

**Zytogenetische Untersuchungen
zur Bestimmung der chromosomalen Aneuploidie in der
Karzinogenese sowie für die Frühdiagnostik des
Pankreaskarzinoms**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt
dem Fachbereich 18 - Naturwissenschaften
der Universität Kassel

von
Dipl.-Biologe
Mario Baumgart
geboren am 7. September 1972
in Bremerhaven

Kassel, im Mai 2009

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. H. Zöltzer

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. J. Rüschoff

Tag der Disputation: 03.12.2009

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 2003 bis August 2007 in der Klinik für Allgemeinchirurgie (Direktor Prof. Dr. med. H. Becker), in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. B.M. Ghadimi am Universitätsklinikum der Georg-August-Universität Göttingen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als in der Arbeit angegebene Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Göttingen, im Mai 2009

Mario Baumgart

Folgende Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Originalarbeiten

1. Baumgart M, Heinmöller E, Horstmann O, Becker H, Ghadimi BM (2005) The genetic basis of sporadic pancreatic cancer. *Cell Oncol.* 27(1): 3-13.
2. Baumgart M, Werther M, Bockholt A, Scheurer M, Rüschoff J, Dietmaier W, Ghadimi BM, Heinmöller E (2010) Genomic instability at both the base pair level and the chromosomal level are detectable in earliest PanIN lesions in tissues of chronic pancreatitis. *Pancreas*, im Druck.

Vorträge

1. Baumgart M, Scharf JG, Schwörer H, Horstmann O, Becker H, Ghadimi BM, Entwicklung eines Interphase-FISH-Systems zur Detektion chromosomaler Aneuploidien und Genalterationen im Pankreassekret, 122. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München, 2005.
2. Baumgart M, Werther M, Heinmöller E, Rüschoff J, Horstmann O, Becker H, Ghadimi BM, Genetische Alterationen und Aneuploidie in prä-neoplastischen Läsionen bei chronischer Pankreatitis, 123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin, 2006.
3. Aneuploidy in the carcinogenesis of Pancreatic cancer and its use as marker for early diagnostics, Fritz-Lipmann-Institut für Altersforschung, Jena, 2009.

Poster

1. Baumgart M, Scharf J-G, Heinmöller E, Rüschoff J, Auer G, Becker H, Ghadimi BM, Analyse von Aneuploidie und genetischen Alterationen in chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinomen, 9. Chirurgische Forschungstage, Frankfurt am Main, 2005.
2. Baumgart M, Werther M, Heinmöller E, Rüschoff J, Becker H, Ghadimi BM, Analyse genetischer Alterationen und Aneuploidien in prä-neoplastischen Läsionen eines Patienten mit chronischer Pankreatitis, 10. Chirurgische Forschungstage, Münster, 2006.

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Projekt Gh 14-2/1 und durch die Matthias Lackas-Stiftung gefördert.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Ziele der Arbeit	4
2 Literaturübersicht	5
2.1 Histologisches Progressionsmodell	5
2.2 Genetische Progression	6
2.3 Epigenetische Veränderungen	10
2.4 Chromosomale Instabilität	11
2.5 Tiermodelle	13
2.6 Diagnostik	15
2.7 Resümee	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Geräte und Zubehör	19
3.2 Chemikalien	20
Allgemeine Chemikalien, Lösungen und Kits	20
Modifizierte Nukleotide und kommerzielle FISH-Sonden	21
Antikörper und Liganden zum indirekten Nachweis der FISH-Sonden	21
DNA-Längenstandard	21
Verwendete Puffer	21
3.3 Zelllinien	22
3.4 Plasmide	22
3.5 Antibiotika	23
3.6 Enzyme	23
3.7 Nährmedien und Kulturbedingungen	23
Voll- und Selektivmedien zur Bakterienkultivierung	23
Bakterielle Zellanzucht und Zellernte	23
Anlegen von bakteriellen Dauerkulturen	24
Kultivierung von humanen Zelllinien	24

3.8	Allgemeine Techniken zum Arbeiten mit Nukleinsäuren	25
	Isolation von Plasmiden	25
	Plasmidpräparation mit Anionenaustauschersäulen	25
	Präparation von BAC und PAC DNA	26
	Reinigung und Konzentration von DNA	27
	Ethanol-Fällung	27
	Isopropanol-Fällung	27
	Phenol-Chloroform-Extraktion	27
	Bestimmung von DNA-Konzentration und Reinheitsgrad	27
	Agarose-Gelelektrophorese	28
3.9	Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung (FISH)	29
	Sondenauswahl und -design	29
	Nicktranslation	30
	Präzipitation und Hybridisierung markierter DNA	31
	Detektion	32
	Herstellung von Metaphasepräparaten	32
	FISH an Nuklei aus Pankreassekret und Zelllinien	33
	Endoskopische Gewinnung von Pankreassekret	33
	Aufbereitung des Pankreassekretes und der Zelllinien für FISH	33
	FISH an isolierten Zellkernen aus Formalin fixiertem Paraffin-Gewebe	34
	Manuelle Mikrodissektion von Gangläsionen aus Paraffin-Geweben	34
	Isolation von Zellkernen aus mikrodisszierten Proben	34
	FISH an aus Paraffin-Geweben isolierten Zellkernen	35
	Auswertung und Bildaufnahme	35
	Dokumentation und statistische Auswertung	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Analyse des Auftretens von molekular- und zytogenetischen Veränderungen in prä-neoplastischen Läsionen in Geweben mit chronischer Pankreatitis	37
	Aneuploidie in PanIN-Läsionen in Geweben mit chronischer Pankreatitis	37
	Molekulare Analysen von Pankreaskarzinom-Signatur-Genen	39
	LOH Analysen des <i>p16</i> -, <i>p53</i> - und <i>DPC4</i> -Locus	43
	Sequenzänderungen der Gene <i>p16</i> und <i>p53</i>	44
	IHC Analysen der TSG <i>p16</i> , <i>p53</i> und <i>DPC4</i>	45
4.2	Entwicklung von Biomarkern zur Detektion von malignen Zellen im Pankreassekret	47
	Zytogenetische Untersuchungen an Pankreaskarzinom-Zelllinien	47
	Entwicklung von Locus-spezifischen Sonden	47

	Bestimmung der chromosomalen und genetischen Aneuploidie	49
4.3	Ploidieanalysen an Interphasekernen aus Pankreassekreten	50
	Aspirationszytologie	50
	Bürstenzytologie	55
	Messung des DNA-Gehaltes mittels Image-Cytometrie	59
5	Diskussion	60
5.1	Auftreten von molekular- und zytogenetischen Veränderungen in prä-neoplastischen Läsionen in Geweben mit chronischer Pankreatitis	60
	Aneuploidie in PanIN-Läsionen in Geweben mit chronischer Pankreatitis	61
	Molekulare Analysen von Pankreaskarzinom-Signatur-Genen	63
	Bedeutung der chronischen Pankreatitis für die Karzinogenese	67
5.2	Entwicklung von Biomarkern zur Detektion von malignen Zellen im Pankreassekret	71
	Entwicklung von Locus-spezifischen Sonden	71
5.3	Ploidieveränderungen in Zellen aus Pankreassekreten	72
	Tauglichkeit der Sonden für die Diagnose einer malignen Veränderung	72
	Methodendiskussion	74
6	Zusammenfassung	79
7	Anhang	81
8	Literaturverzeichnis	91

A. bidest	Aqua bidestillata
ADM	Azinär-duktales Metaplasie
AIB1	<i>amplified in breast cancer 1</i>
Ap	Ampicillin
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
CEP	<i>centromeric probe</i> , Centromersonde
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
CIN	Chromosomale Instabilität
cMYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPC4	<i>deleted in pancreatic cancer, locus 4</i> , auch SMAD4
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
FCS	Fötale Kälber-Serum
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
Her2	Heregulin Rezeptor
kb	Kilobasen
Kras	<i>Kirsten rat sarcoma oncogene 2</i>
n.d.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OT	Objektträger
p16	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor p16</i>
p53	p53 Tumor-Suppressor
PAC	<i>P1 artificial chromosome</i>
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PDAC	Duktales Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SKY	Spektrale Karyotypisierung
TSG	Tumor-Suppressor-Gen
Upm	Umdrehungen pro Minute
VT	Volumenteile
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen

Tabellenverzeichnis	Seite
Tabelle 1. Verwendete Geräte.	19
Tabelle 2. Verwendete Chemikalien, Lösungen und Kits.	20
Tabelle 3. Verwendete Fluorochrome, markierte Nukleotide und FISH-Sonden.	21
Tabelle 4. Verwendete Zelllinien.	22
Tabelle 5. Verwendete Plasmide.	22
Tabelle 6. F-Werte und Signifikanzniveaus allgemeiner linearer Modelle zum Vorhersagewert des histologisch diagnostizierten Grades (PanIN) und der jeweiligen Sonde für den Grad chromosomaler Aneuploidie.	40
Tabelle 7. Analyse in den unterschiedlichen PanIN für Chromosomen 3, 7, 8 und 17.	42
Tabelle 8. Ergebnisse der Ploidieanalysen in den duktalem Metaplasien von Patient CP10.	42
Tabelle 9. Mikrosatelliten-Analyse der Tumor-Suppressor-Gen-Loci <i>p16</i> , <i>p53</i> und <i>DPC4</i> in Resektaten von 21 Patienten mit CP.	43
Tabelle 10. Sequenzänderungen der Gene <i>p16</i> und <i>p53</i> im Gewebe von CP10.	44
Tabelle 11. Übersicht über die Mutationen der Gene <i>p16</i> und <i>p53</i> sowie gesamte LOH der Genloci <i>p16</i> , <i>p53</i> und <i>DPC4</i> im Gewebe des Studienpatienten CP10	45
Tabelle 12. Ergebnisse der Hybridisierungen von Centromersonden auf 11 Pankreaskarzinom-Zelllinien.	47
Tabelle 13. Ergebnisse der Untersuchungen zur Amplifikation von Onkogenen an den untersuchten Zelllinien.	49
Tabelle 14. Ergebnis der Ploidieanalysen an Aspirationszytologien des Pankreas.	51
Tabelle 15. Ergebnisse der Anpassung eines logistischen Regressionsmodells an eine unabhängige Variable zur Beschreibung der Diagnostizierbarkeit des Karzinoms (maligne vs. benigne) anhand von prozentualen Ploidie-Veränderungen unterschiedlicher Chromosomen in Zellen, die durch „Aspiration“ gewonnen wurden.	53
Tabelle 16. Ergebnisse der Anpassung eines logistischen Regressionsmodells an eine unabhängige Variable zur Beschreibung der Diagnostizierbarkeit des Karzinoms (maligne vs. benigne) anhand von prozentualen Ploidie-Veränderungen unterschiedlicher Gen-Loci in Zellen, die durch „Aspiration“ gewonnen wurden.	54
Tabelle 17. Ergebnis der Ploidieanalysen an Bürstenzytologien des Pankreas.	56
Tabelle 18. Ergebnisse der Anpassung eines logistischen Regressionsmodells an eine unabhängige Variable zur Beschreibung der Diagnostizierbarkeit des Karzinoms (maligne vs. benigne) anhand von prozentualen Ploidie-Veränderungen unterschiedlicher Chromosomen in Zellen, die durch „Bürsten“ gewonnen wurden.	57
Tabelle 19. Ergebnisse der Anpassung eines logistischen Regressionsmodells an eine unabhängige Variable zur Beschreibung der Diagnostizierbarkeit des Karzinoms (maligne vs. benigne) anhand von prozentualen Ploidie-Veränderungen unterschiedlicher Gen-Loci in Zellen, die durch „Bürsten“ gewonnen wurden.	58
Tabelle 20. Vergleich der Ergebnisse der Image Cytometrie (IC) und gemittelten mittleren Kopienzahl der Onkogen-Loci der untersuchten Fälle	59
Tabelle A1. FISH-Analysen mit Centromersonden an Pankreaskarzinom-Zelllinien.	81
Tabelle A2. Ergebnisse der zwei-Farben-FISH-Experimente an Zelllinien und Leukozyten.	83

Tabelle A3. Amplifikation von Onkogenen an Zelllinien und Leukozyten.	84
Tabelle A4. Patientenkollektiv 1	85
Tabelle A5. Ploidieanalyse in Kollektiv 1 mit Centromersonden.	86
Tabelle A6. Ploidieanalyse in Kollektiv 1 mit Locus-spezifischen Sonden.	87
Tabelle A7. Amplifikationsanalyse in Kollektiv 1.	88
Tabelle A8. Patientenkollektiv 2	89
Tabelle A9. Ploidieanalyse in Kollektiv 2 mit Centromersonden.	89
Tabelle A10. Ploidieanalyse in Kollektiv 2 mit Locus-spezifischen Sonden.	90
Tabelle A11. Amplifikationsanalyse in Kollektiv 2.	90

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abbildung 1. Histologische Veränderungen in der PanIN-Sequenz.	5
Abbildung 2. Schematische Darstellung der wichtigsten Pathways in der Entwicklung von PDAC.	6
Abbildung 3. Ideogramm von chromosomalen Gewinnen und Verlusten in neun Pankreaskarziom-Zelllinien ermittelt durch CGH.	12
Abbildung 4. Schematische Darstellung der eingesetzten FISH-Sonden.	30
Abbildung 5. Beispiele für PanIN-Läsionen und ADM aus Geweben mit CP.	38
Abbildung 6. Mittels FISH ermittelte prozentuale Anteile von Zellen mit Ploidieveränderungen in den unterschiedlichen PanIN-Graden von acht Patienten.	40
Abbildung 7. Repräsentative Interphase-FISH-Experimente an isolierten Nuklei aus Paraffin-eingebettetem Gewebe.	41
Abbildung 8. Immunhistochemische Expressions-Analyse von p16, DPC4 und p53 Protein in einer PanIN-3-Läsion des Studienpatienten CP10.	46
Abbildung 9. Hybridisierung von Centromersonden auf Zelllinien.	48
Abbildung 10. Test der Locus-spezifischen Sonden auf Leukozyten-Metaphase-Präparaten.	48
Abbildung 11. Hybridisierung der FISH-Sonden auf die Zelllinie MiaPaCa-2.	49
Abbildung 12. Repräsentative FISH-Experimente an isolierten Nuklei aus Pankreassekret.	52
Abbildung 13. Repräsentative Beispiele für Histogramme der Ploidieanalysen mittels Image Cytometrie.	59

1 Einleitung

In Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen an Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreaskarzinom) bei Männern auf ca. 6.300, bei Frauen auf ca. 6.600 geschätzt [Robert-Koch-Institut, 2008]. Etwa 3% aller Krebserkrankungen sind Pankreaskarzinome. Sie sind allerdings bei Männern für 5,8%, bei Frauen für 6,7% aller Krebstodesfälle verantwortlich und somit die vierthäufigste Krebstodesursache bei Männern und Frauen [Robert-Koch-Institut, 2008]. Die Mortalität infolge dieser Tumore ist ähnlich hoch wie die Inzidenz und zeigt damit eine erhebliche biologische Aggressivität, die durch die Kombination frühen invasiven Wachstums, früher lymphogener und hämatogener Metastasierung sowie Radio- und Chemoresistenz verursacht wird. Dabei ist in etwa 95% der Fälle der exokrine Anteil des Organs Ausgangspunkt für die überwiegend malignen Tumore (98%). Bei der Erkrankung an Bauchspeicheldrüsenkrebs ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate ausgesprochen ungünstig. Sie liegt für Männer bei etwa 6,4% und für Frauen bei 7,6%. Die mittlere Überlebenszeit von 6 Monaten nach der Diagnosestellung spiegelt den raschen Verlauf wider [Robert-Koch-Institut, 2008]. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt für Männer bei 69 und für Frauen bei 76 Jahren [Robert-Koch-Institut, 2008]. Durch die tiefe Lage des Organs im Körperinneren und das späte Auftreten von Symptomen erfolgt die Diagnose meist zu einem sehr späten Zeitpunkt. In etwa 80% der Fälle ist die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits nicht mehr operabel [Ahrendt und Pitt, 2002]. Histologisch werden fünf Typen unterschieden, wobei das duktales Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) mit einem Anteil von etwa 85% der Hauptvertreter ist. Während Karzinome im Korpus- und Schwanzbereich (etwa 30%) eine ähnlich schlechte Prognose wie die im Pankreaskopf (60%) aufweisen, zeigen Adenokarzinome im Bereich der Papille häufig einen besseren Verlauf.

Die Therapie der Wahl und einziger kurativer Ansatz ist die primäre Resektion des Malignoms. Je nach Lage des Tumors wird hierbei entweder eine Pankreaskopf- oder eine Pankreasschwanzresektion durchgeführt. In seltenen Fällen muss die gesamte Bauchspeicheldrüse entfernt werden. Aber auch in diesen Fällen beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate lediglich 20% [Ahrendt und Pitt, 2002], was möglicherweise auf vereinzelte, zurückgebliebene Tumorzellen im Resektionsbereich oder entlang der Nervenscheiden beruhen könnte. Die Hauptproblematiken liegen vor allem im Mangel von klinisch einsetzbaren diagnostischen Parametern für eine Früherkennung und dem bisher nur unvollständig aufgeklärten Karzinogenese-Prozess. Die Entwicklung zusätzlicher neuer und innovativer Testsysteme zur sensitiveren und spezifischeren Diagnostik von Pankreaskarzinomen sowie zur Überwachung von Risikogruppen wird daher dringend benötigt.

In einer retrospektiven Studie zu allen Patienten, die in der Chirurgischen Universitätsklinik Göttingen zwischen August 1994 und Mai 2000 wegen eines Pankreaskarzinoms behandelt worden waren, zeigte sich, dass knapp 10% dieser Patienten in einem Zeitraum von bis zu zwei Jahren vor Diagnose des Pankreaskarzinoms wegen unspezifischer Oberbauchbeschwerden einer Cholezystektomie zugeführt worden waren [Ghadimi et al., 2002]. Von entscheidender Bedeutung ist daher die Implementierung einer Diagnostik, welche bereits zum Zeitpunkt der Cholezystektomie bzw. beim Auftreten unspezifischer Oberbauchbeschwerden eine zuverlässige Diagnose bzw. den Ausschluss einer Pankreasneoplasie ermöglicht. Die bisherige Diagnostik mit Ultraschall, Computertomographie und Magnetresonanztomographie lässt lediglich die Detektion schon fortgeschrittener Tumore zu. Auch die endoskopisch-retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) als bildgebende Methode zeigt ihre große Sensitivität und Spezifität von über 90% nur bei fortgeschrittenen Tumoren. Der entscheidende Vorteil der ERCP ist jedoch die Möglichkeit, Sekret bzw. Zellen aus dem Gangsystem des Pankreas zu gewinnen. Da das Gangsystem Ausgangspunkt fast aller exokrinen Pankreaskarzinome ist [Pour u. Moroshi, 1994], wurde bereits wiederholt versucht, durch den Einsatz zytologischer Verfahren die diagnostische Zuverlässigkeit zu erhöhen, jedoch bisher ohne großen Erfolg. Auch unter Zuhilfenahme bekannter genetischer Marker konnte bisher kein entscheidender Fortschritt erzielt werden [Goggins et al., 2000 u. 2007]. Neben der Klärung des Karzinogenese-Prozesses stellen die Überwachung von Risikogruppen und vor allem die konsequente Verbesserung der Früherkennung die vorrangigsten Aufgaben dar.

Die Eigenschaften von Geweben unterscheiden sich in Abhängigkeit ihrer Aufgaben und Herkunft. Im Verlauf der Karzinogenese, also bei der Transformation von Epithel- in Tumorzellen, kommt es zu Veränderungen dieser Eigenschaften auf molekularer Ebene. Entsprechend des untersuchten Materials ist unter Verwendung geeigneter Verfahren somit die Erstellung eines Profils des Genoms, Transkriptoms oder Proteoms möglich. Entscheidend ist hierbei die Klärung der Frage, inwieweit die bekannten Veränderungen eines Tumors im klinischen Alltag benutzt werden können, um die Diagnostik und prognostische Einschätzung dieser Patienten zu verbessern. Die Hybridisierung genspezifischer DNA-Proben auf Gewebeschnitten oder isolierten Zellkernen (Interphase-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, FISH) erlaubt die Untersuchung genetischer Veränderungen auf Einzelzellebene. Für das Harnblasenkarzinom kann zum Beispiel durch die Kombination von vier unterschiedlichen FISH-Sonden (DNA-Sonden für die Centromer-Regionen der Chromosomen 3, 7, 17 sowie für den Gen-Locus *p16*) der Nachweis von Tumorzellen im Urin erreicht werden [Sokolova et al., 2000]. Dabei führt das Auftreten tumorspezifischer chromosomaler Aberrationen zu einer entsprechenden Bindung der Sonden und

somit konsekutiv bei malignen Zellen zu einem entsprechenden Signalbild. Das heute als *UroVision™ Bladder Cancer Kit* (Vysis) kommerziell erhältliche Testsystem war damit der erste FISH-basierte Test für den Nachweis eines soliden Tumors, der die Zulassung der FDA (*Food and Drug Administration, USA*) erhalten hat.

Die Konservierung von Tumor- und Tumor-Grad-spezifischen Mustern von chromosomalen Veränderungen legen nahe, dass sie eine grundlegende biologische Rolle in der Tumorgenese spielen. Möglicherweise besteht diese in der Veränderung der Expression eines oder mehrerer Gene eines aneuploiden Chromosoms als notwendiger Selektionsvorteil in der Tumorgenese. So kann durch das Einbringen eines zusätzlichen Chromosoms in eine immortalisierte Zelllinie gezeigt werden, dass sich die Expression der Gene dieses Chromosoms signifikant erhöht [Upender et al., 2004]. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen aus vergleichbaren Analysen an aneuploiden kolorektalen-, pankreatischen und renalen Karzinomzelllinien überein, in denen das Transkriptionsniveau mit der Zahl der aneuploiden Chromosomen korreliert [Phillips et al., 2001; Mahlamäki et al., 2004].

