden desweiteren Messungen für die Expression von TOPK in der SPN, PDAC und IPMN durchgeführt. Allerdings ist dieses Gen nur schwach in der Pankreas exprimiert. Daher waren die Messwerte nicht detektierbar oder lagen im Grenzbereich der Sensitivität des verwendeten Gerätes. Eine quantitative Analyse der Werte war daher nicht möglich.

4.2 Korrelation der berechneten Ergebnisse

Um eine Aussage über die Beziehungen der verschiedenen Gene untereinander innerhalb eines Tumors treffen zu können, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Voraussetzung hierfür war die Normalverteilung der Werte, die zuvor durch den Logarithmus zur Basis 2 hergestellt und mit dem D`Agostino-Pearson Test bestätigt wurde.

4.2.1.1 Korrelation und deren Signifikanzniveau in der SPN

Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten ergab eine hoch signifikant positive Korrelation zwischen IGFBP3 und FLI1 (Korrelationskoeffizient=0,8416; $p < 0,0001$). Zwischen FLI1 und BCL9L (Korrelationskoeffizient=0,4023) bzw. IGFBP3 und BCL9L (Korrelationskoeffizient=0,4522) wurde keine signifikante Korrelation gefunden. Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.

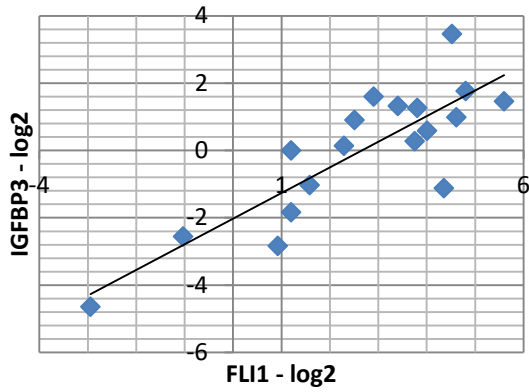


Abbildung 9: Korrelation von IGFBP3 und FLI1 in der SPN (Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktaalen Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.)

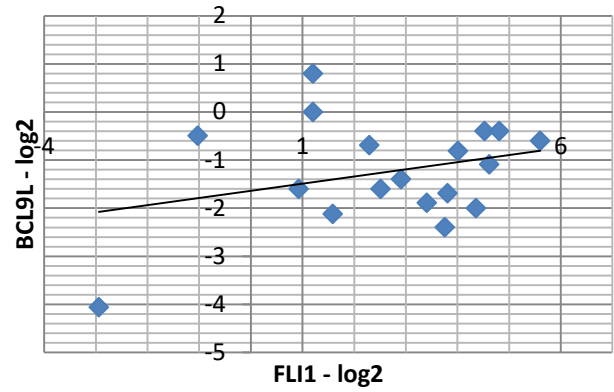


Abbildung 10: Korrelation von BCL9L und FLI1 in der SPN (Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktaalen Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.)

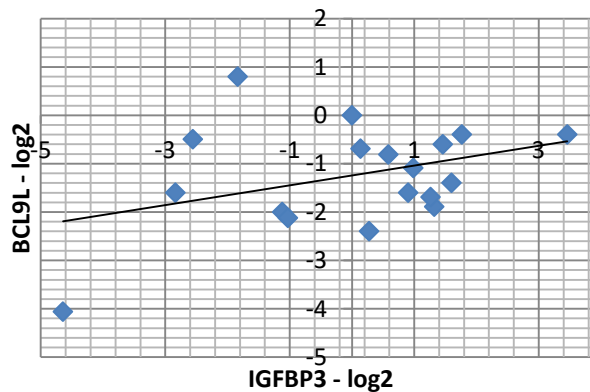


Abbildung 11: Korrelation von BCL9L und IGFBP3 in der SPN

4.2.1.2 Korrelation und deren Signifikanzniveau im PDAC

Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten ergab eine signifikant positive Korrelation zwischen FLI1 und BCL9L (Korrelationskoeffizient=0,6256; p=0,0395). Für die Beziehung zwischen FLI1 und IGFBP3 (Korrelationskoeffizient=0,3394) bzw. IGFBP3 und BCL9L (Korrelationskoeffizient=-0,0981) wurde keine signifikante Korrelation gefunden. Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.

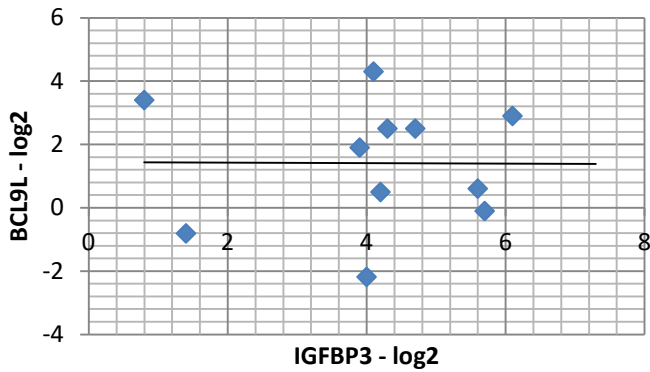


Abbildung 12: Korrelation von BCL9L und IGFBP3 im PDAC

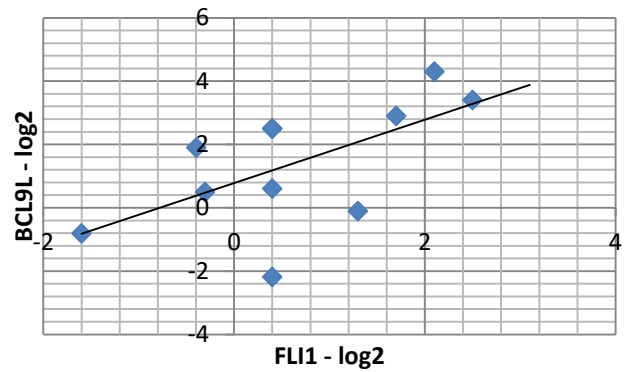


Abbildung 13: Korrelation von BCL9L und FLI1 im PDAC (Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.)