Heute stellt sich die Frage, ob die chromosomale Instabilität (CIN) den Schlüssel zum Verständnis der Tumorgenese vieler unterschiedlicher Karzinomtypen bildet. Vor einigen Jahren wurde z.B. für das kolorektale Karzinom die Karzinogenese über eine Mutationssequenz (also mit einer zeitlichen Abfolge von Mutationen in bestimmten Genen) parallel zur histomorphologischen Adenom-Karzinomsequenz postuliert [Vogelstein u. Kinzler, 1993]. Inzwischen gibt es jedoch auch Hinweise, dass eine mögliche Ursache für die Karzinogenese beim kolorektalen Karzinom die CIN sein könnte. So konnte auf Basis eines mathematischen Modells gezeigt werden, dass die Entstehung von Darmkrebs durch die Mutation eines CIN-Gens und nicht allein durch die Mutation eines Tumor-Suppressor-Gens (TSG) verursacht werden könnte [Nowak et al., 2002]. Diese Daten stimmen mit Ergebnissen von CGH-Untersuchungen (Komparative Genomische Hybridisierung) an kolorektalen Tumoren überein [Ried et al., 1996 u. 1999; Habermann et al., 2007].

Moderne Hybridisierungs-Techniken wie die CGH oder die Spektrale Karyotypisierung (SKY) zeigen eine bemerkenswert hohe CIN von Pankreaskarzinomen. Der Nachweis von chromosomalen Veränderungen könnte daher sowohl in der Diagnostik des Karzinoms als auch in der Überwachung von Risiko-Patienten einen entscheidenden Beitrag leisten.

1.1 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden prä-neoplastische Läsionen aus Geweben mit chronischer Pankreatitis auf Veränderungen des Ploidiestatus einzelner ausgewählter Chromosomen mit Hilfe der FISH-Technik analysiert. Diese Untersuchungen dienten der Aufklärung des Einsetzens von chromosomaler Instabilität, in Form von Änderungen der Kopiezahl einzelner Chromosomen während der Karzinogenese über die so genannte PanIN-Sequenz. Diese Ergebnisse wurden in Kooperation mit dem Institut für Pathologie am Klinikum Kassel (Priv.-Doz. Dr. med. Ernst Heinmöller und Dr. rer. nat. Meike Werther) durch molekulargenetische sowie immunhistochemische Analysen in diesen Geweben ergänzt. Ziel der Studie war die molekular- und zytogenetische Aufklärung der Mutationsinzidenz und -sequenz im Verlauf der neoplastischen Progression in der PanIN-Sequenz. Weiter sollte anhand für das Pankreaskarzinom typischen genetischen Veränderungen gezeigt werden, ob die PanIN aus Geweben mit chronischer Pankreatitis mit solchen, wie sie in Geweben mit Pankreaskarzinomen gefunden werden, vergleichbar sind. In der Fortführung wurde auf Basis der im ersten Teil erhaltenen zytogenetischen Daten ein Set von FISH-Sonden hergestellt um diese auf ihre Tauglichkeit in der Früherkennung des Pankreaskarzinoms im klinischen Kontext zu überprüfen. Das Ziel war die Erzeugung eines Sets von FISH-basierten Biomarkern für den Einsatz an endoskopisch gewonnenen zytologischen Präparaten aus dem Pankreas. Hierbei sollte die Zuverlässigkeit der selbst generierten Sonden und ihre Verwendbarkeit im klinischen Umfeld für die Frühdiagnostik des Pankreaskarzinoms bzw. die Risikoabschätzung von Patienten mit chronischer Pankreatitis überprüft werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Histologisches Progressionsmodell

Die Zellen des duktales Adenokarzinoms der Bauchspeicheldrüse (PDAC) besitzen morphologische Ähnlichkeit zu den duktales Epithelzellen des Pankreas. Dies ist der Grund, weshalb die Zellen des Epithels der Ausführungsgänge zum heutigen Stand der Forschung als Ursprung für die Entwicklung des PDAC angesehen werden [Hilgers u. Kern, 1999; Bardeesy u. DePinho, 2002]. Zahlreiche Studien konnten belegen, dass sich PDAC durch fortgesetzte karzinogene Stimulationen aus intraduktalen prä-karzinösen Läsionen entwickeln, die sich durch einen schrittweisen Anstieg von Veränderungen der Histoarchitektur und Zell- oder Kernmorphologie auszeichnen [Sommers et al., 1954; Cubilla u. Fitzgerald, 1976; Kozuka et al., 1979; Klöppel et al., 1980]. In den letzten Jahren konnte ein einheitliches histologisches Progressionsmodell für PDAC geschaffen werden, welches eine Einteilung der prä-neoplastischen Läsionen in verschiedene Stufen ermöglicht. Diese Nomenklatur legt eindeutige morphologische Veränderungen der Epithelzellen zugrunde und differenziert zwischen Normalgewebe, PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2 und PanIN-3 (PanIN: **pan**creatic **in**traepithelial **n**eoplasia) [Kern et al., 2001; Hruban et al., 2001].

Es werden hyperplastische flache PanIN-1A-Läsionen, hyperplastische papilläre PanIN-1B-Läsionen sowie dysplastische PanIN-2- und PanIN-3-Läsionen unterschieden (Abbildung 1). Das PanIN-2-Stadium weist im Gegensatz zum PanIN-1-Stadium Anomalien des Zellkerns auf, das PanIN-3-Stadium entspricht einem intraepithelialen Tumor, der die Basalmembran noch nicht durchbrochen hat, d.h. einem *Carcinoma in situ*.

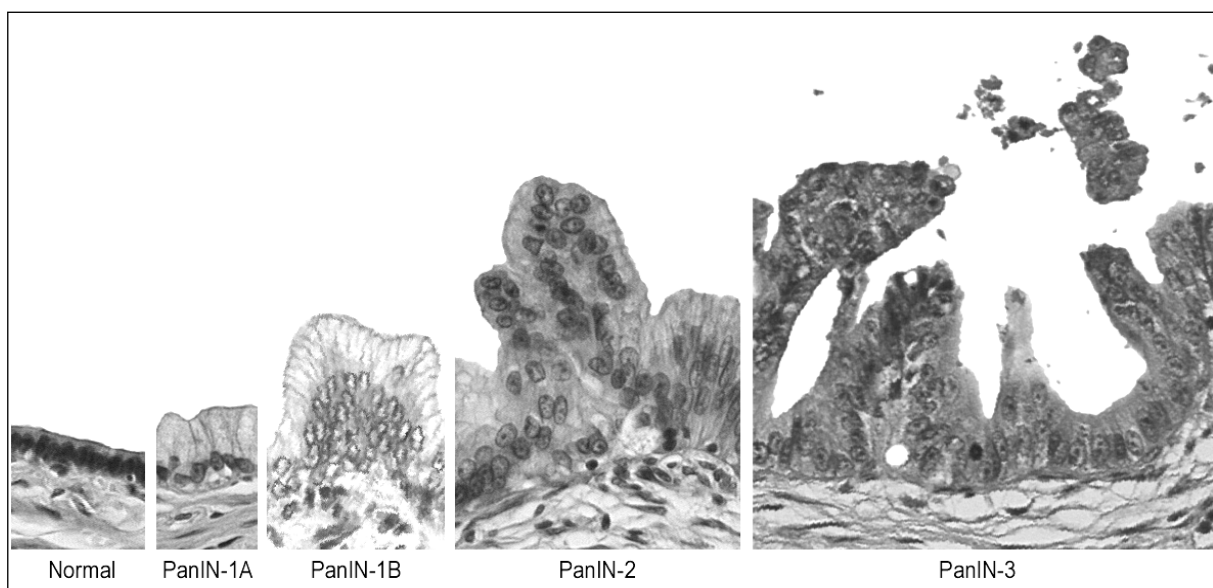


Abbildung 1. Histologische Veränderungen in der PanIN-Sequenz. Dargestellt sind Bildausschnitte der jeweiligen PanIN-Stadien. Originalaufnahmen sind HE gefärbt und bei 400x Vergrößerung fotografiert [Originalaufnahmen mit freundlicher Genehmigung von E. Heinmöller].

2.2 Genetische Progression

Parallel zur histologischen Progression des PDAC sind genetische Veränderungen, ähnlich der Adenom-Karzinom-Sequenz beim Kolonkarzinom, auch für die Epithelzellen des Pankreas beschrieben worden. Die Mehrzahl der Pankreaskarzinome zeigen Veränderungen in Onkogenen wie *KRAS*, *EGFR* und *Her2*, sowie in den Tumor-Suppressor-Genen (TSG) *CDKN2A*, *P53*, *DPC4* und *BRCA2*. Entsprechend des histologischen Progressionsmodells können diese Veränderungen zeitlich bestimmten PanIN-Läsionen zugeordnet werden. So sind *KRAS*-Mutationen und Expression von *EGFR* und *Her2* frühe Veränderungen, die bereits in PanIN niedrigen Grades auftreten. In hochgradigen PanIN kann dagegen der Verlust von TSG wie *CDKN2A*, *p53*, *DPC4* und *BRCA2* beobachtet werden [Hruban et al., 2000; Bardeesy u. DePinho, 2002].

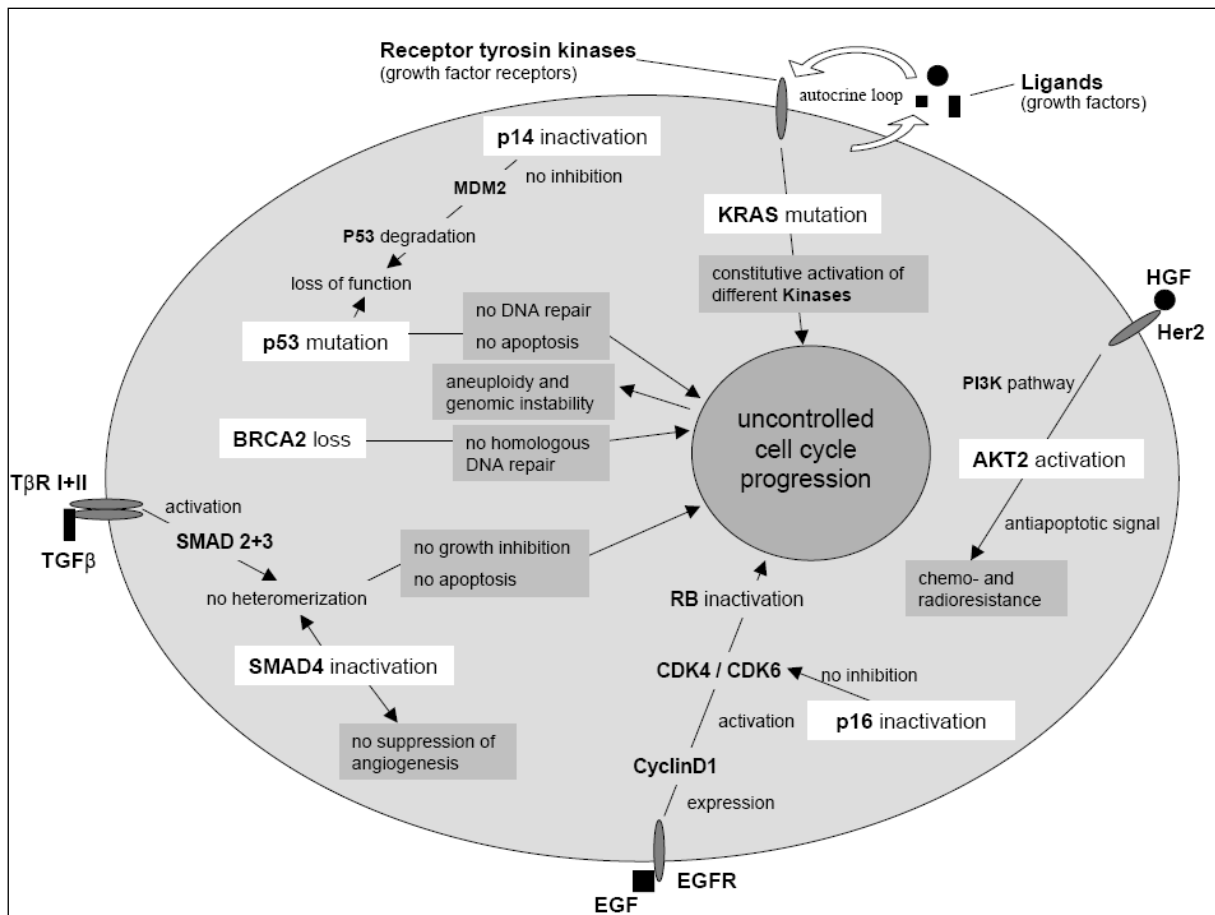


Abbildung 2. Schematische Darstellung der wichtigsten *Pathways* in der Entwicklung von PDAC. Veränderungen in *KRAS*, *EGFR* und *Her2* treten bereits in PanIN niedrigen Grades auf. In hochgradigen PanIN kann dagegen der Verlust von TSG wie *CDKN2A*, *p53*, *DPC4* und *BRCA2* beobachtet werden. Die weißen Rechtecke stellen Schlüsselereignisse dar, die grauen Rechtecke die daraus resultierenden Konsequenzen, welche zum Verlust der Zellzyklus-Kontrolle führen können [Baumgart et al., 2005].

KRAS ist ein kleines GTP bindendes Protein, welches als Transducer in vielen Signalwegen zwischen membrangebundenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie TGFR, VGFR, EGFR oder HER2, und zyttoplasmatischen Kinasen eingebunden ist. Durch Mutation verliert das Protein seine GTPase-Funktion und damit die Fähigkeit der Selbstdeaktivierung. Die Folge ist eine kontinuierliche Stimulation unterschiedlicher Signalwege mit einer Reihe von zellulären Effekten, wie z.B. die Induktion der DNA-Synthese und Proliferation. Zellen mit einer *KRAS*-Mutation haben einen Wachstumsvorteil durch die parakrine und/oder autokrine Expression von Entzündungsfaktoren wie $TGF\alpha$ und EGF und deren Rezeptoren. Fast alle *KRAS*-Mutationen in den Gängen des Pankreas betreffen Codon 12, solche in Codon 13 oder 61 sind dagegen selten [Wilentz et al., 2000a]. Mutationen finden sich bereits in normalem Epithel (19-38%) und in Gewebe mit chronischer Pankreatitis (18-62,5%) [Rivera et al., 1997; Berger et al., 1999; Lüttges et al., 1999 und 2000]. Die Mutationsrate steigt mit fortschreitender Dysplasie, so dass nahezu alle PDAC durch Mutationen in *KRAS* gekennzeichnet sind [Bardeesy u. DePinho, 2002].

EGFR (*epidermal growth factor receptor*) und **Her2** (*heregulin receptor*) gehören zur *ErbB*-Familie. Alle Rezeptoren dieser Gen-Familie sind Transmembranproteine mit zwei Cysteinreichen Regionen in der extrazellulären Domäne und einer Tyrosin-Kinase-Domäne im zytoplasmatischen Teil. Das *Her2*-Gen liegt auf Chromosom 17q21.2 und ist in vielen soliden Tumoren amplifiziert und überexprimiert [Slamon et al., 1987; Day et al., 1996]. In Karzinomen des Pankreas kann die Überexpression von Her2 bereits in den frühen morphologischen Gangveränderungen gefunden werden und liegt im Karzinom zwischen 21% und 80% [Day et al., 1996; Apple et al., 1999; Safran et al., 2002; Zhang u. Yuan, 2002]. Das *EGFR*-Gen liegt auf Chromosom 7p12. EGFR wird in normalem pankreatischem Gewebe nicht exprimiert, kann aber in ca. 50% der PDAC gefunden werden [Poch et al., 2001; Zhang u. Yuan, 2002; Tobita et al., 2003]. Die Expression von EGFR steht im Zusammenhang mit Metastasierung, besonders in die Leber (26% der Patienten ohne und 64% der Patienten mit Metastasen zeigen EGFR Expression) und wird darüber hinaus häufiger bei Männern (48%) als bei Frauen (17%) beobachtet [Tobita et al., 2003].

CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) ist auf Chromosom 9p21 lokalisiert und kodiert für zwei TSG durch verschiedene erste Exons und unterschiedliche *reading frames* in den gemeinsamen folgenden Exons [Sherr, 2001]. Das erste Produkt ist p14^{ARF} und inhibiert MDM2, welches für den proteolytischen Abbau von p53 verantwortlich ist. Das zweite Produkt ist p16 welches die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 inhibiert und somit der Inaktivierung des RB-Proteins entgegenwirkt. Der Verlust von beiden Genprodukten führt zur Inaktivierung von RB und p53 [Sherr, 2001]. Bereits in 30% der PanIN-1A- und B-Läsionen können inaktivierende Mutationen im *p16*-Gen gefunden werden [Wilentz et al.,

1998; Heinmöller et al., 2000; Lüttges et al., 2001]. Der Verlust von beiden Genprodukten des CDKN2A Locus durch Mutation, Deletion oder Promotor-Hypermethylierung kann in fast allen Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden [Schutte et al. 1997; Rozenblum et al., 1997].

P53 ist lokalisiert auf Chromosom 17p13. Als „Wächter des Genoms“ sorgt es durch Zellzyklus-Kontrolle für die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität [Lane, 1992]. P53 überwacht die DNA auf Schädigungen und kann den Zellzyklus stoppen, um entweder eine DNA-Reparatur einzuleiten oder, im Fall von schweren Schäden, Apoptose zu induzieren [Kastan et al., 1995]. Darüber hinaus kontrolliert p53 als Transkriptionsfaktor die Expression von wachstumsinhibierenden Genen wie z. B. *p21^{CIP}*, *GADD45* oder *IGFBP3* [Ko u. Prives, 1996]. Mutationen in *p53* können in ca. 50% aller humanen Tumore und in bis zu 81% der PDAC gefunden werden [Rozenblum et al., 1997, Heinmöller et al., 2000]. Der Verlust der Funktion von p53 resultiert in der Regel aus einer *missense* Mutation in einem Allel und dem Verlust (*loss of heterozygosity*, LOH) des anderen [Lüttges et al., 2001]. Daraus folgt die Akkumulierung weiterer DNA-Schäden, welche zu genomischer Instabilität und der Entwicklung von Krebs führen können [Hainaut u. Hollstein, 2000]. Die Fähigkeit der DNA-Bindung ist dabei die wichtigste Voraussetzung der Tumor-Suppressor-Funktion von p53, welche in allen humanen Tumoren verloren ist. Dabei genügt eine Mutation in nur einem Allel zum vollständigen Funktionsverlust, da das wild-typ p53 durch Komplexbildung mit der mutierten Form deaktiviert wird [Kern et al., 1992]. Zudem ist die proteolytische Deaktivierung von mutiertem p53 verzögert, so dass es sich in den Zellen anreichert. Mutiertes p53 kann in PanIN-3-Läsionen mit einer Frequenz von 41% gefunden werden, wohingegen LOH bereits mit einer Frequenz von 13% bis 18% in PanIN-1 Läsionen darstellbar ist [Heinmöller et al., 2000; Lüttges et al., 2001].

Das Gen **DPC4** (*deleted in pancreatic cancer, locus 4*) ist auf Chromosom 18q21 lokalisiert und auch unter dem Namen **SMAD4** bekannt [Hahn et al., 1996]. Ein Verlust des Gen-Locus ist eine der häufigsten chromosomalen Veränderungen beim Pankreaskarzinom. Als Mitglied der SMAD-Gen-Familie ist es an der TGFβ (*Transforming-Growth-Factor-Beta*) vermittelten Weitergabe von Wachstums- und Differenzierungssignalen beteiligt. TGFβ inhibiert in den meisten humanen Geweben die Zellproliferation, unter anderem durch Induktion der Transkription des Plasminogen-Activator-Inhibitor-1 (PAI-1) und von Inhibitoren Cyklin-abhängiger Kinasen, wie z.B. p15^{ink4b} und p21^{CIP}. Eine Störung dieses Signalweges führt zu unkontrolliertem Wachstum und zur Krebsentstehung [Heldin et al., 1997; Dai et al., 1998]. Durch Bindung von TGFβ an die TGFβ-Typ-I- und II-Rezeptoren werden SMAD2 und 3 phosphoryliert und bilden einen heterogenen Komplex mit SMAD4. Dieser transloziert in den

Nukleus und fungiert als Transkriptionsfaktor [Heldin et al., 1997]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass DPC4 die Angiogenese unterdrücken kann [Schwarte-Waldhoff et al., 2000]. Ein Verlust von *DPC4* kann in ca. 60% der PDAC gefunden werden, davon in ca. 30% durch homozygote Deletion beider Allele [Heinmöller et al., 2000; Lüttges et al., 2001]. Immunhistochemische Untersuchungen können keinen Expressionsverlust in frühen PanIN nachweisen [Wilentz et al., 2000b]. Ein Verlust von DPC4 ist häufiger in PanIN-3-Läsionen zu finden als in PanIN-2, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen PanIN-3 und einem invasiven Karzinom festgestellt werden kann [Heinmöller et al., 2000; Lüttges et al., 2001].

Das **BRCA2** (*breast cancer 2*) Gen ist auf Chromosom 13q lokalisiert und kodiert für ein Protein, welches die homologe Reparatur der DNA reguliert und dadurch zum Erhalt der genomischen Stabilität beiträgt. BRCA2-defiziente Zellen akkumulieren chromosomale Aberrationen [Ventikaraman, 2002]. Patienten mit einer Keimbahnmutation haben eine familiäre Veranlagung für die Entwicklung von Ovar- und Mammakarzinomen in bereits jungen Jahren [Goggins et al., 1996]. Zusätzlich erhöhen Keimbahnmutationen das Risiko für die Entwicklung von Pankreaskarzinomen, wobei jedoch das Alter des Auftretens sowie der klinische Verlauf dem von sporadisch auftretenden Pankreaskarzinomen entspricht [Goggins et al., 1996]. *BRCA2* ist in circa 7% der sporadisch auftretenden Karzinome inaktiviert. Der Verlust beider Allele kann bereits in PanIN-3-Läsionen beobachtet werden [Goggins et al., 2000].

AKT2 (*v-akt murine thymoma viral oncogene homologue 2*) ist ein weiteres Gen mit onkogener Funktion. Das Gen ist auf Chromosom 19q13 lokalisiert und ist ein Effektor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PIK3), welche durch EGF, PDGF und FGF aktiviert wird [Friess et al., 1996]. AKT2 ist in circa 20% der PDAC amplifiziert und überexprimiert [Ruggeri et al., 1998]. Eine durch Phosphorylierung verursachte Aktivierung ist in 59% der PDAC messbar und mit einer Her2 Überexpression assoziiert [Schlieman et al., 2003]. Eine konstitutive Aktivierung von AKT2 verursacht ein anti-apoptotisches Signal in Krebszellen und vermittelt dadurch eine Chemo-Radioresistenz [Schlieman et al., 2003]. Zusätzlich steht es im Zusammenhang mit einer Expressionserhöhung des IGF-IR (*Insulin-like-Growth-Factor-I-Rezeptor*) und kann die Invasivität von Pankreaskarzinomen erhöhen [Tanno et al., 2001].

cMYC (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*) ist ein auf Chromosom 8q24 lokalisiertes Proto-Onkogen, welches in vielen humanen Krebserkrankungen überexprimiert ist [Oster et al., 2002]. Es fungiert als Transkriptionsfaktor. Die Expression einer großen Zahl von Genen wird dabei durch die Bindung an "Enhancer-Box"-Sequenzen

(E-Boxes) und die Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen (HAT) reguliert. Die MYC-Familie von Transkriptionsfaktoren, zu der auch N-MYC und L-MYC gehören, besitzen eine bHLH/LZ (basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper) Domäne [Grandori u. Eisenman, 1997]. MYC wird durch unterschiedliche mitogene Signale wie z.B. Wnt und EGF aktiviert. Es hat einen Einfluss auf viele zelluläre Prozesse, wie z.B. Proliferation (durch die Expressionserhöhung von Cyclinen und die Expressionserniedrigung von p21), Zellwachstum (durch die Expressionserhöhung von ribosomaler RNA), Apoptose (Expressionserhöhung von Bcl-2) und Differenzierung [Menssen u. Hermeking, 2002]. Eine Amplifikation von 8q23-ter ist eine der häufigsten chromosomalen Anomalien beim Pankreaskarzinom [Schleger et al., 2000; Mahlamäki et al., 1997 u. 2002]. Eine Überexpression des Proteins kann in 43-72% von Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden [Schleger et al., 2002; Han et al., 2002; Li u. Ji, 2003]. Dabei zeigt sich eine Korrelation zwischen Expression und dem Tumorgrad [Schleger et al., 2002]. Eine erhöhte Anzahl an Kopien von *MYC* wird in ca. 51% der Pankreaskarzinome festgestellt, davon in ca. 33% der untersuchten Karzinome durch Amplifikation des Gen-Locus und in ca. 19% durch eine erhöhte Anzahl des gesamten Chromosoms [Schleger et al., 2002]. Es existiert jedoch nur ein geringer Zusammenhang zwischen einer erhöhten Kopienzahl und einer erhöhten Expression [Schleger et al., 2002].

AIB1 (*amplified in breast cancer 1*) ist auf Chromosom 20q lokalisiert. Das Gen gehört zur p160 / Steroid-Rezeptor-Koaktivator (SRC) Familie und ist in vielen soliden Tumoren amplifiziert [Anzick et al., 1997; Gnanapragasm et al., 2001; Ghadimi et al., 1999; Sakakura et al., 2000]. AIB1 erhöht die transkriptionelle Aktivität einer Zahl von nukleären Rezeptoren *in vitro* [Anzick et al., 1997; Li u. Chen, 1998; Suen et al., 1998]. In Mammakarzinomen ist die AIB1-Überexpression mit der Expression von P53 und Her2 positiv korreliert [Bouras et al., 2001]. Eine Amplifikation und Überexpression von AIB1 konnte an Pankreaskarzinom-Zelllinien gezeigt werden [Ghadimi et al., 1999]. Im normalen Pankreasgewebe findet sich keine AIB1-Expression. Dagegen kann in Geweben mit einer chronischen Pankreatitis sowie in PanIN-1 mit einer Frequenz von 14 bzw. 23% eine Expression gefunden werden, welche in PanIN-3 und Karzinomen auf eine Frequenz von 65% ansteigt. Eine Erhöhung in der Anzahl von Genkopien kann in 37% der Karzinome nachgewiesen werden [Henke et al., 2004].

2.3 Epigenetische Veränderungen

Eine weitere Ursache einer veränderten Genexpression in der Entwicklung des PDAC ist DNA-Methylierung. Etwa 50% der humanen Gene haben Promoter-Cytosinphospho-Guanin 5'CpG-Islands, in der 5' regulatorischen Region der Gene. Eine Methylierung dieser Region

resultiert in einer transkriptionellen Deaktivierung von TSG und eine Demethylierung kann eine Expression von Onkogenen verursachen. Die Methylierung der Promotor-Regionen unterschiedlicher Gene (z.B. *p16*, *RB*, *VHL*, *hMLH1*, *hMLH2*) wird auch in Pankreaskarzinomen gefunden [Ueki et al., 2000; Sato et al. 2003a]. Ebenso kann eine Demethylierung von in PDAC hoch exprimierten Genen (*claudin4*, *lipocalin2*, *14-3-3 σ* , *trefoil factor2*, *S100A4*, *mesothelin* und *prostate stem cell antigen*) nachgewiesen werden, die in normalem Pankreasgewebe aufgrund der Methylierung ihrer Promotor-Region nicht exprimiert werden [Sato et al. 2003b]. Neben *p16* liegt auch das Gen Preproenkephalin (*ppENK*), welches eine Wachstums-inhibierende Funktion besitzt, in circa 90% der Pankreaskarzinome methyliert vor [Ueki et al., 2001]. Die Methylierung von Genen mit einer wichtigen Rolle in der Karzinogenese kann bereits früh im Verlauf der Krebsentstehung gefunden werden. Die Methylierung von *p16* steigt von 12% in PanIN-1A auf 21,4% in PanIN-3-Läsionen. In diesen Läsionen steigt dagegen die Methylierung von *ppENK* von 7,7% auf 46,2%. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Methylierungen der CpG-Inseln bereits in PanIN frühen Grades beginnen und während der neoplastischen Progression ansteigen [Sato et al., 2008]. Die Anzahl an methylierten Loci steigt mit der Größe des Tumors und dem Alter des Patienten [Fukushima et al., 2002; Ueki et al., 2001; Sato et al., 2008]. In normalem Gewebe finden sich dagegen keine Methylierungen [Fukushima et al., 2002].

2.4 Chromosomale Instabilität

Die Mehrzahl der soliden Tumoren weist Veränderungen in der Zahl und Struktur von Chromosomen auf [Lengauer et al., 1997; Duesberg u. Li, 2003; Rajagopalan u. Lengauer 2004]. Hierbei wird zwischen einem normalen (diploiden) DNA-Gehalt und einem alterierten (aneuploiden) DNA-Gehalt, der entweder zuviel oder zuwenig DNA im Zellkern aufweist, unterschieden. Durch die Entwicklung der molekularen Zytogenetik und insbesondere moderner FISH-Techniken wie der CGH, SKY oder Interphase-FISH können strukturelle Veränderungen des Genoms deutlich genauer untersucht werden.

Adenokarzinome des Pankreas sind im hohen Maße aneuploid und genetisch heterogen. Sie besitzen eine ausgeprägte chromosomale Instabilität (CIN) welche durch einen hohen ANCA (*average number of copy alterations*) mit Werten von bis zu 22, dem höchsten Wert für solide Tumoren, wiedergegeben wird [Griffin et al., 1995; Gorunova et al., 1998; Ghadimi et al., 1999; Ried et al., 1999]. Es zeigen sich häufig Verluste genetischen Materials auf den Chromosomen 8p, 9p, 17p, 18q, 19p und 21 und Gewinne auf 3q, 5p, 7p, 8q, 12p und 20q [Solinas-Toldo et al., 1996; Ghadimi et al., 1999; Mahlamaki et al, 2002; Harada et al., 2002 u. 2008]. Diese chromosomalen Verluste und Gewinne zeigen eine bemerkenswerte Frequenz in bis zu 90% der untersuchten Pankreaskarzinome (Abbildung 3). Dabei werden Veränderungen bestimmter chromosomaler Regionen mit einer hohen Rekurrenz und

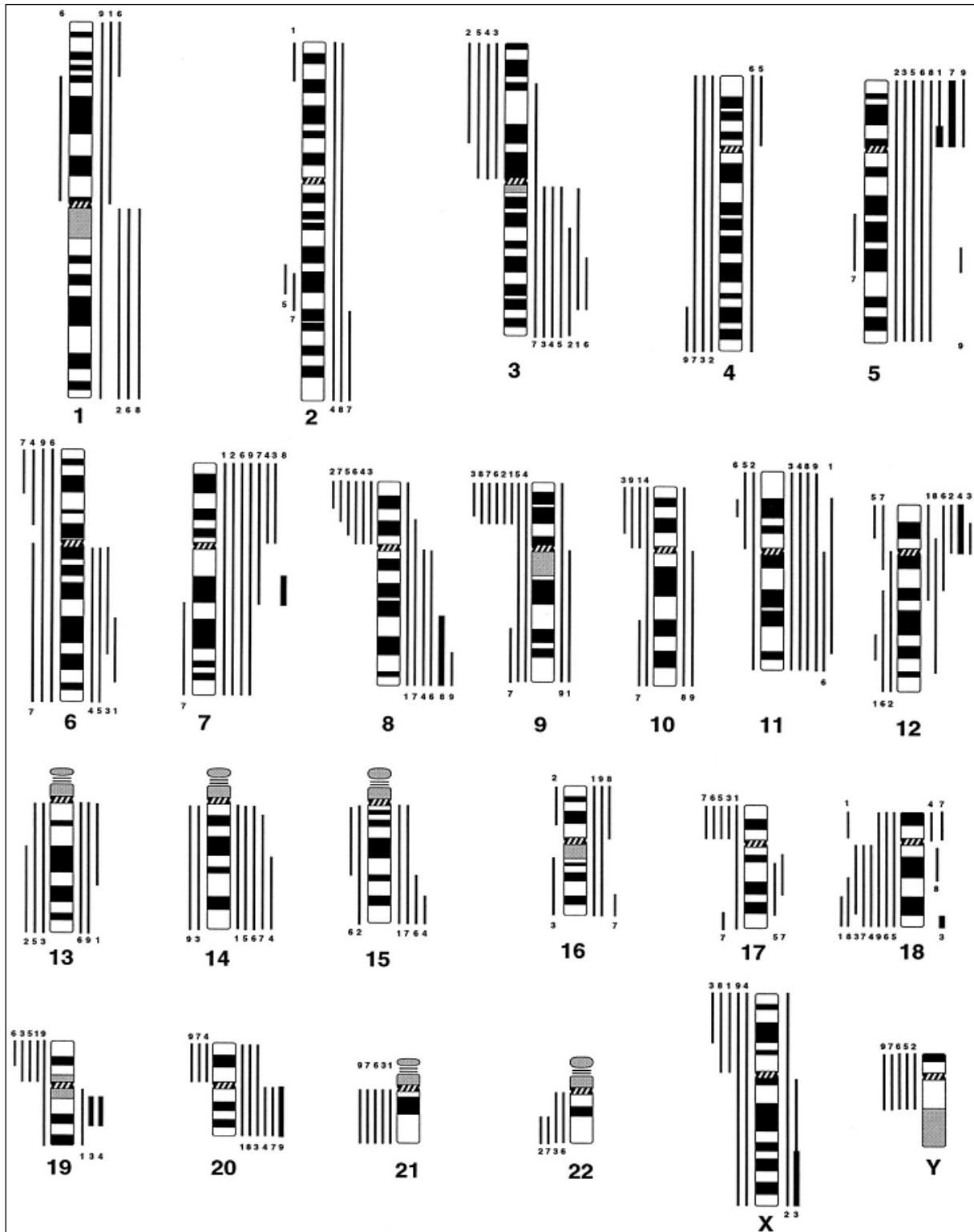


Abbildung 3. Ideogramm von chromosomalen Gewinnen und Verlusten in neun Pankreaskarziom-Zelllinien ermittelt durch CGH. Vertikale Linien auf der linken Seite von jedem Ideogramm repräsentieren Verluste von genetischem Material, die auf der rechten Seite stehen dagegen für Gewinne. Regionen mit Amplifikationen sind durch dicke Linien gekennzeichnet. Die Zelllinien können durch die Nummern an den Linien identifiziert werden: 1: BxPC-3, 2: MIA-PaCa-2, 3: PANC-1, 4: SU.86.86, 5: CFPAG-1, 6: Capan-2, 7: Capan-1, 8: AsPC-1, 9: Hs766T. [Ghadimi et al., 1999]

korrelieren mit denen von schon bekannten Onkogenen (z.B. 7p für *EGFR*, 8q für *cMYC*, 12p für *KRAS* oder 20q für *AIB1*) oder TSG (z.B. 9p für *p16* oder 17p für *p53* oder 18q für *DPC4*). Die große Häufigkeit, mit der Veränderungen in diesen Loci zu finden sind, macht diese möglicherweise zu attraktiven Regionen, um sie als zytogenetische Marker zu verwenden.

Als Ursache für die CIN beim Pankreaskarzinom werden neben DNA-Schädigung durch oxidativen Stress [Moskovitz et al. 2003] auch extreme Telomerverkürzungen [van Heek et al., 2002] und Centrosomen-Anomalien [Sato et al., 1999 u. 2001; Zhu et al., 2005] in Betracht gezogen. Der Zusammenhang von abnehmender Telomerlänge und der Akkumulation von chromosomalen Anomalien kann an Pankreaskarzinomen gezeigt werden [Gisselson et al., 2000 u. 2001]. Untersuchungen der Telomerlängen von prä-neoplastischen Läsionen im Pankreas zeigen bereits in 91% der frühesten Läsionen (PanIN-1A) kritisch verkürzte Telomere. Normale Epithelzellen aus gesundem Gewebe zeigen dagegen keine Telomerverkürzungen [van Heek et al., 2002]. Die Telomerreduktion ist derzeit die früheste nachweisbare genetische Veränderung. Daraus ließe sich ableiten, dass wiederkehrende Zyklen von Entzündung und Regeneration und der damit einhergehenden Proliferation, zur Verkürzung der Telomere in den Epithelzellen und dadurch zum Entstehen der CIN beitragen. Diese stellt eine mögliche Verbindung zwischen Pankreatitis und Pankreaskarzinomen her und lässt vermuten, dass die CIN ein frühes Ereignis in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms ist.

2.5 Tiermodelle

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Tiermodellen generiert, die die Entwicklung des PDAC im Menschen widerspiegeln [Guerra et al., 2007]. Die meisten dieser Modelle beinhalten die Expression des mutierten *KRAS*-Onkogens [Aguirre et al., 2003; Brembeck et al., 2003; Grippo et al., 2003; Hingorani et al., 2003; Tuveson et al., 2006]. Lediglich das Modell aus der Arbeitsgruppe von Hingorani et al. zeigt das vollständige Spektrum von PanINs und PDAC, wie sie beim Menschen gefunden werden [Guerra et al., 2007]. In diesem Modell ist die Expression des mutierten *KRAS*^{G12D} bereits im embryonalen Stadium der Pankreasentwicklung in allen Zelltypen des Pankreas vorhanden [Hingorani et al., 2003]. Weitere Studien, die versuchten den Zelltyp zu identifizieren, der für die Entwicklung des PDAC verantwortlich ist, ergeben bisher keine eindeutige Information [Guerra et al., 2007]. So kann beispielsweise die Expression von onkogenem *KRAS* in duktalem Zellen des Pankreas, unter der Kontrolle des für duktalem Zellen spezifischen Cytokeratin 19 Promoters, keine PanIN oder PDAC induzieren [Brembeck et al., 2003]. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass sich das Pankreaskarzinom entweder aus einer Form von Vorläufer- oder Stammzelle oder durch Metaplasie aus anderen differenzierten Zelltypen des Pankreas

entwickelt [Means et al., 2005; Guerra et al., 2007]. In Modellen, in denen das *KRAS*-Onkogen ausschließlich in Azinus-Zellen exprimiert wird, entwickeln sich entweder keine hochgradigen PanINs oder nur Tumore, die nicht die grundlegenden Eigenschaften von humanen PDAC aufweisen [Grippio et al., 2003; Tuveson et al., 2006]. Die kontrollierte Expression von *KRAS*^{G12V} in Azinus- und Centroazinären-Zellen erzeugte dagegen das vollständige Spektrum von PanINs und PDAC [Hruban et al., 2006]. Darüber hinaus ermöglicht das in dieser Studie verwendete Mausmodell, die Expression zeitlich genau zu kontrollieren. Dabei zeigt sich, dass die Expression von mutiertem *KRAS* in adulten Mäusen allein nicht in der Lage ist, PanINs oder PDAC zu induzieren [Guerra et al., 2007]. Es kann aber gezeigt werden, dass sich durch Induktion von chronischer Pankreatitis in diesen adulten Mäusen das vollständige Spektrum von PanINs und invasivem PDAC entwickelt [Guerra et al., 2007]. Indikativ für die chronische Pankreatitis sind neben azinären Atrophien, azinär-duktales Metaplasien (ADM) und in ca. 50% der Mäuse fokale und diffuse PanIN niederen Grades, wie sie bei Menschen mit chronischer Pankreatitis beobachtet werden können [Guerra et al., 2007]. Diese Studie legt nahe, dass humane PDAC durch die Kombination aus mutiertem *KRAS* und exogenen Noxen, die Gewebsschäden und inflammatorische Reaktionen verursachen, begünstigt werden [Guerra et al., 2007].

Die Kombination von *KRAS*-Mutationen mit weiteren bereits beschriebenen PDAC-typischen Mutationen, wie z.B. Deletion oder Inaktivierung von *p53*, *CDKN2A*, *DPC4*, *TGF β R2*, sowie die Aktivierung des Hedgehog-Signalweges, verursacht eine signifikante Beschleunigung der Tumorentwicklung. In einigen Fällen ist die Tumorentwicklung mit der Entwicklung von metastatischen Eigenschaften verbunden [Aguirre et al., 2003; Bardeesy et al., 2006; Hingorani et al., 2005; Ijichi et al., 2006; Pasca di Mogliano et al., 2006; Guerra et al., 2007].

In einem weiteren Modell wird der Einfluss des Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K) Signalwegs durch den pankreasspezifischen *knock-out* von *PTEN*, einem Negativregulator von PI3-K, untersucht [Stanger et al., 2005]. Diese *knock-out*-Mäuse zeigen einen fortschreitenden Austausch von Azini durch hoch proliferative duktales Strukturen, in denen starke Produktionen von Muzinen und Expression von PDX1 und HES1 (zwei Marker für embryonale Pankreas-Vorläuferzellen) gefunden werden. In einigen dieser Tiere entwickelten sich maligne duktales Tumore. Darüber hinaus zeigt sich, dass die azinär-duktales Metaplasie in diesem Modell eher durch die Expansion von Centroazinärenzellen ausgelöst wird, als durch Transdifferenzierung von Azinus-Zellen [Stanger et al., 2005]. Diese Daten legen nahe, dass die Balance zwischen unterschiedlichen Zelltypen im adulten Pankreas durch die Regulation des PI3-K-Signalwegs kontrolliert wird und eine Deregulation zur Initiierung des PDAC beiträgt [Stanger et al., 2005].

2.6 Diagnostik

Die geringe Überlebensrate von Patienten mit einem Pankreaskarzinom ist hauptsächlich mit dem bereits fortgeschrittenen Tumorstadium der meisten Patienten (ca. 85%) zum Zeitpunkt der Diagnose verbunden [Goggins, 2007]. Während die Überlebensraten in Patienten mit Karzinomen in frühen Stadien (T1 oder T2N0) höher sind als in fortgeschrittenen Stadien, finden sich diese frühen Stadien nur in ca. 15% der resektablen Tumore [Yeo et al., 1998; Tascilar et al., 2001]. Daher ist die Verbesserung der Frühdiagnostik der wesentliche Faktor um die Mortalität des Pankreaskarzinoms zu senken. Dies ist jedoch dadurch erschwert, dass die Entwicklung des Pankreaskarzinoms zumeist bis zu einem späten Zeitpunkt ohne spezifische Symptome verbunden ist, so dass diese Patienten nicht frühzeitig einer geeigneten Diagnostik zugeführt werden können [Rosty u. Goggins, 2002; Goggins, 2007]. Der Einsatz konventioneller bildgebender Verfahren, wie z.B. Computer-Tomographie oder Endosonographie ist nur nützlich um die Lokalisation und die Ausdehnung einer Neoplasie und deren Resektabilität zu bestimmen. Bildgebende Verfahren allein sind dabei von sehr begrenztem Nutzen, das maligne Potential oder die Art der Neoplasie zu bestimmen [Chen et al., 2001; Tascilar et al., 2001; Jhala et al., 2003]. In Patienten mit einem Verdacht auf ein Karzinom der Bauspeicheldrüse sind diese Verfahren nicht in der Lage, zwischen einem Pankreaskarzinom und chronischer Pankreatitis oder benignen Pankreaszysten zu differenzieren [Goggins, 2007]. Aus diesem Grund werden große Anstrengungen unternommen, geeignete Marker zu identifizieren, um die Diagnostik des Pankreaskarzinoms zu verbessern.

Der derzeit gebräuchlichste Serum-Marker ist das sialylierte Lewis-a-Antigen CA19-9. Es wird für die Überwachung des Therapieerfolges und der Rekurrenz sowie zur prognostischen Einschätzung des PDAC verwendet [Ziske et al., 2003; Ferrone et al., 2006; Kilic et al., 2006]. Allerdings finden sich erhöhte CA19-9-Werte auch im Zusammenhang mit anderen benignen und malignen Erkrankungen, wie z.B. der chronischen Pankreatitis oder Erkrankungen der Gallengänge. Bis zu etwa 40% der Patienten mit chronischer Pankreatitis haben erhöhte CA19-9-Werte [Rosty u. Goggins, 2002]. Dagegen zeigen nur etwa 65% der Patienten mit einem resezierbaren Pankreaskarzinom erhöhte CA19-9-Werte [Goggins, 2007]. Darüber hinaus exprimieren 5-10% der Menschen keine Lewis-Antigene [Steinberg, 1990; Lamerz, 1999; DiMagno 1999]. Daher wurde von der *American Society of Oncology* (ASCO) empfohlen, CA19-9 nicht für den diagnostischen Einsatz zu verwenden [Locker et al. 2006].