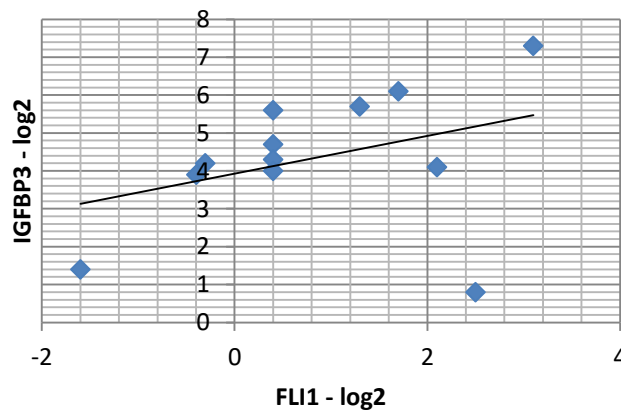


Abbildung 14: Korrelation von IGFBP3 und FLI1 im PDAC (Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.)

4.2.1.3 Korrelation und deren Signifikanzniveau in der IPMN

Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten ergab keine signifikante Korrelation zwischen FLI1 und IGFBP3 (Korrelationskoeffizient=0,0669), FLI1 und BCL9L (Korrelationskoeffizient=-0,2279) oder IGFBP3 und BCL9L (Korrelationskoeffizient=0,4173). Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.

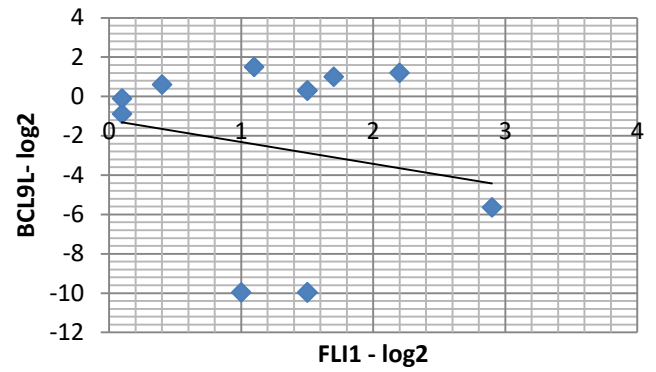
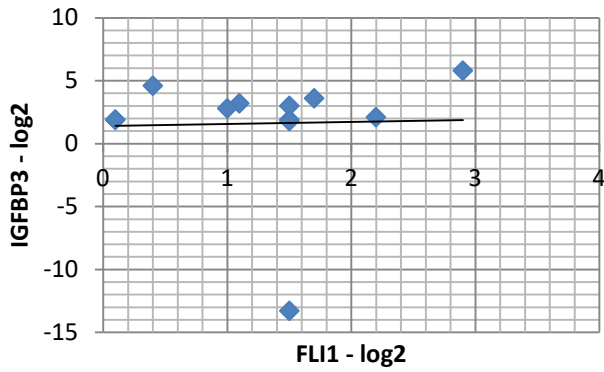


Abbildung 15: Korrelation von IGFBP3 und FLI1 in der IPMN (Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.)

Abbildung 16: Korrelation von BCL9L und FLI1 in der IPMN (Die Ergebnisse der Expression von Fli-1 wurden in Zusammenarbeit mit Frau J. Philipp erstellt und von Ihr in der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, DKK, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg" verwendet.)

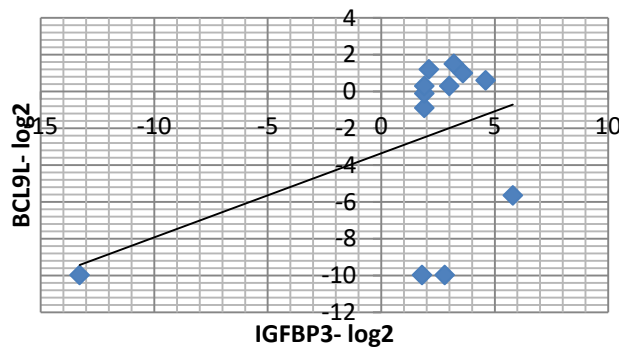


Abbildung 17: Korrelation von BCL9L und IGFBP3 in der IPMN

Kapitel 5: Diskussion

Zum Vergleich der Genexpression von Fli-1, IGFBP3, BCL9L und TOPK in der solid pseudopapillären Neoplasie des Pankreas, der intraduktalen papillär muzinösen Neoplasie des Pankreas, dem duktales Adenokarzinom des Pankreas und gesundem Pankreasgewebe wurde mittels spezifischer und sensitiver qRT-PCR die Expression der genannten Gene in den betreffenden Geweben quantifiziert. Aufgrund der schwachen Expression war eine quantitative Analyse der Expression von TOPK nicht möglich.