Eine neuere Studie zeigte, dass MIC-1 (*macrophage inhibitory cytokine 1*) im Serum ein sensitiverer Marker ist als CA19-9 [Koopmann et al., 2004]. In 90% der Patienten mit resektablen Pankreaskarzinomen werden signifikant höhere MIC-1-Werte gemessen, als in

gleichaltrigen gesunden Kontrollen; dagegen zeigen nur 62% erhöhte Werte für CA19-9. Darüber hinaus kann eine Erhöhung des MIC-1-Serum-Wertes in 86% der Patienten mit T1- oder T2-Tumoren nachgewiesen werden. CA19-9 ist hingegen nur in 29% dieser Fälle erhöht [Koopmann et al., 2004]. MIC-1 ist dabei nicht sensitiver in der Differenzierung zwischen Pankreaskarzinomen und chronischer Pankreatitis als CA19-9. Durch sein früheres Ansprechen auf T1- und T2-Tumore könnte MIC-1 jedoch in der Frühdiagnostik für Hoch-Risiko-Gruppen, wie z.B. Menschen mit einer familiären Prädisposition für Pankreaskarzinome, als Teil eines Screening-Protokolls nützlich sein [Brentnall et al., 1999; Canto et al., 2004].

Aufgrund ihrer geringen Größe und ihrem nicht-invasiven Wachstum besteht das Problem, dass sich mikroskopische prä-kanceröse Läsionen wie PanIN vermutlich nicht über Marker im Serum nachweisen lassen [Goggins, 2007]. Im Pankreassekret befinden sich hingegen eine Vielzahl von potentiellen Biomarkern für die Detektion eines Karzinoms oder einer prä-kancerösen Läsion. Pankreassekret kann im Rahmen einer ERCP durch Aspiration gesammelt werden und bei Bedarf durch den Einsatz einer Zytologiebürste ergänzt werden. Die Bürstenzytologie ist inzwischen die bevorzugte Methode um eine Gewebe-basierte Diagnose in Patienten mit Verengungen der Pankreas- und Gallengänge zu erhalten [Mansfield et al., 1997; Selvaggi, 2004]. Die diagnostische Spezifität ist sehr hoch und nur wenige falsch positive Diagnosen wurden bisher berichtet. Die hauptsächliche Einschränkung dieser Technik liegt in der geringen Sensitivität mit Werten von 46 bis 66% bei einer Spezifität von bis zu 100% bei malignen Erkrankungen des Pankreas [Glasbrenner et al., 1999; Volmar et al., 2006; Uchida et al., 2007]. Das Hauptproblem liegt hierbei in der Kategorisierung von Läsionen, die nicht alle zytopathologischen Kriterien für Malignität erfüllen und somit in einer zytologischen „Grauzone“ liegen [Selvaggi, 2004]. In dieser unzureichenden Situation werden zunehmend ergänzende Methoden getestet um das Ergebnis von Bürstenzytologien zu verbessern. Hierbei werden unter anderem Ploidie-Veränderungen unter Einsatz von Durchflusszytometrie [Bergquist et al., 2004; Linberg et al., 2006] und Expressionsanalysen von Telomerase-RNA [Morales et al., 1998; Ohuchida et al., 2005] sowie CA19-9 und CEA durchgeführt [Lindberg et al., 2002]. Die meisten dieser Studien zeigen vielversprechende Ergebnisse, sind aber entweder nicht überall verfügbar, oder liefern nur einen geringen Vorteil gegenüber der Standard-Zytologie und haben daher nicht zu einer signifikanten Verbesserung geführt [Gress, 2004].

Aufgrund der hohen Konzentration von DNA, RNA und Proteinen, die in das Sekret freigesetzt werden, lassen sich molekulare Veränderungen einer Neoplasie im reinen Sekret vermutlich am leichtesten nachweisen [Goggins, 2007]. Potentielle klinisch einsetzbare

Biomarker werden durch die Analyse von eindeutig krebspezifischen-DNA Veränderungen sowie Änderungen in der Genexpression auf RNA- und Proteinebene im Vergleich zu Normalgeweben und chronischer Pankreatitis entdeckt.

Pankreaskarzinom-spezifische Mutationen im *KRAS*-Gen wurden in vielen Studien untersucht. Dabei finden sich diese Mutationen jedoch auch in Patienten mit PanIN oder anderen prä-kanzerösen Läsionen [Kondo et al., 1997] sowie in Sekreten von Patienten mit chronischer Pankreatitis mit einer Frequenz von 6-31% [Uehara et al., 1996; Watanabe et al., 1999; Boadas et al., 2001, Löhr et al., 2001]. Die Differenzierung zwischen einem Pankreaskarzinom und einer chronischen Pankreatitis ist auf der Basis von *KRAS*-Mutationen daher derzeit nicht zuverlässig. Mutationen des *p53*-Gens sind in 40-81% der Sekretproben von Patienten mit Pankreaskarzinomen detektierbar [Sturm et al., 1998, Wang et al., 2004]. *P53* wird jedoch derzeit aufgrund der unzureichenden Sensitivität und Spezifität als Frühdiagnostik-Marker nicht verwendet [Farrell et al., 2005].

Ein RNA-basierter Marker der zur Erkennung von PDAC verwendet wird ist die Telomerase-Untereinheit hTERT. Durchschnittlich 90% der Patienten mit PDAC haben eine nachweisbare Telomerase-Aktivität im Pankreassekret [Seki et al., 2001; Uhuchida et al., 2005]. Da Telomerase auch in inflammatorischen Zellen exprimiert wird, ist dieser Nachweis zu unspezifisch für die Frühdiagnostik, solange keine CD25-positiven Lymphozyten in Patienten mit chronischer Pankreatitis ausgeschlossen werden können [Seki et al., 2001].

Abnormale Methylierungsmuster sind besonders nützlich für die Frühdiagnostik von Pankreaskarzinomen [Esteller et al., 2001]. Methylierungen von *ppENK* können in ca. 67% der Sekretproben von Patienten mit PDAC nachgewiesen werden. Dagegen tragen nur ca. 11% des gleichen Kollektivs *p16*-Methylierungen. In Proben von Patienten mit chronischer Pankreatitis finden sich keine Methylierungen für die untersuchten Gene [Fukushima et al., 2003]. Hingegen finden sich in ca. 91% bzw. 27% Methylierungen für *ppENK* und *p16* im Duodenum von gesunden Patienten, was im klinischen Einsatz zu Kontaminationen bei der Kanulierung des Pankreasganges und damit zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte [Fukushima et al., 2003]. Die Kombination von drei weiteren Genen (*NTPX2*, *SARP2* und *CLDN5*) zeigt aberrante Methylierung in mindestens einem dieser drei Gene in 75% der untersuchten Pankreassekrete von Patienten mit Pankreaskarzinomen [Sato et al., 2003].

Mittels Proteomanalysen von Pankreassekreten aus Patienten mit PDAC konnten 170 Pankreaskarzinom-spezifische Proteine identifiziert werden. Darunter z.B. CEA, MUC1, HIP/PAP (*hepatocarcinoma-intestine-Pancreas/Pacreatitis-assoc-Protein*) und Lipocalin 2

[Gronborg et al., 2004]. Allerdings werden weitere unabhängige Validierungen dieser Protein-Biomarker benötigt [Farrell et al., 2005; Goggins, 2007]

Unter Einsatz von Genexpressions- und Proteom-Analysen sind eine Reihe von potentiellen DNA- und Protein-Biomarkern im Pankreaskarzinom identifiziert worden. Allerdings ist die diagnostische Zuverlässigkeit eines einzeln verwendeten Markers bisher unzureichend [Liang et al., 2009]. Eine große Zahl dieser Marker wird derzeit in klinischen Phase-I- und II-Studien auf ihr diagnostisches Potential evaluiert und validiert [Goggins, 2007].

2.7 Resümee

Die Entwicklung des PDAC steht im Zusammenhang mit Entzündungen und Regeneration des Pankreas, welche zu einer schrittweisen Anhäufung von genetischen und histologischen Veränderungen führt. Obwohl sich viele dieser Veränderungen bereits in Vorläuferläsionen finden lassen, ist es bisher noch nicht möglich diese Marker in der klinischen Routine für die Frühdiagnostik des PDAC zu nutzen. Wie einleitend erwähnt könnte das Auftreten von CIN den kritischen Punkt in der Genese des PDAC darstellen. Das häufige Auftreten von rekurrenten Mustern von chromosomalen Veränderungen deutet darauf hin, dass zahlreiche Loci in die Karzinogenese involviert sind. Die Entwicklung von FISH-Sonden aus den Aberrationen, die im PDAC am häufigsten festgestellt werden, könnte daher für die Frühdiagnostik nützlich sein.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 1. Verwendete Geräte.

Gerätebezeichnung	Hersteller
Agarosegelapparatur mit Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Alpha Imager Gel Documentation	Alpha-Innotech, San Leandro, CA
Analysewaage Explorer	Ohaus, Gießen
Hybridisierungssofen APT-Line	Biometra, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Inkubatoren:	
Water-Jacketed Incubator 3250	Forma Scientific, Waltham, MA
Function Line	Heraeus Instruments, Hanau
Mikroskope:	
Axiolab A	Zeiss, Jena
Wilovert	Hund, Wetzlar
DMRBE	Leica, Bensheim
DM6000	Leica, Bensheim
Sicherheitswerkbänke:	
Hera Safe Klasse 2 Typ H	Heraeus Instruments, Hanau
Steril GARD Hood Class II Type A/B3	The Baker Company, Sanford, ME
Thermocycler Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Thermomixer:	
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
TM130	Haep Labor Consult, Bovenden
Tischautoklav HST 32/25	Zirbus, Osterode
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugen:	
Rotixa / KS	Hettich, Tuttlingen
Labofuge 400R	Heraeus Instruments, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau

Alle weiteren, zur Grundausstattung eines Labors gehörenden Geräte, wurden nicht gesondert aufgeführt.

3.2 Chemikalien

3.2.1 Allgemeine Chemikalien, Lösungen und Kits

Tabelle 2. Verwendete Chemikalien, Lösungen und Kits.

Name	Abkürzung	Hersteller
Bovines Serum Albumin	BSA	Sigma, Schnelldorf
COT Human DNA	COT1	Roche, Pensberg
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma, Schnelldorf
Desoxynucleotidtriphosphat Mix	dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethylendiamintetraacetat	EDTA	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	EtBr	Sigma, Schnelldorf
Ficoll 400		Simga, Schnelldorf
Fötales Kälber Serum	FCS	Pan, Aidenbach
Formamid		Applichem, Darmstadt
Formamid, deionisiert		Ambion, Huntingdon, UK
Glutaminsäure		Sigma, Schnelldorf
Kaliumacetat	KAc	Applichem, Darmstadt
Luria Bertani-Medium	LB	Applichem, Darmstadt
3-N-Morpholinopropanesulfonicacid	MOPS	Applichem, Darmstadt
Natriumacetat	Na-Acetat	Applichem, Darmstadt
Natriumhydroxyd	NaOH	Applichem, Darmstadt
Nonidet P40	NP40	Applichem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	SDS	Sigma, Schnelldorf
Natriumthiocyanat	NaSCN	Sigma, Schnelldorf
PreserveCyt		Cytc, Boxborough, MA
RPMI 1640		Gibco, Eggenstein
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan	Tris	Merck, Darmstadt
Triton-X-100		Sigma, Schnelldorf
Plasmid Midi Kit		Qiagen, Hilden

Weitere hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt oder Sigma, Schnelldorf bezogen.

3.2.2 Modifizierte Nukleotide und kommerzielle FISH-Sonden

Tabelle 3. Verwendete Fluorochrome, markierte Nukleotide und FISH-Sonden.

Name	Anregung/Emission	Hersteller
Digoxigenin-11-dUTP (Dig-dUTP)		Roche, Pensberg
Biotin-16-dUTP (Bio-dUTP)		Roche, Pensberg
Fluorescein-12-dUTP (FITC)	490 / 520 nm	Roche, Pensberg
Tetramethyl-rhodamin-5-dUTP (TRITC)	551 / 575 nm	Roche, Pensberg
Cy5-dUTP	652 / 672 nm	Amersham Bioscience, Freiburg
Diethylaminocoumarin-5-dUTP (DEAC)	426 / 480 nm	NEN Life Science, Boston, MA
Chromosom 3 α -Satelliten Sonde (D3Z1)	565 / 590 nm	Qbiogene, Heidelberg
Chromosom 7 α -Satelliten Sonde (D7Z1)	565 / 590 nm	Qbiogene, Heidelberg
Chromosom 8 α -Satelliten Sonde (D8Z1)	495 / 520 nm	Qbiogene, Heidelberg
Chromosom 17 α -Satelliten Sonde (D17Z1)	495 / 520 nm	Qbiogene, Heidelberg

3.2.3 Antikörper und Liganden zum indirekten Nachweis der FISH-Sonden

Anti-digoxigenin-rhodamin, Fab Fragment	555 / 580 nm	Roche, Pensberg
Fluorescein Avidin DCS	496 / 520 nm	Vector, Burlingame, CA

3.2.4 DNA-Längenstandard

GeneRuler™ DNA Ladder Mix, MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Die DNA Ladder bestand aus folgenden 21 Fragmenten (in Basenpaaren):

100, 200, 400, 400, **500**, 600, 700, 800, 900, **1031**, 1200, 1500, **2000**, 2500, **3000**, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000

(Fett dargestellte Zahlen stehen für stärkere Banden)

3.2.5 Verwendete Puffer

10x PBS-Puffer (pH 7,5):	Na ₂ HPO ₄	160	mM
	NaH ₂ PO ₄	40	mM
	NaCl	1,5	M
20x SSC-Puffer (pH 7,2):	NaCl	87,7	g
	Natriumcitrat	44,1	g
	A. bidest	ad	500 ml

10x TE-Puffer:	Tris [1M] pH 7,5	100	ml
	EDTA [0,5M] pH 7,5	20	ml
	A. bidest	ad	1000 ml

3.3 Zelllinien

Folgende ATCC-Zelllinien (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, USA) wurden verwendet:

Tabelle 4. Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Referenz
AsPC-1	Pankreas Adenocarcinom, Ascites, 62j, w	MH Tan, 1981
BxPc-3	Pankreas Adenocarcinom, Primärtumor, 61j, w	MH Tan, 1986
Capan-1	Pankreas Adenocarcinom, Lebermet., 40j, m	J Fogh, 1977
Capan-2	Pankreas Adenocarcinom, Primärtumor, 56j, m	J Fogh, 1975
CFPAC-1	Pank. Adenokarz., Lebermet, cyst Firbo, 26j, m	RA Schoumacher, 1990
Hs766T	Pankreaskarcinom, Lymphmetastase, 46j, m	RB Owens, 1976
MiaPaCa-2	Pankreaskarcinom, Primärtumor, 65j, m	A Yunis, 1977
Panc-1	Pankreas Adenocarcinom, Primärtumor, 56j, m	M Lieber, 1975
SU.86.86	Pankreas Adenocarcinom, Lebermet., 57j, w	BJ Drucker, 1988

3.4 Plasmide

Tabelle 5. Verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Charakteristika	Marker	Größe (kbp)	Quelle
pUC1,77	Alphoid Chromosom 1	Ap ^r	3,7	M. Rocchi, Bari, I
pAE0.68	Alphoid Chromosom 3	Ap ^r	3,4	M. Rocchi, Bari, I
p4n1/4	Alphoid Chromosom 4	Ap ^r	3,4	M. Rocchi, Bari, I
pZ7.5	Alphoid Chromosom 7	Ap ^r	3,3	M. Rocchi, Bari, I
pZ8.4	Alphoid Chromosom 8	Ap ^r	3,9	M. Rocchi, Bari, I
pMR9A	Alphoid Chromosom 9	Ap ^r	3,0	M. Rocchi, Bari, I
pBR12	Alphoid Chromosom 12	Ap ^r	3,4	M. Rocchi, Bari, I
pZ17-14	Alphoid Chromosom 17	Ap ^r	3,7	M. Rocchi, Bari, I
p2Xba	Alphoid Chromosom 18	Ap ^r	4,4	M. Rocchi, Bari, I
pZ20	Alphoid Chromosom 20	Ap ^r	4,1	M. Rocchi, Bari, I
RP11-109C3	BAC, <i>AIB1</i> Locus 20q12	Chloramp ^r	130	T. Ried, NCI, USA
RP11-62N23	BAC, <i>Her2</i> Locus 17q21.2	Chloramp ^r	157	M. Rocchi, Bari, I
CTD-2026N22	BAC, <i>EGFR</i> Locus 7p12	Chloramp ^r	150	T. Ried, NCI, USA
RP1-80k22	PAC, <i>cMYC</i> Locus 8q24.3	Kana ^r	149	E. Schröck, Dresden

Ap^r: Ampicillin resistant; Chloramp^r: Chloramphenicol resistant; Kana^r: Kanamycin resistant

3.5 Antibiotika

Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Plasmide verfügten über Ampicillin- (high-copy Plasmide), Chloramphenicol- (BAC) und Kanamycin- (PAC) Resistenzen. Zu Selektionszwecken wurden diese Antibiotika in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Ampicillin (Serva, Heidelberg): Es wurde eine Stammlösung von 100 mg / ml in A. bidest hergestellt, sterilfiltriert und in 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

Die Standardkonzentration im Medium betrug 100 µg / ml.

Chloramphenicol (Sigma, Schnelldorf): Es wurde eine Stammlösung von 12,5 mg / ml in 50% Ethanol hergestellt, sterilfiltriert und in 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

Die Standardkonzentration im Medium betrug 12,5 µg / ml.

Kanamycin (Sigma, Schnelldorf): Es wurde eine Stammlösung von 25 mg / ml in A. bidest hergestellt, sterilfiltriert und in 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

Die Standardkonzentration im Medium betrug 25 µg / ml.

3.6 Enzyme

DNase I	Fermentas, St. Leon-Rot
Polymerase I	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Macherey & Nagel, Düren
Protease Typ XXIV	Sigma, Schnelldorf
Pepsin (P6887)	Sigma, Schnelldorf

3.7 Nährmedien und Kulturbedingungen

3.7.1 Voll- und Selektivmedien zur Bakterienkultivierung

LB-Agar oder -Bouillon wurde als Standardmedium zur Stammhaltung und nicht-selektiven Anzucht verwendet.

Zur Selektion plasmidtragender Bakterien wurde dem Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50 °C ein geeignetes Antibiotikum (Tabelle 5) steril zugegeben.

3.7.2 Bakterielle Zellanzucht und Zellernte

Die Zellanzucht erfolgte, falls nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 37 °C im Inkubator bei 200 Upm auf dem Kreisschüttler. Kulturansätze bis zu einem

Volumen von 5 ml wurden in belüftbaren Kulturröhrchen, größere Volumina in Schikankolben angesetzt. Die Größe der Kolben war so gewählt, dass diese maximal zu 50% befüllt waren, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten.

Die Zellernte erfolgte, falls nicht anders angegeben, in der späten exponentiellen Wachstumsphase durch eine zehnmütige Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 g.

3.7.3 Anlegen von bakteriellen Dauerkulturen

Zur langfristigen Lagerung wurden die Bakterien in einer 5 ml Flüssigkultur angezogen. Nach 3 h Wachstum bei 37 °C wurden 500 µl Bakteriensuspension entnommen, mit 500 µl Glycerin vermischt und bei -80 °C gelagert.

Zur Reaktivierung wurde mit der Impföse auf die Zellsuspension getippt und damit eine geeignete Selektiv-Agarplatte beimpft.

3.7.4 Kultivierung von humanen Zelllinien

Mediumansatz:

- 88 ml RPMI 1640 Medium mit 25 mM HEPES
- 1 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 100 E/ml)
- 1 ml L-Glutamin (Endkonzentration 2 mM)
- 10 ml FCS (Endkonzentration 10%)

Die kryokonservierten Zellen wurden aufgetaut, in ein steriles Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Medium überführt und bei 200 g für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen nochmals mit Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und in eine 25 cm²-Kulturflasche mit Filterschraubkappe überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Danach erfolgte der Mediumwechsel alle 2 bis 3 Tage. Waren die Kulturflaschen dicht mit Zellen bewachsen, wurden die Zelllinien passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden wurden in die Kulturflaschen 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung gegeben und für weitere 5 bis 10 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei Kulturflaschen verteilt und im Brutschrank kultiviert. Für die Kryokonservierung der Zelllinien wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 8 min bei 200 g zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen in 2 ml Einfriermedium (10% steriles DMSO verdünnt mit komplettem RPMI-Medium) aufgenommen. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und eingefroren. Das Einfrieren der

Zelllinien erfolgte mit einer Einfrierhilfe, die die Proben langsam abkühlt. Nach 24 h wurden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.8 Allgemeine Techniken zum Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.8.1 Isolation von Plasmiden

Für unterschiedliche Plasmidgrößen wurden verschiedene Präparationstechniken angewendet.

3.8.1.1 Plasmidpräparation mit Anionenaustauschersäulen

Diese Methode der Plasmidpräparation basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse mit nachfolgender Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Matrix. Diese Form der Plasmidisolierung wurde für die alpha-Satelliten-DNA tragenden high-copy Plasmide verwendet. Die Präparation wurde mit dem Plasmid-Midi-Kit (Fa. Qiagen) mit einer DNA-Ausbeute von bis zu 100 µg durchgeführt.

Benötigte Lösungen:

P1.	Resuspensionspuffer, pH 8,0		
	Tris-HCl	50	mM
	EDTA	10	mM
	RNase A	100	µg / ml
P2.	Lyselösung		
	NaOH	200	mM
	SDS	1	% (w/v)
P3.	Neutralisationspuffer, pH 5,5		
	K-Acetat / HAc	3	M
QBT.	Equilibrierungspuffer, pH 7,0		
	MOPS	50	mM
	NaCl	750	mM
	Isopropanol	15	% (v/v)
	Triton X-100	0,15	% (v/v)
QC.	Waschpuffer, pH 7,0		
	MOPS	50	mM
	NaCl	1	M
	Isopropanol	15	% (v/v)

QF.	Elutionspuffer, pH 8,5		
	Tris / HCl	50	mM
	NaCl	1,25	M
	Isopropanol	15	% (v/v)

Für eine Präparation wurden 50 ml einer in Selektivmedium angesetzten Übernachtskultur geerntet. Das Zellpellet wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 wurde vorsichtig gemischt und die Suspension für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 4 ml Puffer P3 wurde wieder vorsichtig gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation für mindestens 25 min bei 4 °C und 12.000 g. Der klare Überstand wurde auf die Säule aufgetragen, die zuvor mit 2,5 ml Puffer QBT equilibriert wurde. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 5 ml Puffer QC. Im Anschluss wurde die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die so gewonnene DNA wurde mit Isopropanol gefällt (3.8.2.2). Das gewonnene Pellet wurde in 100 µl A. bidest aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.8.1.2 Präparation von BAC und PAC DNA

Diese Methode der Plasmidpräparation basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse mit nachfolgender Phenol-Chloroform-Extraktion der Plasmid-DNA. Diese Form der DNA-Isolation wurde für die etwa 150 Kilobasenpaar großen BAC- und PAC-Plasmide verwendet. Die eingesetzten Puffer-Lösungen entsprechen denen unter 3.8.1.1 beschriebenen.