5.1 Diskussion der Gene

5.2.1 FLI-1

In der SPN zeigte sich eine signifikante Expressionssteigerung von FLI1 im Vergleich zur IPMN und zum PDAC. Im Vergleich zum Normalgewebe zeigte sich eine hoch signifikante Expressionssteigerung von FLI-1 in der IPMN. Im PDAC konnte keine signifikante Expressionsveränderung im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden. Eine signifikant gesteigerte Expression von FLI-1 in der SPN im Vergleich zum Normalgewebe konnte bereits nachgewiesen werden (22,30).

Zum Verständnis der Funktion von FLI-1 sowie der möglichen Auswirkungen bei dessen Überexpression wird oft das Fusionsprotein EWS/FLI-1 betrachtet, das durch eine Translokation t(11;22) entsteht und nicht in der SPN auftritt (22). Für das Fusionsprotein, das die aktivierende Domäne des EWS-Gens mit der DNA bindenden Domäne des Fli-1-Gens kombiniert, wurde eine hemmende Wirkung auf die Apoptose und eine stimulierende Wirkung auf Tumorstadium und –migration nachgewiesen (25,42). In einer Studie von Gangwal et al. wurden in Ewing Sarkom Zellen Protein-DNA-Interaktion und Transkriptionsaktivität von EWS/FLI-1 untersucht (43). Aus den Ergebnissen, die eine vergleichbare Bindungsspezifität bei unterschiedlicher Transkriptionsaktivität zeigten, wurde geschlossen, dass letztere eine mutationsbedingte neue Funktion von EWS/FLI-1 sein könnte (43). Vor dem Hintergrund, dass sich durch die Translokation die Transkriptionsaktivität von FLI-1 ändern kann, sind die Einflüsse von EWS/FLI-1 auf die Genexpression nur bedingt auf die Effekte der Überexpression von FLI-1 in anderen Geweben zu übernehmen.

Ziele des Fusionsproteins sind unter anderem IGFBP3 und TOPK (25,26). Die Vermutung liegt nahe, dass die für die SPN typische aberrante Expression von FLI1, ähnlich der Wirkung des aberranten EWS/FLI1 im Ewing Sarkom, ein vom gesunden Gewebe abweichendes Expressionsmuster der Zielgene IGFBP3 und TOPK induziert. Die statistische Auswertung der gemessenen Daten zeigte eine hoch signifikant positive Korrelation zwischen FLI1 und IGFBP3 in der SPN (Korrelationskoeffizient=0,8416; $p < 0,0001$), die diese Vermutung unterstützt. Die SPN ist allerdings in ihrer Ausprägung deutlich benigner als das Ewing-Sarkom. Zum Teil wurde der benigne Verlauf der Überexpression von p21 und p27 zugeschrieben (6). In Ewing Sarkomen hat EWS/FLI1 einen transkriptionshemmenden Effekt auf p21 (44). Die Ursache für die Überexpression von p21 trotz ebenfalls gesteigerter Expression von FLI1 in der SPN ist bisher ungeklärt. Die Abweichung der Wirkung von FLI1 und EWS/FLI1 auf p21 könnte auf die veränderte Transkriptionsaktivität zurückgeführt werden (43).

Beim Vergleich der Expression von FLI1 in den verschiedenen Entitäten unter gleichzeitiger Betrachtung derer Malignität fällt auf, dass die SPN die stärkste FLI1-Expression und die geringste Malignität aufweist, während die hoch malignen PDAC keine Überexpression von FLI1 zeigen. Bei Kenntnis über das hochgradig onkogene Potential des EWS/FLI1 Fusionsproteins könnte man vermuten, dass die Malignität mit steigender FLI1-Expression steigt. Wie bereits erwähnt wiesen Gangwal et al. eine vergleichbare Bindungsspezifität bei unterschiedlicher Transkriptionsaktivität von FLI1 und EWS/FLI1 nach (43). FLI1 könnte also Faktoren, die zu einer Hemmung der Proliferation führen, stärker aktivieren und somit ein geringeres Malignitätspotential bedingen.

Im PDAC wurde eine signifikant positive Korrelation zwischen FLI1 und BCL9L festgestellt (Korrelationskoeffizient=0,6256; $p=0,0395$). Bisher gibt es in der Literatur allerdings keine Daten über eine direkte Interaktion zwischen FLI1 oder EWS/FLI1 und BCL9L.

5.2.2 TOPK

Es zeigte sich, dass TOPK sowohl im Normalgewebe als auch in den untersuchten Neoplasien der Pankreas nur schwach exprimiert wird. Eine quantitative Analyse war daher nicht möglich. Eine Rolle dieses Gens in der Entwicklung pankreatischer Tumoren ist unwahrscheinlich.

5.2.3 IGFBP3

Für IGFBP3 ergaben sich eine hoch signifikante Steigerung der Expression im PDAC im Vergleich zur SPN sowie eine signifikante Steigerung in der IPMN im Vergleich zur SPN und eine signifikante Steigerung der Expression im PDAC im Vergleich zur IPMN. Im Vergleich zum Normalgewebe zeigte sich eine hoch signifikante Expressionssteigerung im PDAC sowie eine signifikante Expressionssteigerung in der IPMN. In der SPN zeigte sich keine signifikante Expressionsveränderung.

In Prostata, Colon, Lunge und Mamma konnte eine verminderte Expression von IGFBP3 mit einer gesteigerten Entartungswahrscheinlichkeit in Verbindung gebracht werden (23). EWS/FLI-1 kann die Expression von IGFBP3 durch Bindung an dessen Promotor vermindern und so die Menge an frei zirkulierendem IGF steigern (26). So wird das proliferative und antiapoptotische Signal an Zellen, die IGF1R exprimieren, verstärkt. Die exogene Zugabe von IGFBP3 hemmt Wachstum, Invasion, Angiogenese und Metastasierung in Ewing Sarkom-Zelllinien (45).

In Pankreaskarzinomen konnte eine Überexpression von IGF-I, einem Aktivator des PI3K/AKT Pathways, sowie von IGF1R nachgewiesen werden (27). Da die Aktivität von IGF-I durch IGFBP3 inhibiert wird, hat das Verhältnis der beiden Proteine zueinander möglicherweise eine Bedeutung für die Entstehung von Neoplasien. Besonders für eine hohe IGF-I-Expression bei gleichzeitig niedriger IGFBP3-Expression konnte eine Steigerung des Pankreaskarzinomrisikos nicht ausgeschlossen werden (28). Durch die Bindung von IGF-I hemmt IGFBP3 die Aktivierung des PI3K/AKT Pathways. Diese Hemmung begünstigt die Expression von p21 und p27. In der SPN werden p21 und p27 vermehrt exprimiert.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine hoch signifikante Steigerung der Expression von IGFBP3 im PDAC sowie der IPMN. Bei Vergleich der verschiedenen Entitäten zeigte sich die stärkste Expression im PDAC, gefolgt vom IPMN und schließlich der SPN. Die Malignität der Neoplasien zeigt dieselbe Rangfolge. Diese Beobachtung könnte auf eine kompensatorische Expressionssteigerung von IGFBP3 zurückzuführen sein die ausgelöst wird, wenn das Zellüberleben durch ein verändertes Milieu gefährdet ist. Ein schnell wachsender Tumor benötigt viele Nährstoffe, die durch die bestehende Blutversorgung ab einer bestimmten Größe nichtmehr geliefert werden können. Wird die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors reduziert, verringert sich auch die

notwendige Nährstoffrate und das Zellüberleben kann verlängert werden. Da das PDAC deutlich schneller wächst als IPMN oder SPN besteht eine höhere Gefahr der Zellen zu verhungern. Durch die Inhibition des Wachstumsfaktors IGF können Wachstum und somit auch Bedarf gesenkt werden. Beispielsweise konnte in Pankreaskarzinomzellen denen die Sauerstoffzufuhr reduziert wurde eine Expressionssteigerung von IGFBP3 und einer Verlängerung des Zellüberlebens nachgewiesen werden (46). Ebenso konnte eine gesteigerte Expression von IGFBP3 in Pankreas-Xenograft-Tumoren festgestellt werden, die einer neoadjuvanten Therapie unterzogen wurden (47).

Eine alternative Ursache für die gesteigerte Expression von IGFBP3 bei gleichzeitig gesteigerter Malignität könnte eine mangelnde Gegenregulation bei hoher IGF-Expression sein. Um diese These zu unterstützen bedarf es allerdings weiterer Expressionsuntersuchungen vor allem des PDAC und der IPMN unter Einbezug der IGF-Expression im Verhältnis zur IGFBP3-Expression.

5.2.4 BCL9L

Für BCL9L ergaben sich eine hoch signifikante Steigerung der Expression im PDAC im Vergleich zur SPN sowie eine signifikante Steigerung der Expression im PDAC im Vergleich zur IPMN. Im Vergleich zwischen IPMN und SPN ergab sich kein signifikanter Expressionsunterschied. Im Vergleich zum Normalgewebe zeigte sich eine hoch signifikante Verminderung der Expression in der SPN, sowie eine signifikante Expressionssteigerung im PDAC. In der IPMN zeigte sich keine signifikante Expressionsveränderung.

In Xenograftmodellen mit Kolon- und Myelomzellen konnte für das verwandte BCL9 ein invasives, metastatisches, angiogenetisches und proliferatives Potential gezeigt werden (39,40). Dieses wurde auf die Bindung des durch WNT regulierten β -Catenin und die folgende Translokation in den Nukleus zurückgeführt (40). Für BCL9L konnte gezeigt werden, dass es zum einen zur Konzentration von β -Catenin im Nukleus und zum anderen zur Steigerung der β -Catenin abhängigen Transkription führt (36). Außerdem führte die Aktivierung des WNT/ β -Catenin Pathways zur Steigerung der Transkription von BCL9L (38).

In Kolonadenomzellen konnte in über 90% der untersuchten Gewebeproben eine vermehrte Expression von BCL9L nachgewiesen werden (48). Gleichzeitig zeigte sich eine Überexpression von BCL9L und Pygo2 in Kolonkarzinomzellen (48). In

transgenen Mäusen mit BCL9L-Überexpression wurde eine vermehrte Neubildung von Kolonadenomen nachgewiesen (48). Diese Beobachtungen geben Hinweis auf eine Beteiligung der BCL9L-Überexpression an der Entstehung von gewissen Neoplasien.

In Kolonkarzinomen mit dauerhafter WNT/ β -Catenin-Aktivität konnte gezeigt werden, dass die Bindung von BCL9L und LEF1, die beide durch WNT reguliert werden, an β -Catenin dessen Abbau hemmt (49). Desweiteren konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass in Kolonadenomen und besonders in Kolonkarzinomen vermehrt LEF1 und β -Catenin im Nukleus nachzuweisen sind (49). Durch die unter anderem BCL9L-vermittelte dauerhafte WNT/ β -Catenin-Aktivität werden potentielle Onkogene wie beispielsweise Cyclin D1 und c-Myc vermehrt exprimiert. Eine Überexpression von BCL9L könnte somit durch gesteigerte Expression von Onkogenen ebenfalls das maligne Potential steigern.