Für eine Präparation wurde von einer frischen Agarplatte eine Kolonie mit der Impföse aufgenommen und 3 ml Selektivmedium damit beimpft und bei 37 °C und 200 Upm auf dem Kreisschüttler für 4 h inkubiert. Mit der 3 ml Kultur wurden dann 50 ml Selektivmedium beimpft und weitere 4 h bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Nach Erreichen einer Absorption von 0,5 bei 550 nm wurden mit diesen 50 ml Bakteriensuspension 450 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) beimpft und über Nacht bei 37 °C bei 200 Upm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension geerntet (3.7.2). Das Zellpellet wurde in 20 ml P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 20 ml P2 wurde vorsichtig gemischt und die Suspension für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 20 ml P3 wurde wieder vorsichtig gemischt und das Gemisch für 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für mindestens 25 min bei 4 °C und 12.000 g. Der klare Überstand wurde mit Isopropanol gefällt (3.8.2.2), in 2 x 700 µl A. bidest gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert. Es wurden jeweils 200 µg RNase A zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde im Anschluss wie unter 3.8.2.3 beschrieben mit Phenol-Chloroform extrahiert. Das so erhaltene DNA-Pellet wurde über Nacht unter leichtem Rühren bei 37 °C in 100 µl A. bidest gelöst.

3.8.2 Reinigung und Konzentration von DNA

3.8.2.1 Ethanol-Fällung

Der Probe wurden 2,5 VT auf -20 °C gekühltes Ethanol (99,8%) und 0,1 VT 3 M Na-Acetat (pH 4,9) zugesetzt. Die Fällung erfolgte für 30 min bei -20 °C . Die DNA wurde anschließend für 30 min bei mindestens 12.000 g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgegossen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde die DNA bei RT getrocknet. Die DNA wurde unmittelbar in anschließende Versuche eingesetzt oder zur Aufbewahrung in sterilem A. bidest aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.8.2.2 Isopropanol-Fällung

Zur Fällung der DNA wurde die Probe mit 0,7 VT Isopropanol vermischt und für 30 min bei 4 °C mit mindestens 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die DNA wie unter 3.8.2.1 mit 70% Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet.

3.8.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die DNA-Lösung wurde mit einem VT Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und 2 min geschüttelt und im Anschluss 5 min mit mindestens 12.000 g zentrifugiert. Die wässrige (obere) Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Vorgang wiederholt bis die Interphase keine Trübungen und ausgefallene Proteine mehr enthielt. Nach erneutem Transfer der DNA-Lösung in ein neues Reaktionsgefäß wurde ein VT Chloroform zur wässrigen Phase gegeben, 2 min geschüttelt und abzentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit 2 VT Ethanol versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei -20 °C wurde die DNA-Lösung bei 14.000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet.

3.8.2.4 Bestimmung von DNA-Konzentration und Reinheitsgrad

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration und dem Reinheitsgrad wurde die zu bestimmende Probe am Zweistrahlphotometer vermessen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Die Absorption wurde für beide Wellenlängen gegen A. bidest bestimmt. Eine OD von 1,0 entspricht einer Konzentration von $50\text{ }\mu\text{g DNA/ml}$. Der Reinheitsgrad wird durch den Quotienten aus OD_{260}/OD_{280} angegeben. Der Reinheitsgrad der Präparationen sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.8.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der isolierten Plasmid-DNA sowie zur Bestimmung der Fragmentlängen von erzeugten DNA-Sonden wurden diese einem elektrischen Feld ausgesetzt. Aufgrund der negativen Ladung ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats wandern Nukleinsäuren zur Anode. Die Mobilität von linearen Fragmenten ist innerhalb bestimmter Größenbereiche proportional dem Logarithmus ihrer Fragmentlänge [Ibelgaufts, 1990]. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wurde geschnittene DNA mit bekannter Länge eingesetzt (3.2.4).

Benötigte Lösungen:

1. 10 x TBE-Puffer

Tris-Base		54,45	g
Borsäure		27,5	g
EDTA [0,5M] pH 8,0		20	ml
A. bidest.	ad	500	ml

2. Agarosegel

Agarose	0,8 -1,0	g
TAE-Puffer	100	ml

3. DNA-Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25	%	(w/v)
Xylencyanol	0,25	%	(w/v)
Ficoll 400	1,5	%	(w/v)

4. Ethidiumbromid-Färbelösung

A. bidest	250	ml
Ethidiumbromid	1	mg / l

Das erstarrte Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer überschichtet und der Probenkamm entfernt. Es wurden 1 bis 5 µl DNA Lösung mit der entsprechenden Menge 5x Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für 1 Stunde. Das Gel wurde für ca. 5 min im Ethidiumbromid-Färbegrad gefärbt und auf einem UV-Transluminator durch UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht.

3.9 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

3.9.1 Sondenauswahl und -design

In einem ersten Schritt wurden Sonden generiert, mit deren Hilfe sich die Ploidieveränderungen ausgewählter Chromosomen aufzeigen lassen sollten. Auf der Basis von CGH-Studien an Zelllinien und Karzinomen des Pankreas wurden die Chromosomen 4, 7, 8, 9, 12, 17, 18 und 20 ausgewählt, da diese in GCH-Analysen am häufigsten von chromosomalen Abberationen betroffen waren [Solinas-Toldo et al., 1996; Mahlamäki et al., 1997; Ghadimi et al., 1999]. Aus bakteriellen Klonen, welche die α -Satelliten-spezifischen Sequenzen für die ausgewählten Chromosomen trugen, wurden die Plasmide isoliert und aus diesen mittels Nicktranslation (3.9.2) DNA-Sonden hergestellt. Nach einem Test dieser Sonden auf Metaphase-Präparaten aus Leukozyten eines gesunden männlichen Spenders (3.9.5) wurden diese Sonden auf neun pankreatische Karzinom-Zelllinien (Tabelle 4) eingesetzt.

In einem zweiten Schritt wurden FISH-Sonden entwickelt, um rekurrente chromosomale Aneuploidien und Amplifikationen von Onkogenen direkt in Interphasekernen sichtbar zu machen. In diesem Schritt wurden nun, wieder auf der Basis von CGH-Studien und eigenen Voruntersuchungen an PanIN-Läsionen aus chronischer Pankreatitis, chromosomale Loci ausgewählt, auf denen Onkogene kodiert sind, die im Pankreaskarzinom am häufigsten von chromosomalen Amplifikationen betroffen sind. Als Locus-spezifische Sonden wurden BAC-Sequenzen für die Regionen der Gene *EGFR* (7p12), *cMYC* (8q24), *Her2* (17q21) und *AIB1* (20q12) ausgewählt. Die Locus-spezifischen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der Nicktranslation (3.9.2) mit Rhodamin oder Digoxigenin markiert. Als interne Kontrollen für die Hybridisierungen wurde hier die korrespondierende α -Satelliten-DNA, spezifisch für die Centromere der Chromosomen 7, 8, 17 oder 20 verwendet und via Nicktranslation mit Fluorescein bzw. Biotin markiert. Die Gen- und Centromersonden wurden jeweils zusammen in zwei-Farben-FISH-Experimente eingesetzt. Die Funktionstüchtigkeit der Sonden wurde zunächst an Metaphase-Präparationen getestet und Kreuz- bzw. Fehlhybridisierungen der einzelnen Sonden ausgeschlossen. Nach dem Test der Sonden wurden diese zunächst an 5 Pankreaskarzinom-Zelllinien etabliert. Die verwendeten Zelllinien waren die von Primärtumoren stammenden MiaPaCa-2, Capan-2 und Panc-1 sowie die aus Lebermetastasen von Pankreaskarzinomen isolierten Capan-1 und SU.86.86. Im weiteren Verlauf wurden die Sonden zur Hybridisierung endoskopisch gewonnener Zellkerne verwendet.

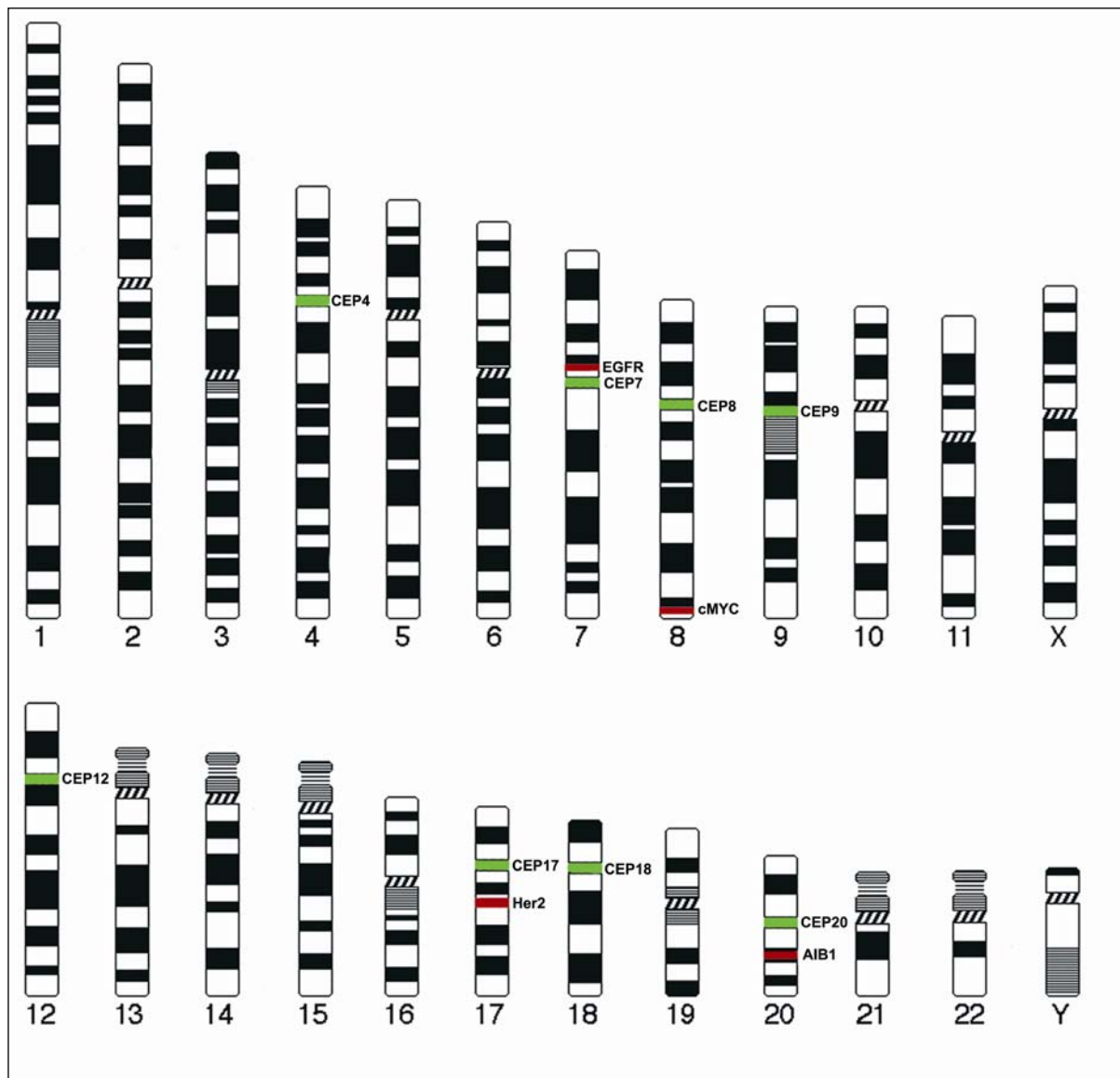


Abbildung 4. Schematische Darstellung der eingesetzten FISH-Sonden. Zur Markierung der Centromere wurden Chromosomen-spezifische alpha-Satelliten-Sequenzen verwendet (grün). Zur Markierung der Gen-Loci wurden BAC-Sequenzen verwendet (rot). (CEP: Centromersonde) [Ideogramm von Internet-Resource: <http://www.biologia.uniba.it>]

3.9.2 Nicktranslation

Die Sonden-DNA wurde enzymatisch mittels Nicktranslation mit verschiedenen Hapten oder Fluoreszenzfarbstoffen (Tabelle 3) markiert. Bei der Nicktranslation führt man mit Hilfe von DNaseI in Gegenwart von Mg^{2+} in die DNA Einzelstrangbrüche (nicks) ein; die exponierten Bruchstellen dienen als Ausgangspunkt für eine Reaktion, bei der die Polymerase-Aktivität der DNA-Polymerase am 3'-Ende des Bruchs neue, markierte Nukleotide einbaut. Gleichzeitig baut sie durch ihre 5'-3'-Exonuklease-Aktivität auf der anderen Seite des Bruchs Nukleotide ab.

Benötigte Reagenzien:

CAG-Mix (1mM) aus dATP, dGTP und dCTP

DNase I (1 U/μl)

Polymerase I (10 U/μl)

Reaktionsansatz für die Nicktranslation:

2 μg DNA

10 μl Pol I – Puffer (500 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT)

3 μl CAG-dNTP Mix (1 mM)

1 μl dTTP (1 mM)

2 μl Hapten-dUTP (1 mM) (Tabelle 3)

A. bidest ad 100 μl

Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt und kurz zentrifugiert. Auf Eis wurden nun

4 μl DNase (1:100 in dH₂O)

2 μl Pol I

zugefügt, gut gemischt und das Gemisch nach einer kurzen Zentrifugation für 120 min bei 15 °C inkubiert. Im Anschluss wurde zur Kontrolle der Fragmentlänge 5 μl des Ansatzes in ein 1% Agarosegel aufgetragen. Die optimale Fragmentgröße für FISH-Sonden liegt zwischen etwa 300 und 600 bp. Waren die Fragmente zu lang wurden weitere 2 μl der DNase (1:100) eingesetzt und für weitere 15 - 20 min bei 15 min inkubiert. Abschließend wurden die Enzyme durch Zugabe von 1 μl 0,5 M EDTA für 10 min bei 65 °C deaktiviert. Die Sonden wurden bei -20 °C gelagert.

3.9.3 Präzipitation und Hybridisierung markierter DNA

Dieses Protokoll wurde für die Hybridisierung von den unter 3.9.5 und 3.9.6.2 hergestellten OT verwendet. Zur Vorbereitung der OT für die Hybridisierung erfolgte eine 5 - 7 min enzymatische Behandlung in 0,005% Pepsin in 0,01 N HCl bei 37 °C. Im Anschluss wurden die OT in 2x SSC bei RT für 5 min gewaschen und in der Folge in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und luftgetrocknet. Parallel konnte die Vorbereitung der Sonden erfolgen.

Es kamen jeweils ca. 200 ng unterschiedlich markierter DNA unter Zugabe von 5-10 μl humaner COT1 DNA zur Präzipitation. Die Aufgabe der COT1 DNA bestand darin, die repetitiven Sequenzen der BAC DNA, welche sonst ubiquitär auf den Chromosomen hybridisieren und die exakte Messung der Fluoreszenzintensitäten der Einzelkopie-Sequenzen verhindern würde, zu binden. Nach der Präzipitation erfolgte eine

Resuspendierung der DNA in 50% Formamid / 10% Dextransulfat / 2x SSC. Dieses Gemisch wurde auf den OT aufgetragen, mit einem 22 x 22 mm Deckgläschen bedeckt und dieses mit Fixogum versiegelt, um ein Verdampfen des Hybridisierungsgemisches zu verhindern. Nach der Denaturierung für 5 min bei 80 °C auf einer Heizplatte wurden die OT für 12 - 24 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert.

3.9.4 Detektion

Nach der Hybridisierung schloss sich die Detektion an. Hier wurden die Objektträger zunächst einer Reihe von Waschvorgängen unterzogen, um den Hybridisierungsmix von den Objektträgern abzuwaschen. Die Waschschritte bestanden zunächst aus drei 5 min Waschungen mit 50% Formamid / 2x SSC bei 45 °C und dann drei weiteren 5 min Waschungen mit 0,1x SSC bei 60 °C. Mit Fluorochrom-dUTP markierte Sonden brauchten nicht durch Antikörper visualisiert werden. Für den Nachweis der biotinylierten und der digoxigenin-markierten Sonden-DNA wurden die Präparate zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen vor dem Nachweis der Reportermoleküle mit 200 µl Blockierungslösung (3% BSA in 4x SSC und 0,1% Tween-20) bedeckt, mit einem 22 x 60 mm großen Deckglas versehen und bei 37 °C 30 min lang in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurde auf jedes Präparat 125 µl Detektionslösung (1 % BSA in 4x SSC und 0,1 % Tween -20), die Fluoreszein-Avidin (1 mg/ml) und anti-Dig-Rhodamin (200 µg/ml) enthielt, aufgebracht und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach schlossen sich drei 5 min Waschschritte mit 4x SSC und 0,1% Tween-20 bei 45 °C an. Die Nuklei wurden mit DAPI gegengefärbt. Um das Ausbleichen der Fluoreszenzmarkierung während der Bildaufnahme zu minimieren, wurden die Objektträger mit dem Antibleichmittel Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) benetzt und anschließend mit einem Deckgläschen eingedeckt.

3.9.5 Herstellung von Metaphasepräparaten

Metaphasepräparate wurden aus den Blut-Lymphozyten eines normalen männlichen Individuums gewonnen. Zu diesem Zweck wurden zu 5 ml einer Lymphozytenkultur-Lösung 300 µl PHA (Phytohämagglutinin, Gibco BRL, Eggenstein), 200 µl PWM (Pokeweed Mitogen, Gibco BRL) und 5 - 10 Tropfen Blut zugegeben und für 72 Stunden bei 37 °C im CO₂ Brutschrank inkubiert.

Lymphozytenkultur-Ansatz:

RPMI 1640 (Gibco)	500 ml
FCS	100 ml
Antibiotikum (Gibco)	5 ml
Bicarbonat (Gibco)	6 ml

Nach Zugabe von 140 µl Colcemid (10 µg/ml) und Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde der Ansatz bei 200 g zentrifugiert und das Pellet in 4 ml warmer (37 °C), 0,4% KCl-Lösung resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen erneut bei 200 g für 10 min zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden im verbliebenen Rest des Mediums resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen wurde im Anschluss in die Kulturröhrchen bis zu 6 ml eines eiskalten Fixans (Methanol/Eisessig 3:1) hinzugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation mit 200 g bei 4 °C für 10 min wurde der Überstand verworfen und dieser Fixierungsschritt dreimal wiederholt. Die Zellsuspension konnte für mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden. Zur Herstellung der Metaphasenpräparate wurde die Zellsuspension 10 min bei RT und 200 g zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in ca. 10 - 15 Tropfen Fixan aufgenommen. Die Objektträger wurden über Nacht in 100% Ethanol inkubiert, luftgetrocknet und in Fixan getaucht. Die Zellsuspension wurde auf feuchte Objektträger aufgetropft und diese anschließend über einem offenen 50 °C warmen Wasserbad langsam getrocknet und über Nacht bei 60 °C inkubiert. Die Aufbewahrung der Präparate erfolgte in 100% Ethanol bei -20 °C.

3.9.6 FISH an Nuklei aus Pankreassekret und Zelllinien

3.9.6.1 Endoskopische Gewinnung von Pankreassekret

Die Untersuchungen am Pankreassekret umfasste Patienten mit benignen Erkrankungen wie mit einer Cholezystolithiasis oder chronisch-rezidivierenden Pankreatitiden sowie Patienten mit Pankreas- und Gallenwegskarzinomen. Die Sekrete wurden im Rahmen endoskopisch retrograder Cholangiopankreatikographien (ERCP), teilweise unter Einsatz einer Zytologiebürste gewonnen. Die endoskopischen Präparate wurden nach der Entnahme sofort in eine methanolbasierte gepufferte zytologische Konservierungslösung gegeben um eine Degradation des Zellmaterials zu verhindern (Preservecyt, Cytoc Co., Boxborough, USA). Die beteiligten Kliniken waren die Abteilung für Gastroenterologie des Göttinger Universitätsklinikums, die Endoskopische Abteilung des Evangelischen Krankenhauses in Göttingen Weende sowie die Klinik für Gastroenterologie des Oskar-Ziethen-Krankenhauses in Berlin.

3.9.6.2 Aufbereitung des Pankreassekretes und der Zelllinien für FISH

Das Pankreassekret sowie die Zellen aus der Zellkultur wurden nach Gewinnung zunächst für 5 min bei 1400 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet zweimal mit 1x PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand bis auf 50 µl abgenommen. Das Pellet wurde resuspendiert und mit 500 µl 0,4% KCl (37 °C) für 15 - 30 min inkubiert, wobei es durch

Plasmolyse zu einer Isolation der Zellkerne kam. Danach wurde das Lysat zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde mit 500 µl eines 3:1 Gemisches aus Methanol und Eisessig für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diese Inkubation erfolgte eine Fixierung der Nuklei. Im Anschluss wurde die Kernsuspension nochmals zweimal mit Fixan gewaschen und das Pellet in 30 µl des Methanol / Essigsäure-Gemisches resuspendiert, auf Objektträger getropft und luftgetrocknet. Die Präparate wurden nach Dehydrierung in einer Alkoholreihe (70%, 85%, 96%) entweder sofort für FISH-Analysen benutzt oder bei -20 °C trocken aufbewahrt.

3.9.7 FISH an isolierten Zellkernen aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Gewebe

Die untersuchten Paraffin-eingebetteten Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis entstammen dem Archiv des Instituts für Pathologie des Klinikum Kassel.

3.9.7.1 Manuelle Mikrodisektion von Gangläsionen aus Paraffin-Geweben

Die Mikrodisektion erfolgte mit einem manuellen Mikromanipulator. Einzelzellen mit intakt erscheinendem Zellkern oder kleine Zellkomplexe, von 10 µm dicken Schnittpräparaten aus paraffin-eingebetteten Geweben, wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators und einer Tungsten-Nadel aus dem Gewebeverband unter lichtmikroskopischer Kontrolle herausgelöst und in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

3.9.7.2 Isolation von Zellkernen aus mikrodisezierten Proben

Die Isolation der Zellkerne erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Hedley [1983]. Das mikrodisezierte Gewebe wurde nach Gewinnung zunächst entparaffiniert und rehydriert. Im Anschluss erfolgte eine 45 - 60 min Behandlung mit Protease XXIV (1 mg/ml in 1x PBS) bei 45 °C unter leichtem Schütteln auf dem Thermomixer, um den Gewebeverband aufzulösen, ohne dabei die Zellkerne zu zerstören. Zum Entfernen größerer Zelldebries und zur Vereinzelung größerer Zellverbände wurde die Kernsuspension im Anschluss durch ein Nylon-Netz mit 45 µm Maschenweite gegeben, mit 10.000 Upm in der Tischzentrifuge 5 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Im Folgenden wurde das Pellet mit 1x PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Fixierung der Nuklei wurde das Pellet mit 500 µl eines 3:1 Gemisches aus Methanol und Essigsäure für 10 min inkubiert. Danach wurde die Lösung nochmals zweimal herunterzentrifugiert und das Pellet in 30 µl des Fixans resuspendiert, auf Objektträger getropft und luftgetrocknet. Die Präparate wurden nach Dehydrierung in einer Alkoholreihe (70%, 85% 96%) entweder sofort wie nachfolgend beschrieben für FISH-Analysen benutzt oder bei -20 °C trocken aufbewahrt.

3.9.7.3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an aus Paraffin-Geweben isolierten Nuklei

Die aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Gewebe isolierten Zellkerne besitzen auf Grund der Vorbehandlung des Gewebes eine starke Quervernetzung von Proteinen sowie eine starke Eigenfluoreszenz. Eine erfolgreiche und auswertbare Hybridisierung macht hier eine spezielle Vorbehandlung der isolierten Kerne notwendig. Darüber hinaus wurden für diese Hybridisierungen kommerzielle Sonden eingesetzt: Es wurden Centromer-spezifische alpha-Satelliten-Sonden für die Chromosomen 3 (D3Z1, Rhodamin), 7 (D7Z1, Rhodamin), 8 (D8Z1, Fluorescein) und 17 (D17Z1, Fluorescein) (Qbiogene, Heidelberg) in zwei-Farben-FISH-Experimenten verwendet.

Die unter 3.9.7.2 hergestellten Objektträger wurden in 4x SSC / 0,3% NP40 bei RT für 30 min vorbehandelt und im Anschluss in 1M NaSCN bei 80 °C für 30 min inkubiert. Die OT wurden in 2x SSC für 5 Minuten auf RT abgekühlt und nachfolgend mit 0,005% Pepsin in 0,01N HCl bei 37 °C für 30 min enzymatisch behandelt. Nach einem fünfminütigen Waschschrift in 2x SSC wurden die OT in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 85%, 96%) dehydriert und luftgetrocknet.

Die Hybridisierung wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Es wurden 2 µl von jeder Sonde mit dem mitgelieferten Hybridisierungspuffer zu einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Dieses Gemisch wurde auf den OT aufgetragen, mit einem 22 x 22 mm Deckgläschen bedeckt und dieses mit Fixogum versiegelt, um ein Verdampfen des Hybridisierungsgemisches zu verhindern. Nach der Denaturierung für 5 min bei 80 °C auf einer Heizplatte wurden die OT für 12 - 24 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläschen vorsichtig entfernt und die OT in 0,4x SSC / 0,3% NP40 für 3 min bei 72 °C und 5 min in 2x SSC / 0,3% NP40 bei RT gewaschen. Abschließend wurden die OT luftgetrocknet, mit DAPI gegen gefärbt und in das Antibleichmittel Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) eingebettet.

3.9.8 Auswertung und Bildaufnahme

Die einzelnen Fluorochrome wurden mit einem 63x oder 100x Objektiv nacheinander mit einem DM-RBE (Leica) Epifluoreszenz-Mikroskop mit einer CCD-Kamera (Sensys, Photometrics, Tucson, AZ) aufgenommen und mit der FISH-Software CW-4000 (Leica, Cambridge) gespeichert. Das Mikroskop war mit einem 4-Filterrad sowie hochspezifischen Filtern (Chroma Technology Corp.) ausgestattet, die es ermöglichen, jedes Fluorochrom mit einem separaten Anregungs-, Teilungs- und Emissionsfilter zu analysieren. Die Fluorochrome wurden als skalierbare 2-dimensionale Grauwertbilder aufgenommen und diesen dann eine bestimmte Farbe zugeordnet. Auf diese Weise erhielt man eine

Bildsequenz der verwendeten Fluorochrome, aus der, durch Überlagerung der Farbkanäle (Fluorochrome), ein so genanntes Pseudofarbbild entstand.

Es wurden von jeder Hybridisierung 100 Zellkerne ausgewertet. Die Hybridisierungssignale wurden in jedem Zellkern für jede FISH-Sonde getrennt ausgezählt. Kerne mit einer normalen Anzahl von Signalen (z.B. 2 rot / 2 grün) wurden als diploid gewertet. Abnormale Signale wurden zur Bestimmung der chromosomalen Aneuploidie in eine Tabelle übertragen.

3.9.9 Dokumentation und statistische Auswertungen

Die Gewebeproben der einzelnen Patienten wurden anonymisiert in die Studien aufgenommen und jeweils mit einer Studiennummer versehen. Für die durchgeführten Untersuchungen an den humanen Gewebeproben lag ein positives Votum der Ethikkommissionen der Universitätsklinik Göttingen vor.

Mit Hilfe Allgemeiner linearer Modelle wurde getestet, inwieweit der Anteil aneuploider Zellen mit dem histologisch diagnostizierten Grad (Normalgewebe, PanIN1, PanIN2, PanIN3) in Verbindung steht, welche Bedeutung die Sonde (Chromosomen 3, 7, 8 und 17) für den Vorhersagewert hat und ob Interaktionen zwischen diesen Prediktoren bestanden. Nicht-signifikante Faktoren und Interaktionen wurden schrittweise rückwärts aus den Modellen eliminiert. Mit Hilfe von post-hoc Tests (nach Scheffé) wurde analysiert, inwieweit die histologisch diagnostizierten Grade eine differenzierte Vorhersage für den Anteil aneuploider Zellen ermöglichen. Die Residuen wurden auf Normalverteilung geprüft.

Unter Verwendung von logistischen Regressionsanalysen wurde untersucht in wie weit sich ein Karzinom anhand von prozentualen Ploidie-Veränderungen unterschiedlicher Chromosomen diagnostizieren ließ.

Die *Pearson Product Moment Correlation* wurde verwendet um die Ergebnisse der Image Cytometrie mit denen der FISH Analyse zu vergleichen.

Alle statistischen Analysen wurden mit Statistica 6.0 (StatSoft 2002) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Auftreten von molekular- und zytogenetischen Veränderungen in prä-neoplastischen Läsionen in Geweben mit chronischer Pankreatitis

Von 21 Patienten mit chronischer Pankreatitis standen in Paraffin eingebettete Pankreasresektate zur Verfügung. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Resektion lag zwischen 34 und 78 Jahren (Median 55,23 Jahre). Sechzehn der Patienten waren männlich, fünf weiblich. Die Ursache der chronischen Pankreatitis war nur bei zwei Patienten aus den klinischen Angaben gesichert (CP9 und CP10), hier lag ein langzeitiger Alkohol- und Nikotinkonsum zu Grunde. In einem Resektat (CP10) fanden sich zahlreiche PanIN-2- und -3-Läsionen (Abbildung 5). In die Studien wurden azinär-duktales Metaplasien (ADM) Läsionen, auch azinäre Gangmetaplasie genannt, eingeschlossen [Hruban et al., 2007]. Histologisch wurde ein duktales Pankreaskarzinom differentialdiagnostisch ausgeschlossen. PanIN-3- und ADM-Läsionen wurden nur in einem Resektat gefunden (CP10)

4.1.1 Aneuploidie in PanIN-Läsionen in Geweben mit chronischer Pankreatitis

Eine Anzahl von insgesamt 67 unterschiedlichen Foki (15 normale Gänge, 20 PanIN-1, 13 PanIN-2, 11 PanIN-3, 8 ADM) von 8 Patienten mit chronischer Pankreatitis wurden auf numerische Veränderungen der Chromosomen 3, 7, 8 und 17 untersucht. Für alle Chromosomen wurde eine steigende Zahl von aneuploiden Zellen mit zunehmendem PanIN-Grad detektiert (Abbildungen 6 und 7, Tabelle 7). Der Prozentsatz der gefundenen Ploidie-Änderungen war für alle untersuchten Chromosomen hoch prädiktiv für den histologischen Grad (PanIN). Die beste Vorhersage wurde durch die totale Anzahl, der auf das jeweilige Chromosom bezogenen, nicht-diploiden Zellen gegeben (F-Wert 171,0; $p < 0,001$), gefolgt vom prozentualen Anteil der haploiden Zellen (F: 60,3; $p < 0,001$), triploiden Zellen (F: 54,6; $p < 0,001$) sowie dem Anteil an Zellen mit mehr als drei Kopien pro Chromosom (F: 8,3; $p < 0,001$). Die Prädiktion des histologischen Grades, basierend auf dem Anteil der aneuploiden Zellen war unabhängig vom untersuchten Chromosom. In keinem Fall wurden Interaktionen zwischen der verwendeten chromosomalen Sonde, dem PanIN-Grad und dem Prozentsatz der aneuploiden Zellen gefunden (Tabelle 6). Der post-hoc Test (nach Scheffé) zeigte im Durchschnitt höhere Anzahlen von Monosomien und niedrigere Zahlen von Trisomien für Chromosom 17. Im Gegensatz dazu wurden im Durchschnitt höhere Anteile von trisomen Zellen für Chromosom 3 gefunden. Die Ploidieveränderungen in den duktales Metaplasien lagen im Bereich der Veränderungen zwischen PanIN-Grad 1 und 2 (Tabelle 8). Für Chromosom 3, 7, 8 und 17 wurden hier im Durchschnitt 84,5%, 85,6%, 84% und 82,2% an diploiden Zellen gefunden. Für die Chromosomen 7 und 8 fanden sich vergleichbare Mengen an haploiden und triploiden Zellen (Durchschnitt 7% haploid bzw. triploid). Für Chromosom 3 war die Mehrzahl der nicht-diploiden Zellen trisom (9,6% der analysierten

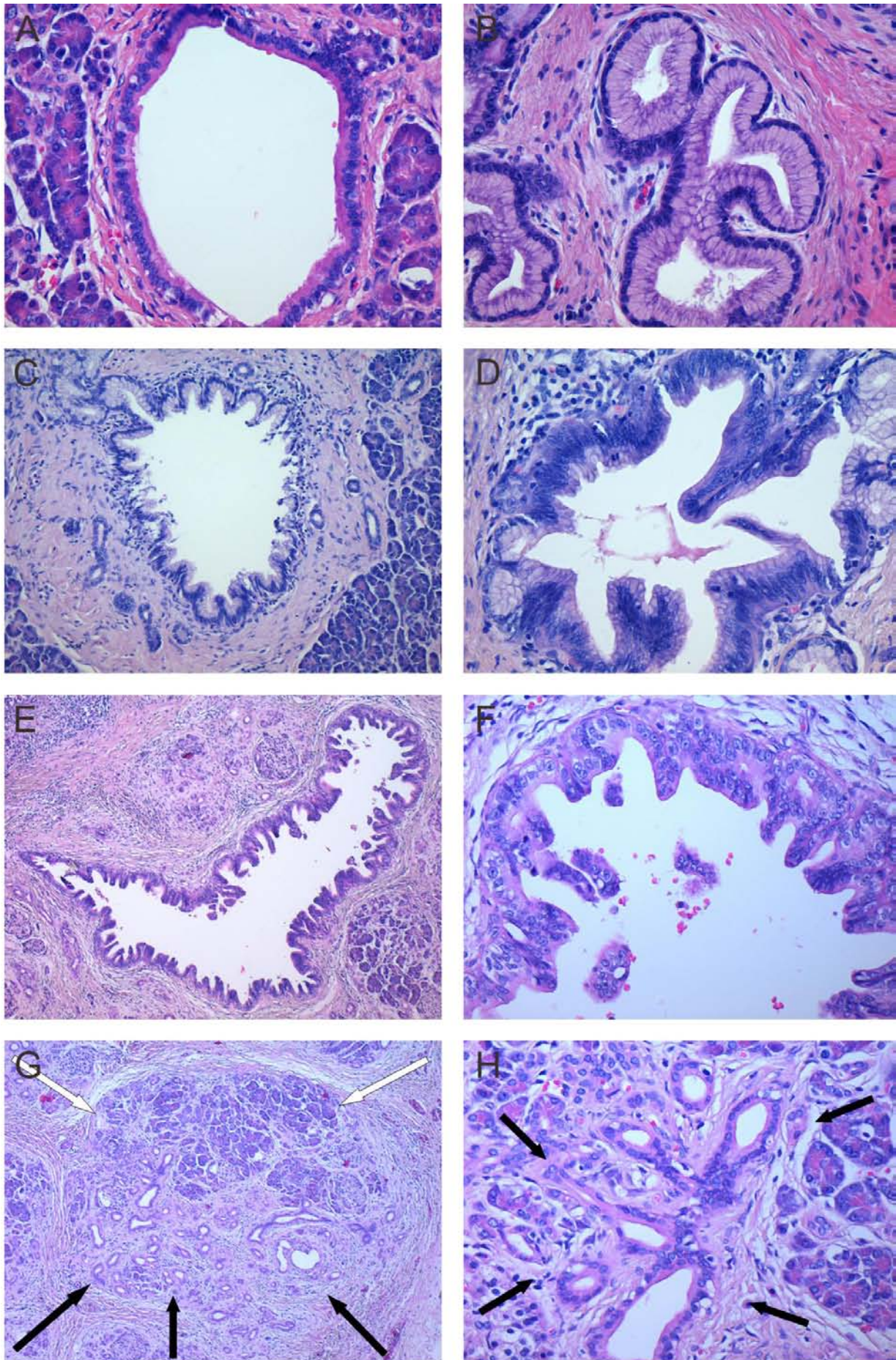


Abbildung 5. Beispiele für PanIN-Läsionen und ADM aus Geweben mit CP.

Abb. 5, Forts.: A: Normaler Gang: Flaches oder kubisches einreihiges Epithel, Kerne ohne Atypien (H&E, x200). B: PanIN-1A. Einreihiges zylindrisches Epithel mit basalständigen Zellkernen und kräftiger Muzinproduktion, keine Kernatypien (H&E x200). C: PanIN-1B. Identischer Zelltyp wie PanIN-1A, jedoch papilläres, mikropapilläres oder basal pseudostratifiziertes Wachstumsmuster (H&E, x100). D: PanIN-2. Flaches bis papilläres Wachstumsmuster des Epithels, die Kerne weisen leichtgadige Atypiezeichen auf wie Kerngrößenschwankungen, Verlust der Polarität, Pseudostratifizierung und Hyper-chromatismus (H&E, x200). E, F: PanIN-3. Zytologisch entsprechen diese Läsionen bereits Karzinomzellen, jedoch ist eine Invasion der Basalmembran nicht vorhanden, so dass ein *Carcinoma in situ* vorliegt. Die Epithelien weisen schwergradige Atypien auf wie Verlust der Kernpolarität mit zum Lumen verschobenen vergrößerten unregelmäßig geformten und stark hyperchromatischen Kernen, welche häufig Makronukleoli aufweisen. Es können atypische Mitosen vorkommen und man erkennt regelmäßig intraduktale irreguläre Drüsenbildungen sowie Nekrosen (E: H&E, x40; F: Vergrößerter Ausschnitt aus E, H&E, x200). G: Azinär-duktales Metaplasie. Niedrige Vergrößerung (H&E, x40) eines Azinus (schwarze und weiße Pfeile) mit Zeichen einer inflammatorischen Zerstörung. In der oberen Hälfte ist verbliebenes Azinus-Gewebe zu erkennen (weiße Pfeile), in der unteren Hälfte ist Azinuszgewebe teilweise durch azinär-duktales Metaplasie ersetzt (schwarze Pfeile). H: Azinär-duktales Metaplasie. Vergrößerter Bereich aus G (H&E, x200). Kleine Gangproliferate nahe an verbliebenem Azinuszgewebe. Die Gänge sind umgeben von fibrosierendem Stroma unterschiedlichen Grades (Pfeile). Das Epithel ist flach bis cuboidal ohne papilläres Wachstum. Keine Kernatypien. [Mit freundlicher Genehmigung von E. Heinmöller]

Zellen versus 5,8% Monosomien). Die Kopiezahl-Veränderungen für Chromosom 17 waren in der Mehrzahl Monosomien (9,9% der analysierten Zellen versus 6,8% Trisomien). Zellen mit mehr als drei Kopien wurden für keines der untersuchten Chromosomen in nennenswerter Anzahl gefunden (im Durchschnitt < 1%).

4.1.2 Molekulare Analysen von Pankreaskarzinom-Signatur-Genen in PanINs aus Geweben mit chronischer Pankreatitis

Diese Untersuchungen wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes am Institut für Pathologie des Klinikum Kassel von Frau Dr. rer. nat. Meike Werther, unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ernst Heinmöller, durchgeführt. Die dargestellten Abbildungen und Ergebnisse sind aus der Dissertation von Frau Dr. Werther und der Habilitationsschrift von Herrn Dr. Heinmöller entnommen.

Die Gewebeproben aus chronischer Pankreatitis wurden molekulargenetisch analysiert. Es erfolgte eine Gen-Analyse mittels Mikrosatelliten-PCR für *p16*, *p53* und *DPC4*. Da der Studienpatient CP10 eine ungewöhnlich hohe Anzahl an PanIN-2- und PanIN-3-Läsionen zeigte, wurde eine Gensequenzanalyse der Gene *p16* und *p53* durchgeführt. DNA für Mikrosatelliten- und Sequenz-Analysen konnte aus 389 Läsionen extrahiert werden (87,8%).

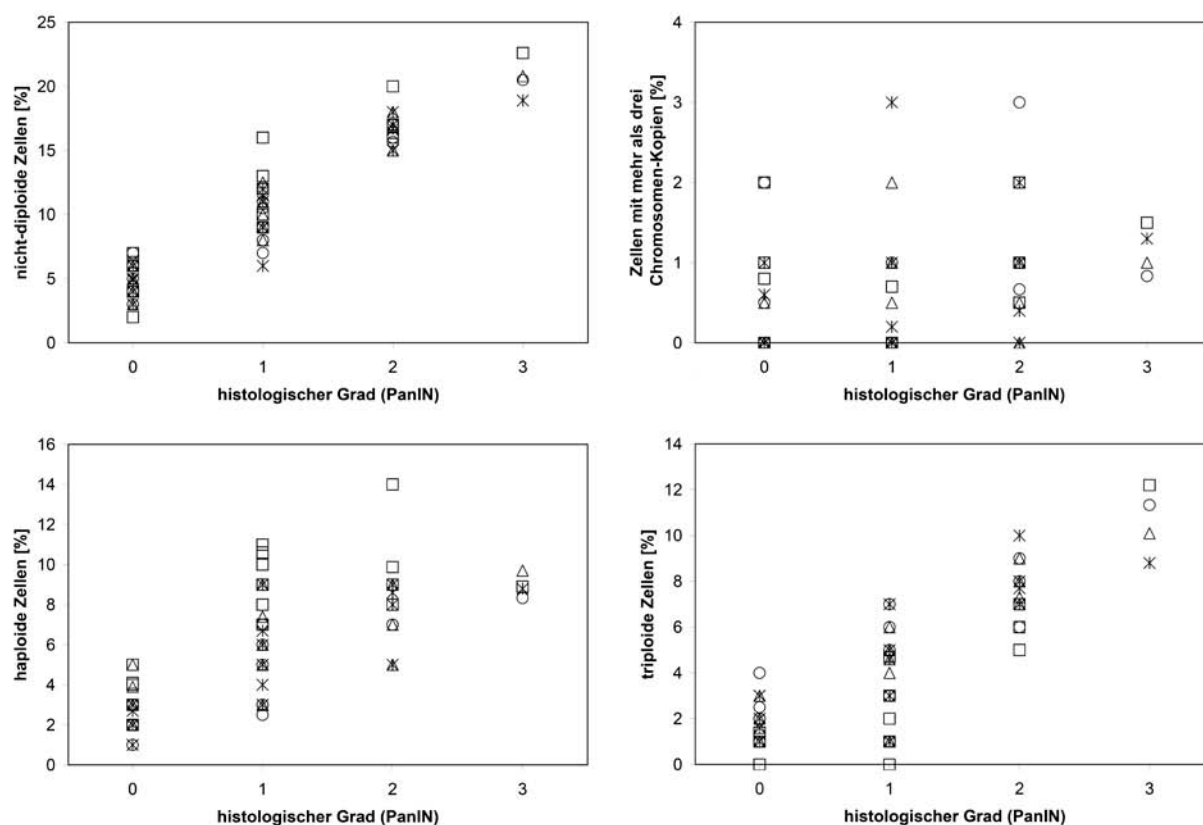


Abbildung 6. Mittels FISH ermittelte prozentuale Anteile von Zellen mit Ploidieveränderungen in den unterschiedlichen PanIN-Graden von acht Patienten. Gezeigt sind die prozentualen Anteile von nicht-diploiden, haploiden, triploiden und polyploiden Zellen in Relation zu den diagnostizierten PanIN-Stufen. (Kreise: Chromosom 3; Sternchen: Chromosom 7; Dreiecke: Chromosom 8; Quadrate: Chromosom 17).