Die hier gemessene signifikante Steigerung der Expression von BCL9L im PDAC und hoch signifikante Verminderung in der SPN im Vergleich zum Normalgewebe lässt vermuten, dass die Expression von BCL9L maßgeblich an der Dignität der untersuchten Neoplasien beteiligt ist. Sollte BCL9L eine ähnliche Funktion haben wie das verwandte BCL9 könnte folgende Vermutung aufgestellt werden: je höher die Expression von BCL9L ist, desto mehr proliferationsaktivierendes β -Catenin kann in den Nukleus transloziert werden um dort seine Wirkung zu entfalten. Fehlt BCL9L im Vergleich zum Normalgewebe, wie es in der SPN der Fall ist, ist das Wachstum reduziert. Zwar kann das aberrante β -Catenin nicht abgebaut werden, die zur Entwicklung der Transkriptionsaktivität notwendige Translokation in den Nukleus kann allerdings nur vermindert erfolgen. In der IPMN, in der die Expression vergleichbar mit der im Normalgewebe ist, hat BCL9L in diesem Szenario eher eine untergeordnete Rolle.

5.3 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen einen starken Einfluss von BCL9L auf die Dignität der untersuchten Neoplasien vermuten. Besonders die Überexpression im hoch malignen PDAC ist dabei von Interesse. Das noch sehr unbekanntes Protein sollte aufgrund seiner gegensätzlichen Expression im PDAC und der SPN Ziel für weitere Forschung sein. Die Inhibition der Expression oder Funktion von BCL9L könnte das Wachstum des PDAC reduzieren und so eine neue therapeutische Option eröffnen.

Kapitel 6: Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Expression von FLI1, IGFBP3, BCL9L und TOPK in SPN, PDAC, IPMN und gesundem Pankreasgewebe untersucht. Die SPN ist eine seltene und nur gering maligne Tumorentität des Pankreas im Gegensatz zum hochmalignen PDAC. Bei der IPMN werden benigne, borderline, maligne nicht-invasive und maligne invasive Formen unterschieden. Durch die Erstellung von Expressionsprofilen in den unterschiedlichen Entitäten sollen Rückschlüsse auf die molekulargenetischen Grundlagen der unterschiedlichen Dignitäten gezogen werden.

Zur Ermittlung der Expression der zu untersuchenden Gene wurde eine quantitative real time PCR etabliert. Diese Methode ermöglicht es, die RNA-Expression eines Gens mit hoher Sensitivität zu quantifizieren, indem die PCR-Amplifikation mit Hilfe von spezifischen Sonden sichtbar gemacht wird.

Nach Erstellung und Validierung der Primer und Sonden wurden 18 Proben von SPN, 12 Proben von IPMN und 12 Proben von PDAC auf die RNA-Expression der Gene FLI1, IGFBP3, BCL9L und TOPK untersucht. Als Referenzprobe wurde die gepoolte RNA von Proben mit gesundem Pankreasgewebe verwendet. Als Housekeeping-Gen zur Normalisierung der Werte wurde GAPDH genutzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass FLI1 in allen untersuchten Neoplasien überexprimiert wurde, am stärksten und hochsignifikant in der SPN ($p < 0,0001$). Im PDAC stellte sich diese Überexpression verglichen mit den anderen Entitäten am geringsten und nicht signifikant dar ($p = 0,078$). Für IGFBP3 konnte eine signifikante Steigerung in PDAC ($p < 0,0001$) und IPMN ($p = 0,022$) nachgewiesen werden, nicht aber in der SPN ($p = 0,98$). BCL9L wurde im PDAC signifikant vermehrt ($p = 0,04$) und in der SPN signifikant vermindert ($p = 0,0005$) exprimiert. Eine quantitative Analyse der Expression von TOPK war aufgrund der geringen Expression in den untersuchten Geweben nicht möglich.

Die Expression von FLI1 nimmt also mit gesteigerter Malignität der untersuchten Entität ab. Während sie in den hoch malignen PDAC kaum über die Expression im Normalgewebe hinaus geht, zeigt sich in den IPMN und besonders in den wenig malignen SPN eine stark gesteigerte FLI1 Expression. Das eröffnet die Möglichkeit,

dass FLI1 in onkogene Signalwege eingreift und die Effekte von proliferativen oder antiapoptotischen Signalen im Pankreas abmindert. Ein entgegengesetzter Effekt zeigt sich hingegen für BCL9L. Die gesteigerte Expression des Gens in den PDAC im Zusammenhang mit der verminderten Expression in den SPN weist hier auf eine proliferationssteigernde Bedeutung hin.

Literaturverzeichnis

1. Klöppel G, Hruban RH, Klimstra DS, Maitra A, Morohoshi T, Notohara K et al. Solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, Hrsg WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Lyon: IARC; 2010. p. 327–30.
2. Lin MYC, Stabile BE. Solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas: a rare and atypically aggressive disease among male patients. *Am Surg*. 2010 Oct;76(10):1075–8.
3. Crucitti A, Grossi U, Giustacchini P, Tomaiuolo PMC, Bellantone R. Solid pseudopapillary tumor of the pancreas in children: report of a case and review of the literature. *Updat Surg*. 2010 Aug;62(1):69–72.
4. Reddy S, Cameron JL, Scudiere J, Hruban RH, Fishman EK, Ahuja N, et al. Surgical management of solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas (Franz or Hamoudi tumors): a large single-institutional series. *J Am Coll Surg*. 2009 May;208(5):950–7; discussion 957–9.
5. Kosmahl M, Seada LS, Jänig U, Harms D, Klöppel G. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: its origin revisited. *Virchows Arch*. 2000 May;436(5):473–80.
6. Tiemann K, Heitling U, Kosmahl M, Klöppel G. Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas show an interruption of the Wnt-signaling pathway and express gene products of 11q. *Mod Pathol*. 2007 Sep;20(9):955–60.
7. Reddy S, Wolfgang CL. Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas. *Adv Surg*. 2009 Jan;43:269–82.
8. Klöppel G, Hruban RH, Longnecker DS, Adler G, Kern SE, Partanen TJ. Ductal adenocarcinoma of the pancreas. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 2000. p. 219–28.
9. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho R a. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*. 2006 May 15;20(10):1218–49.
10. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic Cancer. 2008;(3):157–88.
11. Wörmann SM, Algül H. Risk Factors and Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer. *Front Oncol*. 2013 Jan;3(November):282.
12. Corbo V, Tortora G, Scarpa A. Molecular pathology of pancreatic cancer: from bench-to bedside translation. *Curr Drug Targets*. 2012 Jun;13(6):744–52.
13. Morton JP, Timpson P, Karim S a, Ridgway R a, Athineos D, Doyle B, et al. Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 5;107(1):246–51.
14. Koorstra J-BM, Hustinx SR, Offerhaus GJ a, Maitra A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatol*. 2008 Jan;8(2):110–25.
15. Grützmann R, Post S, Saeger HD, Niedergethmann M. Intraductal papillary mucinous neoplasia (IPMN) of the pancreas: its diagnosis, treatment, and prognosis. *Dtsch Arztebl Int*. 2011 Nov;108(46):788–94.
16. Klöppel G, Kosmahl M, Lüttges J. [Intraductal neoplasms of the pancreas: cystic and common]. *Pathologe*. 2005 Feb;26(1):31–6.

17. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006 Nov 3;127(3):469–80.
18. Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Jul;10(7):468–77.
19. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 May;8(5):387–98.
20. Chetty R, Serra S, Salahshor S, Alsaad K, Shih W, Blaszyk H, et al. Expression of Wnt-signaling pathway proteins in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: a tissue microarray analysis. *Hum Pathol*. 2006 Feb;37(2):212–7.
21. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*. 2012 Feb;142(2):219–32.
22. Tiemann K, Kosmahl M, Ohlendorf J, Krams M, Klöppel G. Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas are associated with FLI-1 expression, but not with EWS/FLI-1 translocation. *Mod Pathol*. 2006 Nov;19(11):1409–13.
23. Jogie-Brahim S, Feldman D, Oh Y. Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease. *Endocr Rev*. 2009 Aug;30(5):417–37.
24. Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salomoni P, Grassilli E, Romano G, et al. Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1999 Oct;19(10):7203–15.
25. Herrero-Martín D, Osuna D, Ordóñez JL, Sevillano V, Martins a S, Mackintosh C, et al. Stable interference of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signalling and reveals TOPK as a new target. *Br J Cancer*. 2009 Jul 7;101(1):80–90.
26. Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol*. 2004 Aug;24(16):7275–83.
27. Karna E, Surazynski A, Orłowski K, Łaskiewicz J, Puchalski Z, Nawrat P, et al. Serum and tissue level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I binding proteins as an index of pancreatitis and pancreatic cancer. *Int J Exp Pathol*. 2002 Oct;83(5):239–45.
28. Rohrmann S, Grote VA, Becker S, Rinaldi S, Tjønneland A, Roswall N, et al. Concentrations of IGF-I and IGFBP-3 and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br J Cancer*. 2012 Feb 28;106(5):1004–10.
29. Kim H-S. Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 3 Induces Caspase-Dependent Apoptosis through a Death Receptor-Mediated Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res*. 2004 Mar 15;64(6):2229–37.
30. Domanowsky L. Expressionsmuster von Fli-1, IGFBP3 und TOPK in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas. Semmelweis Universität Campus Hamburg; 2013.
31. Hu F, Gartenhaus RB, Eichberg D, Liu Z, Fang H-B, Rapoport AP. PBK/TOPK interacts with the DBD domain of tumor suppressor p53 and modulates expression of transcriptional targets including p21. *Oncogene*. 2010 Oct 7;29(40):5464–74.