Tabelle 6. F-Werte und Signifikanzniveaus Allgemeiner Linearer Modelle zum Vorhersagewert des histologisch diagnostizierten Grades (PanIN) und der jeweiligen Sonde für den Grad chromosomaler Aneuploidie.

	nicht-diploid	haploid	triploid	polyploid
Grad	171,0*	60,3*	54,6*	8,3*
Sonde	n.s.	13,1*	7,4*	n.s.
Grad x Sonde	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Modell	171,0*	36,7*	31,0	8,3*

* $P < 0,001$; n.s.: nicht signifikant

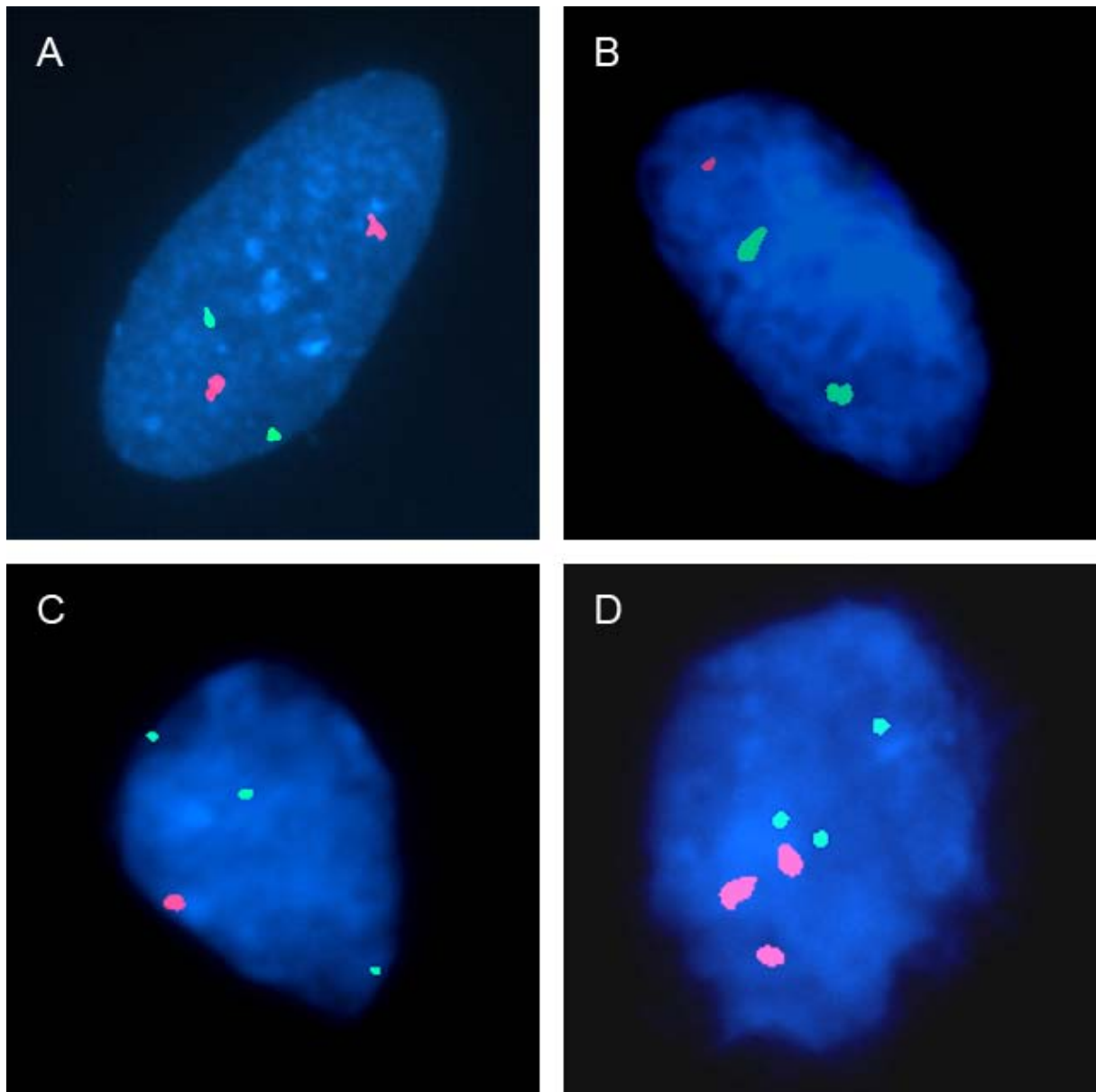


Abbildung 7. Repräsentative Interphase-FISH-Experimente an isolierten Nuklei aus Paraffin-eingebettetem Gewebe (Gegenfärbung: Dapi). A: Für Chromosomen 7 (rot) und 8 (grün) diploider Nukleus aus Normalgewebe. B: Kern aus einer PanIN-1-Läsion mit einer Monosomie für Chromosom 7 (rot) und Disomie für Chromosom 8 (grün). C: Nukleus aus einer PanIN-2-Läsion mit einer Monosomie für Chromosom 3 (rot) und Trisomie für Chromosom 17 (grün). D: Nukleus aus einer PanIN-3-Läsion mit Trisomien für die Chromosomen 7 (rot) und 8 (grün).

Tabelle 7. Ergebnisse der Ploidieanalyse in den unterschiedlichen PanIN für die Chromosomen 3, 7, 8 und 17. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung. PanIN-3-Läsionen fanden sich nur in einem Patienten (CP10).

Chromosom 3				
Stufe	nicht-diploid	haploid	triploid	polyloid
Normal	4,6 ± 1,4	2,1 ± 0,8	2,2 ± 0,8	0,3 ± 0,7
PanIN-1	8,8 ± 1,5	4,2 ± 1,8	4,3 ± 2,1	0,3 ± 0,5
PanIN-2	16,2 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,8 ± 1,3	1,4 ± 1,2
PanIN-3	20,5	8,3	11,3	0,8

Chromosom 7				
Stufe	nicht-diploid	haploid	triploid	polyloid
Normal	4,6 ± 0,9	2,2 ± 0,8	2,2 ± 0,7	0,2 ± 0,4
PanIN-1	9,9 ± 2,1	5,5 ± 2,0	3,8 ± 1,9	0,6 ± 1,1
PanIN-2	16,7 ± 1,3	7,7 ± 1,8	8,2 ± 1,3	0,9 ± 0,9
PanIN-3	18,9	8,8	8,8	1,3

Chromosom 8				
Stufe	nicht-diploid	haploid	triploid	polyloid
Normal	4,5 ± 1,1	3,1 ± 1,0	1,5 ± 0,7	0,1 ± 0,2
PanIN-1	10,2 ± 1,5	5,9 ± 1,9	3,7 ± 1,9	0,6 ± 0,8
PanIN-2	16,2 ± 1,5	7,5 ± 1,9	7,8 ± 0,9	0,6 ± 0,5
PanIN-3	20,8	9,7	10,1	1,0

Chromosom 17				
Stufe	nicht-diploid	haploid	triploid	polyloid
Normal	5,2 ± 1,7	3,6 ± 1,2	0,9 ± 0,4	0,5 ± 0,7
PanIN-1	11,6 ± 2,5	9,5 ± 1,6	2,0 ± 1,5	0,1 ± 0,3
PanIN-2	17,3 ± 1,8	10,2 ± 2,6	6,0 ± 0,8	1,1 ± 0,6
PanIN-3	22,6	8,9	12,2	1,5

Tabelle 8. Ergebnisse der Ploidieanalysen in den duktalem Metaplasien von Patient CP10. Gezeigt sind die Prozentsätze der haploiden, diploiden, triploiden und tetraploiden Zellen für das jeweils untersuchte Chromosom.

Chromosom	haploid	diploid	triploid	tetraploid
3	5,8	84,5	9,6	0,1
7	6,7	85,6	6,8	0,7
8	8,8	84,0	6,7	0,5
17	9,9	82,8	6,8	0,5

4.1.2.1 Loss of Heterozygosity (LOH) am *p16*-, *p53*- und *DPC4*-Locus

Aus resezierten Pankreata von 21 Patienten mit chronischer Pankreatitis wurden insgesamt 443 PanIN- und ADM-Läsionen Laser-mikrodisseziert und PCR-basierten Analysen unterzogen. Die Anzahl der Gänge in den einzelnen Patientengeweben lag zwischen 3 und 108 Gängen. Im Einzelnen wurden 74 normale Gänge, 81 ADM-Läsionen, 122 PanIN-1A-, 66 PanIN-1B-, 31 PanIN-2- und 15 PanIN-3-Läsionen mittels Mikrosatellitenanalyse untersucht. Es wurden MSI-Primer verwendet, welche in der Literatur für die LOH-Analyse und Detektion homozygoter Deletionen der Gene *p16* und *DPC4* beschrieben wurden (Cairns *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 1996). Die Resultate der Mikrosatellitenanalyse der Genloci *p53*, *p16* und *DPC4* sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9. Mikrosatelliten-Analyse der Tumor-Suppressor-Gen-Loci *p16*, *p53* und *DPC4* in Resektaten von 21 Patienten mit CP. Angegeben sind die Frequenzen der LOH-Ereignisse in Prozent der auswertbaren Läsionen.

PanIN	<i>p53</i> -LOH	<i>P16</i> -LOH	<i>DPC4</i> -LOH
No	0/59 (0%)	0/51 (0%)	1/53 (1,8%)
ADM	1/59 (1,7%)	4/69 (5,8%)	1/40 (2,5%)
1A	2/97 (2,1%)	2/74 (2,7%)	0/99 (0%)
1B	0/60 (0%)	1/65 (1,5%)	1/43 (2,3%)
2	4/34 (11,8%)	6/36 (16,7%)	3/32 (9,4%)
3	9/15 (60%)	8/15 (53%)	12/15 (80%)

ADM: Duktale Metaplasie; No: Normaler Gang.

Eine Anhäufung von LOH-Ereignissen war in allen TSG mit steigendem Dysplasiegrad zu verzeichnen. Dieser Anstieg von LOH-Ereignissen war vom Übergang von PanIN-1 zu PanIN-2 signifikant für den *p53*-Locus ($p=0,012$) und *p16*-Locus ($p=0,02$). Am *DPC4*-Locus konnte kein signifikanter Anstieg auf dieser Dysplasiestufe erkannt werden ($p=0,191$). Im Übergang von PanIN-2 zu PanIN-3 fand sich in allen TSG-Loci eine signifikante Erhöhung von LOH-Ereignissen (*p16*: $p=0,042$; *p53*: $p=0,011$; *DPC4*: $p=0,001$). Die leicht erhöhte LOH-Rate von 5,8% in ADM am *p16*-Locus war nicht signifikant höher als am *p53*- und *DPC4*-Locus (*p53*: $p=0,203$; *DPC4*: $p=0,303$). Mit Ausnahme von PanIN-2- und -3-Läsionen des Resektates CP10 konnte kein gleichzeitiges Auftreten von mehrfachen LOH-Ereignissen in einer einzelnen Läsion detektiert werden.

4.1.2.2 Sequenzänderungen der Gene *p16* und *p53* im Gewebe von CP10

Aufgrund der außergewöhnlich hohen Anzahl von PanIN-2- und PanIN-3-Läsionen im Gewebe von CP10 wurden hier Sequenzanalysen der Gene *p16* und *p53* durchgeführt. Durch den Vergleich von Sequenz- und LOH-Daten sollte die exakte zeitliche Folge der Ereignisse im Verlauf der TSG-Inaktivierung in PanINs bei der chronischen Pankreatitis bestimmt werden. Die Sequenzanalyse der Exone 1 und 2 des *p16* Gen-Locus ergab fünf Punktmutationen (Tabelle 10). Eine Insertion von 2 Basenpaaren (TG, bp 263, Exon 2) wurde in 18 PanINs und in einer ADM gefunden. In einer PanIN-2-Läsion konnte diese Mutation in heterozygoter Form gefunden werden, während in dieser Läsion kein LOH am *p16*-Locus detektiert wurde. In allen 15 (100%) PanIN-3-Läsionen fand sich diese Insertion in homozygoter Form. In zwei PanIN-2-Läsionen mit dieser 2 bp Insertion konnte gleichzeitig ein LOH am *p16*-Locus nachgewiesen werden.

Tabelle 10. Sequenzänderungen der Gene *p16* und *p53* im Gewebe von CP10.

PanIN	n	p16 insTG exon 2 (bp263)	p16 G>A exon 2 (bp277)	p16 C>T exon 2 (bp344)	p16 C>T intron1 (bp-25)	p16 G>A intron1 (bp-12)	p53 C>T exon 8 (bp14501)
No	14	0	0	0	0	0	0
ADM	9	1 (11%)	1 (11%)	0	0	0	1 (11%), het
1A	13	0	0	0	1 (8%)	0	1 (8%), het
1B	9	0	0	0	0	1 (11%)	0
2	16	3 (19%), 1het	1 (6%)	1 (6%)	0	0	6 (38%), 3het
3	15	15 (100%)	0	0	0	0	15 (100%), 4het

ADM: Duktale Metaplasie; No: Normaler Gang; n: Anzahl informativer Läsionen; het: Heterozygote Sequenzänderungen.

Tabelle 11. Übersicht über die Mutationen der Gene *p16* und *p53* sowie gesamte LOH der Genloci *p16*, *p53* und *DPC4* im Gewebe des Studienpatienten CP10.

PanIN	n	p16 Seq.	p53 Seq.	het. Seq.	p16 LOH	p53 LOH	DPC4 LOH
No	14	0	0	0	0	0	0
ADM	9	2 (22%)	1 (11%)	2 (22%)	2 (22%)	0	0
1A	13	1 (8%)	1 (8%)	2 (16%)	0	0	0
1B	9	1(11%)	0	0	0	0	0
2	16	4 (25%)	6 (38%)	4 (25%)	5 (31%)	4 (25%)	3 (19%)
3	15	15(100%)	15(100%)	4 (25%)	8 (53%)	9 (60%)	12 (80%)

n: informative mikrodyssezierte Pankreasgänge; Seq: Sequenzänderung; het: heterozygote Sequenzänderung; No: normaler Gang; ADM: Duktale Metaplasie.

4.1.2.3 Immunhistochemische Expressionsanalysen der Tumor-Suppressor-Gene *p16*, *p53* und *DPC4* in Geweben mit chronischer Pankreatitis

In den Resektaten von 10 Patienten mit CP wurde die Expression der Proteine p53, p16 und DPC4 immunhistochemisch analysiert. Insgesamt konnten eine Anzahl von 262 Pankreasgängen ausgewertet werden (73 Gänge mit normalem Epithel, 104 PanIN-1A-Läsionen, 44 PanIN-1B-Läsionen, 25 PanIN-2-Läsionen und 16 PanIN-3-Läsionen). Alle PanIN-3-Läsionen fanden sich ausschließlich im Gewebe von CP10. Ein Verlust der DPC4-Expression und keine p53-Überexpression konnte in den Geweben CP1-9 detektiert werden. Ein Verlust der p16-Expression wurde in 5/25 (20%) der PanIN-2-Läsionen der Patienten CP1-9 gefunden. Alle untersuchten PanIN-1 und ADM zeigten eine normale p16-Expression. Im Resektat CP10 zeigte in sich 2/16 (12%) PanIN-2-Läsionen eine schwache p53-Überexpression, wobei sich jeweils ein LOH und eine heterozygote Mutation des *p53*-Gens in beiden Läsionen nachweisen ließ. Alle PanIN-3-Läsionen zeigten unterschiedlich starke *p53*-Überexpressionen. Außerdem fanden sich in allen untersuchten PanIN-3-Läsionen Expressionsverluste von p16 und DPC4. Dabei konnte ein Verlust von DPC4 ausschließlich in PanIN-3-Läsionen nachgewiesen werden. Wobei in 10 der 16 PanIN-2-Läsionen (62%) für das p16-Protein zumindest teilweise in den Gangepithelien ein sektorförmiger Färbeverlust vorlag. In vier dieser PanIN-2-Läsionen konnten entweder ein LOH am *p16*-Locus oder Mutationen in Exon 2 des Gens nachgewiesen werden. In den PanIN-Läsionen und ADM konnte ein Verlust des p16-Proteins nicht eindeutig detektiert werden.

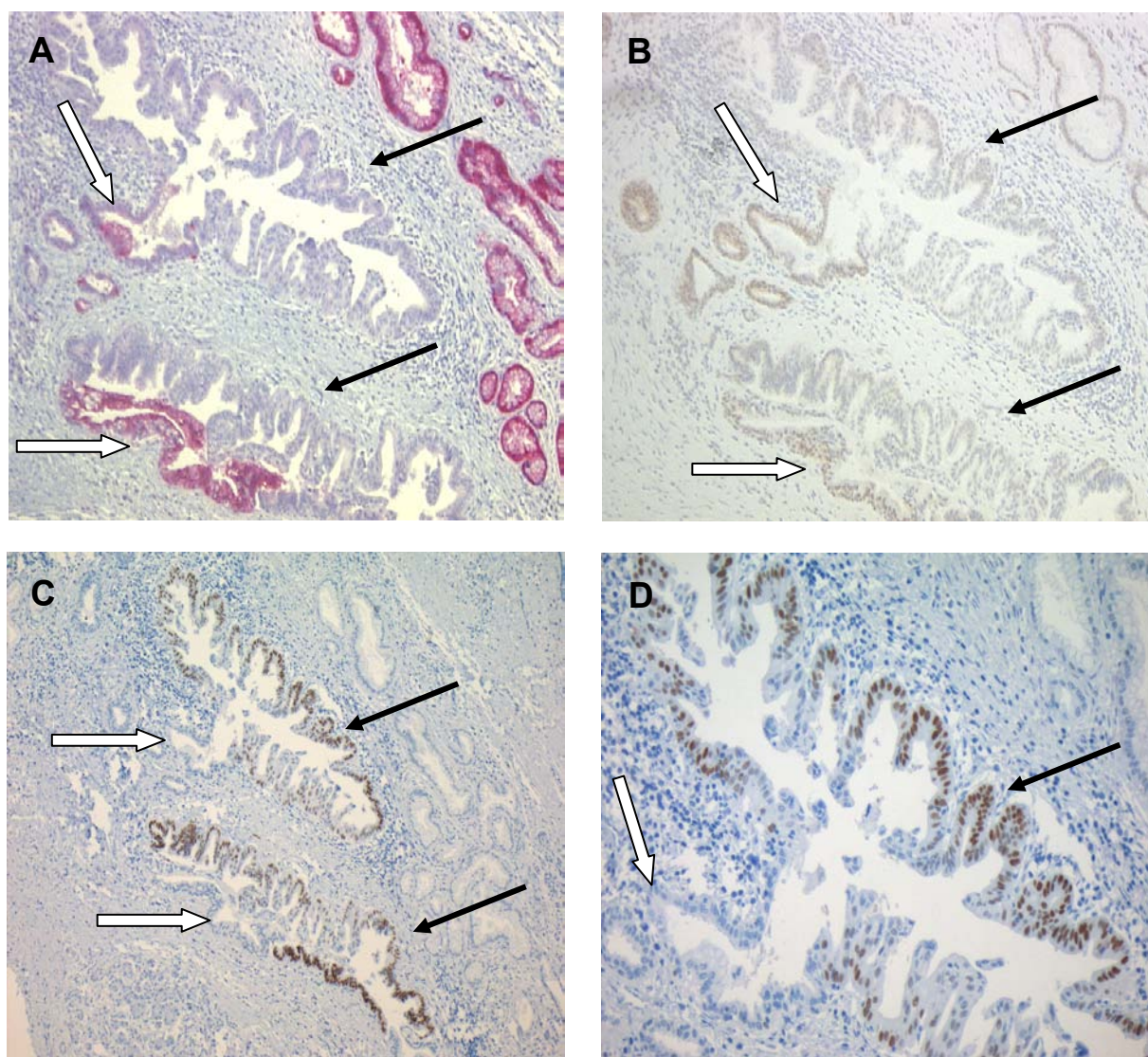


Abbildung 8. Immunohistochemische Expressions-Analyse von p16, DPC4 und p53 in einer PanIN-3-Läsion des Studienpatienten CP10. A: Ausfall der Proteinexpression für p16 (dunkle Pfeile) und B: DPC4-Protein im Gangepithel mit hochgradiger Kerndysplasie und deutlicher Architekturstörung des Epithels (helle Pfeile). In C und D ist eine Überexpression von p53 (dunkle Pfeile) zu erkennen von dem nicht das gesamte Epithel betroffen ist (helle Pfeile). (A, B x100; C x40; D x200).
[Mit freundlicher Genehmigung von E. Heinmöller]

4.2 Entwicklung von Biomarkern zur Detektion von malignen Zellen im Pankreassekret

Die korrekte Bindung der Sonden und das Ausbleiben von Kreuzhybridisierungen konnte für alle Centromersonden (CEP) an Leukozyten-Kernen bestätigt werden. Der durchschnittliche prozentuale Anteil von Zellen mit diploiden Signalen für alle CEP betrug bei den Leukozyten-Präparationen $97,5 \pm 1,1\%$.

4.2.1 Zytogenetische Untersuchungen an Pankreaskarzinom-Zelllinien

Die Hybridisierung der Centromersonden auf die Pankreaskarzinom-Zelllinien zeigte insgesamt ein heterogenes Bild von Kopiezahl-Veränderungen innerhalb der einzelnen und zwischen den unterschiedlichen Zelllinien (Abbildung 8). Aus den Werten für die Anteile an diploiden Zellen wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichungen (ohne Leukozyten) bestimmt:

Tabelle 12. Ergebnisse der Hybridisierungen von Centromersonden auf 11 Pankreaskarzinom-Zelllinien. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile von diploiden Zellen.

	CEP4	CEP7	CEP8	CEP9	CEP12	CEP17	CEP18	CEP20
Mittelwert	46,6	7,3	21,9	47	21,8	36,7	52,4	15,3
SD	33,1	8,7	23,8	36,1	25,2	37,5	28,1	10,8

Für die Untersuchung an klinischem Material wurden solche CEP ausgewählt, die den geringsten Anteil an diploiden Zellen ergab und deren Standardabweichung möglichst gering war. Auf dieser Basis wurden CEP7 (MW: $7,3 \pm 8,7\%$), CEP20 (MW: $15,3 \pm 10,8\%$) und CEP8 (MW: $21,9 \pm 23,8\%$) gewählt. Anstelle von CEP12 (MW: $21,8 \pm 25,2\%$) wurde jedoch CEP17 mit in die weiteren Untersuchungen einbezogen, da sich mit dem für das Pankreaskarzinom bereits beschriebenen, auf Chromosom 17 kodierten Onkogen *Her2*, ein ideales Target für FISH-Untersuchungen anbot.