32. Abe Y, Matsumoto S, Kito K, Ueda N. Cloning and expression of a novel MAPKK-like protein kinase, lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase, specifically expressed in the testis and activated lymphoid cells. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21525–31.
33. Ayllón V, O'connor R. PBK/TOPK promotes tumour cell proliferation through p38 MAPK activity and regulation of the DNA damage response. *Oncogene*. 2007 May 24;26(24):3451–61.
34. Chandramohan V, Jeay S, Pianetti S, Sonenshein GE. Reciprocal control of Forkhead box O 3a and c-Myc via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway coordinately regulates p27Kip1 levels. *J Immunol*. 2004 May 1;172(9):5522–7.
35. Brazil DP, Park J, Hemmings BA. PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):293–303.
36. Adachi S, Jigami T, Yasui T, Nakano T, Ohwada S, Omori Y, et al. Role of a BCL9-related beta-catenin-binding protein, B9L, in tumorigenesis induced by aberrant activation of Wnt signaling. *Cancer Res*. 2004 Dec 1;64(23):8496–501.
37. Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2225–30.
38. de la Roche M, Worm J, Bienz M. The function of BCL9 in Wnt/beta-catenin signaling and colorectal cancer cells. *BMC Cancer*. 2008 Jan;8:199.
39. Mani M, Carrasco DE, Zhang Y, Takada K, Gatt ME, Dutta-Simmons J, et al. BCL9 promotes tumor progression by conferring enhanced proliferative, metastatic, and angiogenic properties to cancer cells. *Cancer Res*. 2009 Oct 1;69(19):7577–86.
40. Takada K, Zhu D, Bird GH, Sukhdeo K, Zhao J, Mani M, et al. Targeted disruption of the BCL9/ β -catenin complex inhibits oncogenic Wnt signaling. *Sci Transl Med*. 2012 Aug 22;4(148):148ra117.
41. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. *A-Z of quantitative PCR*. 2004. p. 87–112.
42. Arvand a, Denny CT. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene*. 2001 Sep 10;20(40):5747–54.
43. Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, Kinsey M, Haroldsen SC, Shah A a, et al. Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 22;105(29):10149–54.
44. Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, et al. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem*. 2003 Apr 25;278(17):15105–15.
45. Benini S, Zuntini M, Manara MC, Cohen P, Nicoletti G, Nanni P, et al. Insulin-like growth factor binding protein 3 as an anticancer molecule in Ewing's sarcoma. *Int J Cancer*. 2006 Oct 1;119(5):1039–46.
46. Koga T, Endo H, Miyamoto Y, Mukai M, Akira S, Inoue M. IGFBPs contribute to survival of pancreatic cancer cells under severely hypoxic conditions. *Cancer Lett*. 2008 Sep 8;268(1):82–8.
47. Kim MP, Truty MJ, Choi W, Kang Y, Chopin-Lally X, Gallick GE, et al. Molecular profiling of direct xenograft tumors established from human

- pancreatic adenocarcinoma after neoadjuvant therapy. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jul;19 Suppl 3:S395–403.
48. Brembeck FH, Wiese M, Zatula N, Grigoryan T, Dai Y, Fritzmann J, et al. BCL9-2 promotes early stages of intestinal tumor progression. *Gastroenterology*. Elsevier Inc.; 2011 Oct;141(4):1359–70, 1370.e1–3.
 49. de la Roche M, Ibrahim AEK, Mieszczanek J, Bienz M. LEF1 and B9L shield β -catenin from inactivation by Axin, desensitizing colorectal cancer cells to tankyrase inhibitors. *Cancer Res*. 2014 Mar 1;74(5):1495–505.
 50. Hallas C, Phillipp J, Domanowsky L, Kah B, Tiemann K. BCL9L expression in pancreatic neoplasia with a focus on SPN: a possible explanation for the enigma of the benign neoplasia. *BMC Cancer* [Internet]. 2016 Aug 18;16:648. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27539223>

Publikationen

Diplomarbeit:

Domanowsky L. Expressionsmuster von Fli-1, IGFBP3 und TOPK in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas. Semmelweis Universität Campus Hamburg; 2013.

Paper:

Hallas C, Phillipp J, Domanowsky L, Kah B, Tiemann K. BCL9L expression in pancreatic neoplasia with a focus on SPN: a possible explanation for the enigma of the benign neoplasia. BMC Cancer. 2016 Aug 18;16:648.

Abgrenzung zur Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, IGFBP3 und TOPK in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas"

Der Fokus der Arbeit "Expressionsmuster von Fli1, IGFBP3 und TOPK in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas" lag primär in der Methodenetablierung sowie sekundär in der Herausarbeitung der unterschiedlichen Bedeutung einer gesteigerten Expression von FLI1 sowohl im aggressiven Ewing-Sarkom als auch in der deutlich benigneren SPN.

Entwicklung der Methode

In der o.g. Arbeit von 2013 wurde zunächst eine spezifische und sensitive qRT-PCR zur Messung der RNA-Expression von FLI1, TOPK und IGFBP3 in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie sowie dem gesunden Pankreasgewebe etabliert.

Primer und Sonden

Für jedes Gen wurden zunächst spezifische, Exon-übergreifende Primer entwickelt und getestet. Mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) wurden Überschneidungen mit anderen, die Ergebnisse verfälschenden, Genen ausgeschlossen. Anschließend wurde eine RT-PCR mit darauffolgender Fragmentanalyse durchgeführt, um eine ausreichend starke Signalgebung zu gewährleisten. Daraufhin wurden die erstellten Sonden mittels qRT-PCR an der RNA von zwei Proben gesunden Pankreas' und einer SPN-Probe auf Sensitivität und Spezifität geprüft.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Sonde
GAPDH	TTT GGT ATC GTG GAA GGA CTC	GAA CAT CAT CCC TGC CTC TAC	CAT GCC ATC ACT GCC
Fli-1	CCA GAT CCG TAT CAG ATC CTG	CAA CGC CAG CTG TAT CAC CT	CAG ATC CAG CTG TGG CAA
IGFBP3	ACT ACG AGT CTC AGA GCA CAG	GAC ACA CTG AAT CAC CTG AAG	ACG GCA GGG ACC ATA

TOPK	TGT TAT TAC TGA CAA GGC AGA C	GAT GAA GCA TAC TAT GCA GCG	ATG ACT TTA TCG ATT CCA C
-------------	----------------------------------	--------------------------------	------------------------------

Tab. 1: Verwendete Sonden und Primer

Nach Entwicklung und Bestätigung der Primer und Sonden wurde eine qualitative RT-PCR mit anschließender Fragmentanalyse durchgeführt, um die Integrität der zu untersuchenden RNA im Probematerial zu überprüfen. Hierzu wurde das gering exprimierte Housekeeping-Gen HPRT verwendet, das sich in der Länge dessen PCR-Produktes nur geringfügig von der Länge der nachzuweisenden PCR-Produkte von FLI1, IGFBP3 und TOPK unterscheidet. Aus dem gesunden Restgewebe der untersuchten Pankreasschnitte wurde die Referenzprobe gewonnen.

Quantitative Bestimmung der Genexpression

Anschließend wurde die so entwickelte Methode genutzt, um mittels quantitativer RT-PCR Unterschiede der Genexpression von FLI1, IGFBP3 und TOPK in der SPN und dem gesunden Pankreasgewebe zu untersuchen.

Verwendete Gewebeproben

Hierzu wurden 11 Proben mit gesundem Pankreasgewebe und 18 Proben mit SPN-Tumorgewebe verwendet. Die Gewebeproben kamen aus dem Archiv des ehemaligen Direktors des Pathologischen Instituts der Uniklinik Kiel (Prof. Dr. G. Klöppel) und dem Archiv der Hämatopathologie Hamburg und entstammten den Jahrgängen 2005 bis 2008 (Tumorgewebe) bzw. 2006-2010 (Normalgewebe). Als Kontrollproben für die qualitative RNA-Analyse wurde aus überschüssigem Blut extrahierte RNA aus dem allgemeinen Eingang verwendet, da RNA in Blut leicht nachweisbar ist.

Neuerungen in der vorliegenden Arbeit

Nun wurde die zuvor erstellte Methode genutzt um die Genexpression von FLI1, IGFBP3 und TOPK auch im duktalem Adenokarzinom des Pankreas sowie der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie zu messen und die Entitäten so auf genetischer Basis zu vergleichen.

In den bereits zuvor verwendeten 11 Proben mit Normalgewebe sowie 18 Proben mit SPN-Tumorgewebe wurde zusätzlich zu den bisher untersuchten Genen auch die Expression von BCL9L quantitativ bestimmt. Außerdem wurde die Untersuchung auf

12 Proben mit Duktalem Adenokarzinom und 12 Proben mit IPMN des Pankreas erweitert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es durch die zuvor etablierte Methode Rückschlüsse auf die Bedeutung der untersuchten Gene in den neu hinzugezogenen Tumorentitäten zu erhalten. Interessant ist das duktale Adenokarzinom des Pankreas aufgrund der Malignität sowie die IPMN aufgrund der sehr inhomogenen Ausprägung als benigne, borderline, maligne nicht-invasiv und maligne invasive Form.

Das untersuchte genetische Spektrum wurde um BCL9L erweitert, da für das hierdurch kodierte Protein eine Interaktion mit β -Catenin, einem in 98% der SPN mutierten Gens, nachgewiesen werden konnte. In verschiedenen in-vitro- und Xenograft-Untersuchungen konnten Einflüsse von BCL9L und dem verwandten BCL9 auf Transkription, Proliferation, Migration und Invasion gezeigt werden.

Ethikvotum

Bearbeitungsnummer: WF-002/18

Projekt: Nicht-interventionelles, retrospektives Forschungsvorhaben zur Pathogenese sowie molekularen Mechanismen pankreatischer Neoplasien

Vor dem Hintergrund, dass die studiengegenständlichen Körpermaterialien keinem Menschen mehr zugeordnet werden können, stellt Ihr Studienvorhaben kein "Forschungsvorhaben am Menschen" im Sinne des §9 Abs. 2 des Hamburgischen Kammergesetzes für die Heilberufe dar und fällt auch nicht unter die nach §15 Abs. 1 der Berufsordnung für Hamburger Ärzte und Ärztinnen beratungspflichtigen Forschungsvorhaben. Für Ihr Studienvorhaben ist daher keine Beratung durch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg erforderlich.

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind kenntlich gemacht und die Arbeit war in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung.

Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die maßgeblich zu der erfolgreichen Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. K. Tiemann, die mir dieses interessante Thema vorgeschlagen und mir den Zugriff auf Gewebeprobe dieses sehr seltenen Tumors gegeben hat.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Leuschner, der mir ermöglichte die Arbeit an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel einzureichen.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Klapper, der nach dem Tod von Herrn Prof. Leuschner die Betreuung dieser Arbeit übernahm.

Außerdem möchte ich besonders Frau Dr. Cora Hallas und Frau Bettina Kah danken, die mich während der gesamten Projektlaufzeit freundlich und fachkompetent betreut und geleitet und dabei geduldig auf meine Fragen geantwortet haben. Sie haben es geschafft, auf eine freundliche Weise dennoch genügend Druck aufzubauen, um die Arbeit voran zu treiben. Ohne ihre Anweisungen und Hilfestellungen wäre ich auf diesem für mich neuen Gebiet der experimentellen Untersuchungen verloren gewesen. Ebenfalls großen Dank zolle ich meinen Eltern, ohne die dieses Studium und somit auch diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären.

Zustimmung:

Ich stimme zu, dass diese Doktorarbeit sowohl in elektronischer als auch in gedruckter Form durch den Campus Kiel an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein für Studenten, Dozenten, Mitarbeiter und Interessierte ohne Einschränkungen zugänglich gemacht wird.