4.2.2 Entwicklung von Locus-spezifischen Sonden

Die Funktionstüchtigkeit der Locus-spezifischen Sonden wurde zunächst an Metaphase-Präparationen getestet und Kreuz- bzw. Fehlhybridisierungen der einzelnen Sonden ausgeschlossen (Abbildung 9). Die durchschnittliche Zahl von diploiden Signalen für die generierten Sonden betrug bei den Leukozyten-Präparationen 97 bis 98%.

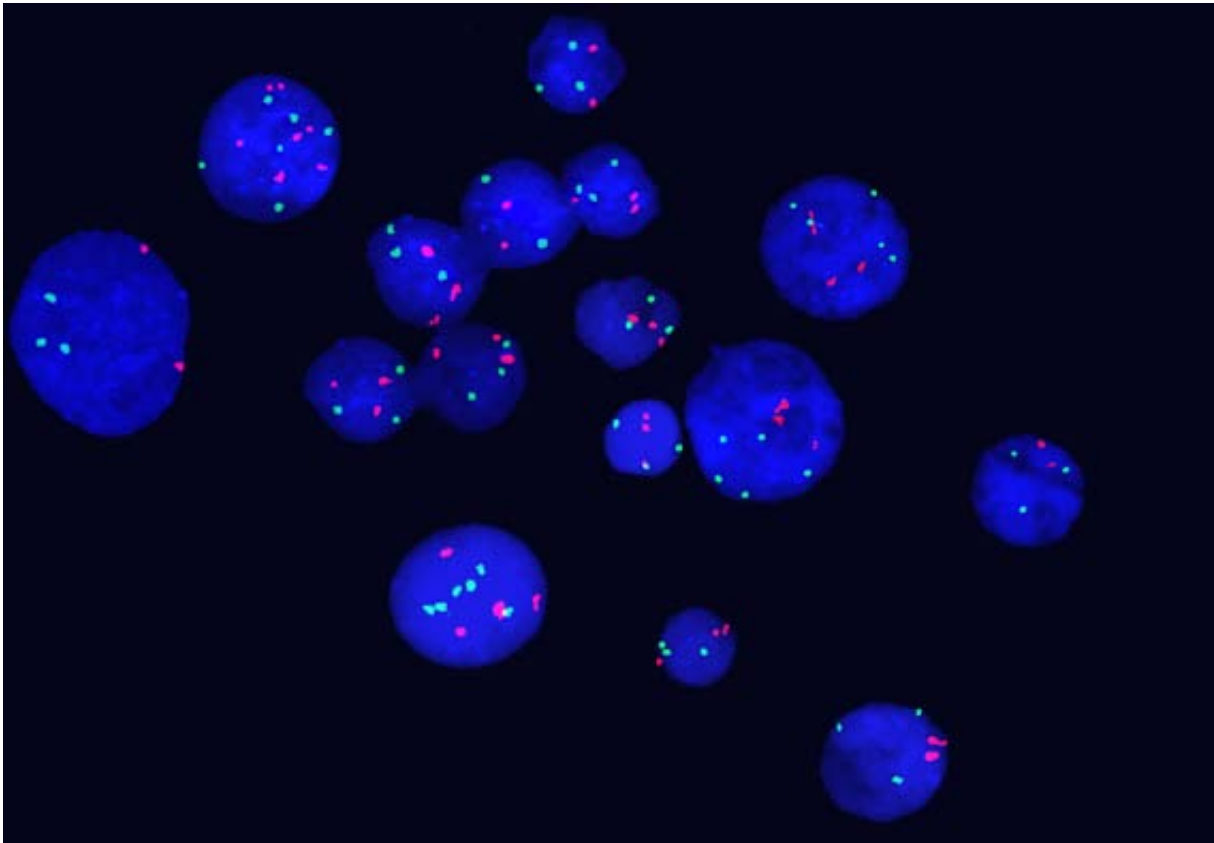


Abbildung 9. Hybridisierung von Centromersonden auf Zelllinien. Hier wurden Sonden für die Chromosomen 8 (rot) und 12 (grün) auf die Zelllinie MiaPaCa-2 hybridisiert.

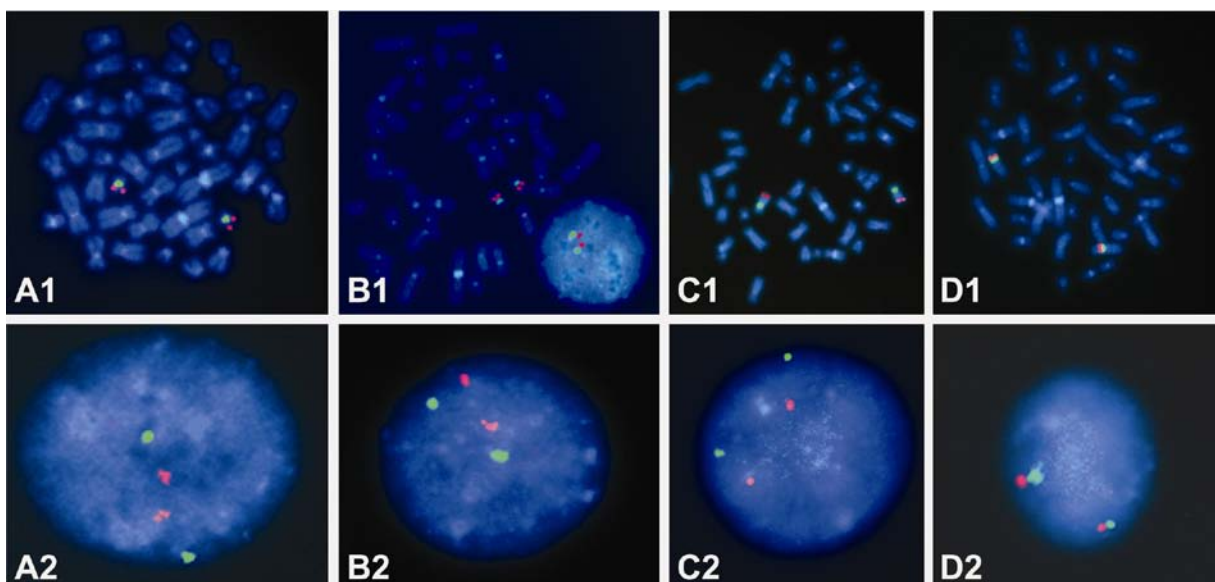


Abbildung 10. Test der Locus-spezifischen Sonden auf Leukozyten-Metaphase-Präparaten. Die obere Reihe (A1-D1) zeigt Hybridisierungen an Metaphasen, die untere Reihe (A2-D2) zeigt Hybridisierungen an diploiden Interphase-Nuklei aus denselben Präparaten. A1+2: *EGFR* und Cep7, B1+2: *cMYC* und Cep8, C1+2: *Her2* und Cep17, D1+2: *AIB1* und Cep20. (rot: Locus-spezifische Sonden, grün: Centromersonden)

4.2.3 Bestimmung der chromosomalen und genetischen Aneuploidie an Zelllinien

In allen Zelllinien war auch hier ein heterogenes Bild von Chromosomen und Locus-spezifischen Kopiezahl-Veränderungen zu finden (Abbildung 10). Die Amplifikation der Onkogene ist abhängig von dem Verhältnis (Ratio) der Anzahl der Genkopien zu der Anzahl der Kopien des korrespondierenden Chromosoms. Dabei wurden Ratios von größer als 1 und kleiner 2 als Zugewinn, Ratios von 2 als Amplifikation und von größer als 2 als hochgradige Amplifikation gewertet. Eine hochgradige Amplifikation von Onkogenen konnte in der Regel nicht beobachtet werden. Eine Ausnahme stellt hierbei die Zelllinie Su.86.86 dar. Hier konnte eine Amplifikation des *AIB1*-Gens detektiert werden (43% der untersuchten Zellen hatten eine Ratio zwischen 1 und 2, 23% eine Ratio von 2 und 25% eine Ratio größer zwei). Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13. Ergebnisse der Untersuchungen zur Amplifikation von Onkogenen an den untersuchten Zelllinien.

Zelllinie	<i>EGFR</i>	<i>cMYC</i>	<i>Her2</i>	<i>AIB1</i>
SU.86.86	+	n	-	++ bis +++
MiaPaCa-2	+	+	+ - (n bis +)	n bis +
Capan-1	+ - (n)	+ bis ++	+ bis ++	+ - (+ bis ++)
Capan-2	+ bis ++	+	+ bis ++	+ - (n bis +)
Panc-1	+ - (+)	+ - (+)	++	+ - (+)

--Verlust, - geringer Verlust, +- Gewinne und Verluste, + Zugewinn, ++ Amplifikation, +++ hochgradige Amplifikation, n: normal, die Werte in Klammern geben bei Gewinnen und Verlusten das resultierende Ergebnis an.

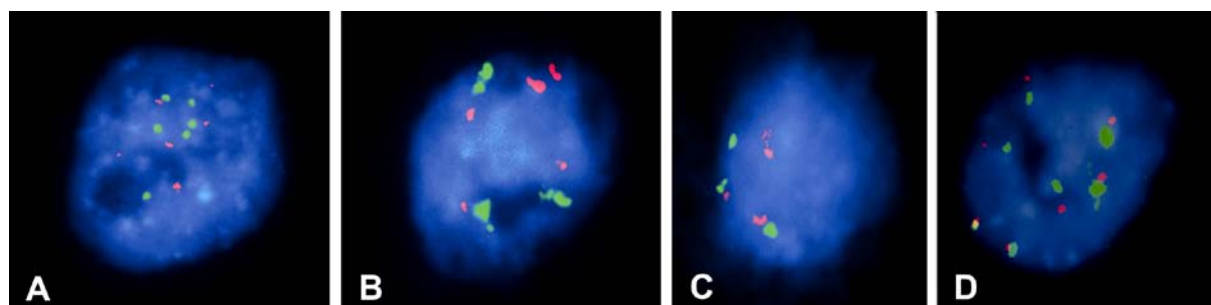


Abbildung 11. Hybridisierung der FISH-Sonden auf die Zelllinie MiaPaCa-2. Beispiele für das Auftreten von chromosomaler Aneuploidie. A: *EGFR* mit Cep7, B: *cMYC* mit Cep8, C: *Her2* mit Cep17, D: *AIB1* mit Cep 20. (rot: Locus-spezifische Sonden, grün: Centromersonden)

4.3 Ploidieanalysen an Interphasekernen aus Pankreassekreten

4.3.1 Aspirationszytologie

Im Zeitraum von Mai 2003 bis August 2006 wurden in der Abteilung für Gastroenterologie des Göttinger Universitätsklinikums sowie der Endoskopischen Abteilung des Evangelischen Krankenhauses Weende in Göttingen endoskopische Proben gesammelt. Aus den beiden Kliniken wurden in dem angegebenen Zeitraum 50 Pankreassekrete durch Aspiration während der ERCP gewonnen. Aus dem Sekret von 25 dieser 50 Patienten ließen sich Zellkerne isolieren (Kollektiv 1). Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung lag zwischen 34 und 84 Jahren (Median 60,4). Elf der Patienten waren männlich, 14 waren weiblich. Vier Patienten hatten Karzinome (2 PDAC, 1 Klatskintumor, 1 Adenokarzinom des Gallengangs). 21 Patienten hatten benigne Erkrankungen des Pankreas, der Gallenwege oder der Leber.

Im Mittel wurden weniger diploide Zellen in den Proben von Patienten mit einer malignen Erkrankung detektiert (im Mittel 63-67% diploide Zellen, Tabelle 14). Die hohe Standardabweichung in den Analysen innerhalb dieser Patientengruppe ist durch eine sehr heterogene Verteilung von Ploidieveränderungen bedingt (Bereich 11-95% diploide Zellen). In der Gruppe der gutartigen Erkrankungen (Chronische Pankreatitis, Gallenwegs- und Lebererkrankungen) wurden im Mittel zwischen 89 und 94% diploide Zellen gefunden (Standardabweichung zwischen 2,4 und 5,7%). Amplifikationen von Onkogenen konnten weitestgehend nicht gezeigt werden. Nur bei einem Patienten mit einem Adenokarzinom (Fall 25) konnte eine hochgradige Amplifikation für den *MYC*-Locus beobachtet werden (74% der Zellen hatten eine Ratio größer 2). In der Probe dieses Patienten wurde zusätzlich ein leichter Zugewinn (ca. 20% der Zellen mit einer Ratio zwischen 1 und 2) für den *EGFR*- und den *Her2*-Locus detektiert.

Den besten Vorhersagewert für das Vorliegen eines Karzinoms lieferte die Anzahl an Zellen mit Trisomien für Chromosom 8 ($\chi^2 = 14,9$; $p < 0,001$, $R^2 = 69\%$) (Tabelle 15). Von den untersuchten Fällen mit einem Karzinom hatten 100% einen Anteil von triploiden Zellen für Chromosom 8 (Bereich von 9-70%; Mittelwert $25,5 \pm 29,3\%$). In den Proben von Patienten mit einer benignen Erkrankung fanden sich Trisomien für Chromosom 8 in 18/20 (90%) der untersuchten Fälle, wobei hier der Bereich niedriger war (1-9%, Mittelwert $3,4 \pm 2,6\% - 5,8 \pm 1,3\%$). Die Gesamtanzahl von nicht-diploiden Zellen für Chromosom 8 lieferte ähnlich hohe Werte ($\chi^2 = 14,2$; $p < 0,001$, $R^2 = 65,7\%$). Von den untersuchten Fällen mit einem Karzinom hatten 100% einen Anteil von nicht-diploiden Zellen für Chromosom 8 (Bereich von 14-74%), im Gegensatz zu den benignen Erkrankungen mit Anteilen von nicht-diploiden Zellen im Bereich von 2-17%. Der Einsatz von Locus-spezifischen Sonden ergab die beste

Differenzierbarkeit zwischen malignen und benignen Erkrankungen unter Betrachtung des Anteils an diploiden Zellen für *EGFR* ($\chi^2 = 13,1$; $p < 0,001$, $R^2 = 59,4\%$) (Tabelle 16), gefolgt von dem Anteil an Tetrasomien für *EGFR* ($\chi^2 = 12,4$; $p < 0,001$, $R^2 = 56,4\%$).

Tabelle 14. Ergebnis der Ploidieanalysen an Aspirationszytologien des Pankreas. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für die prozentualen Anteile an, für das jeweilige Chromosom, ha- bis polyploiden Zellen, sowie die Anzahl (n) der Fälle in denen Nuklei mit diesem Ploidiestatus detektiert wurden.

	Chromosom							
	7	(n)	8	(n)	17	(n)	20	(n)
haploide Zellen (%)								
Karzinome	3,0 ± 1,0	3/4	4,0 ± 2,6	4/4	5,0 ± 4,6	3/3	5,0 ± 5,7	2/3
Chronische Pankreatitis	3,4 ± 1,8	5/8	2,1 ± 1,5	7/8	3,4 ± 2,4	7/7	2,4 ± 2,0	8/8
Gallenwegserkrankungen	2,0 ± 0,9	9/9	3,3 ± 1,0	8/8	3,4 ± 2,1	7/7	3,8 ± 1,4	9/9
Lebererkrankungen	6,0 ± 4,4	3/4	3,8 ± 2,2	4/4	3,3 ± 3,2	3/3	3,3 ± 0,6	3/3
diploide Zellen (%)								
Karzinome	63,5 ± 35,0	4/4	67,3 ± 28,0	4/4	63,0 ± 45,3	3/3	66,7 ± 40,7	3/3
Chronische Pankreatitis	93,8 ± 2,4	8/8	92,3 ± 3,7	8/8	92,1 ± 3,5	7/7	92,4 ± 3,4	8/8
Gallenwegserkrankungen	92,7 ± 5,3	9/9	92,9 ± 3,8	8/8	94,1 ± 3,1	7/7	93,6 ± 3,4	9/9
Lebererkrankungen	90,3 ± 5,7	4/4	89,3 ± 4,9	4/4	90,3 ± 4,7	3/3	90,0 ± 4,6	3/3
triploide Zellen (%)								
Karzinome	15,1 ± 8,3	4/4	25,5 ± 29,3	4/4	7,3 ± 6,1	3/3	13,3 ± 14,5	3/3
Chronische Pankreatitis	3,9 ± 2,6	8/8	5,8 ± 1,3	7/8	4,7 ± 2,7	6/7	4,9 ± 1,8	7/8
Gallenwegserkrankungen	5,4 ± 4,7	8/9	3,4 ± 2,6	7/8	3,5 ± 1,9	4/7	4,0 ± 3,1	6/9
Lebererkrankungen	4,5 ± 2,1	4/4	5,5 ± 2,6	4/4	3,7 ± 3,8	3/3	4,3 ± 2,5	3/3
tetraploide Zellen (%)								
Karzinome	24,4 ± 30,9	3/4	2,5 ± 1,3	4/4	64,0	1/3	49,0	1/3
Chronische Pankreatitis	1,0	1/8	2,4 ± 1,7	5/8	1,0	1/7	1,8 ± 1,5	4/8
Gallenwegserkrankungen	2,5 ± 0,7	2/9	3,0 ± 0,0	2/8	1,5 ± 0,7	2/7	0,0	0/9
Lebererkrankungen	3,0	1/4	1,3 ± 0,6	3/4	3,0 ± 0,0	2/3	3,5 ± 2,1	2/3
polyploide Zellen (%)								
Karzinome	1,5 ± 0,7	2/4	2,0 ± 0,0	2/4	10,0	1/3	1,0	1/3
Chronische Pankreatitis	0,0	0/8	0,0	0/8	2,0	1/7	1,0	1/8
Gallenwegserkrankungen	0,0	0/9	1,0	1/8	0,0	0/7	0,0	0/9
Lebererkrankungen	0,0	0/4	1,0 ± 0,0	2/4	8,0	1/3	0,0	0/3

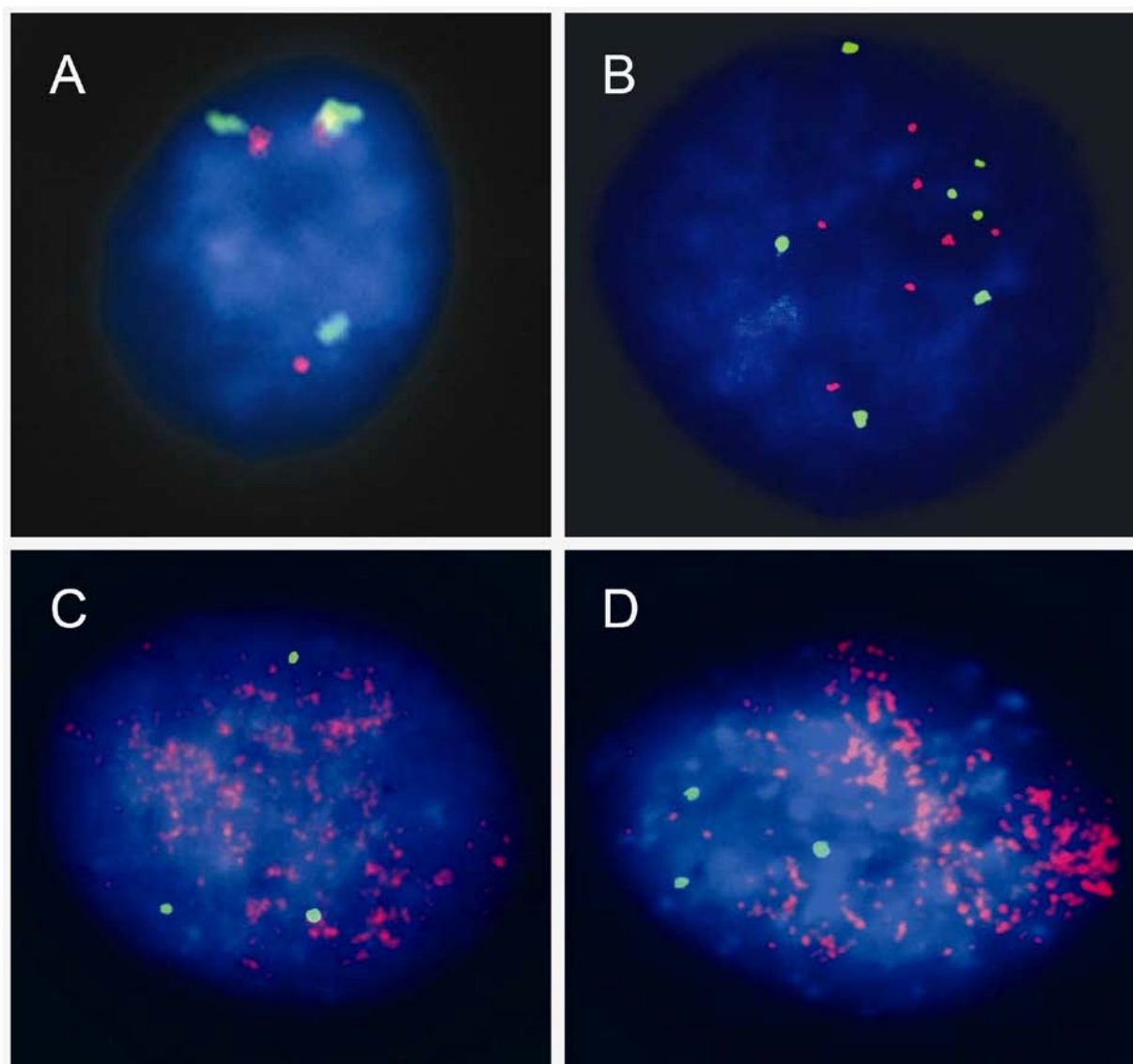


Abbildung 12. Repräsentative FISH-Experimente an isolierten Nuklei aus Pankreassekret (Gegenfärbung: Dapi). A: Nukleus mit einer Trisomie für Chromosom 7 (grün) und den *EGFR*-Locus (rot). B: Kern mit einer Polysomie für Chromosom 17 (grün) und den *Her2*-Locus (rot). C und D: Nuklei von Patient 25 mit einer Trisomie für Chromosom 8 (grün) und hochgradiger Amplifikation des *cMYC*-Locus (rot).

Tabelle 15. Ergebnisse der Anpassung eines logistischen Regressionsmodells an eine unabhängige Variable zur Beschreibung der Diagnostizierbarkeit des Karzinoms (maligne vs. benigne) anhand von prozentualen Ploidie-Veränderungen unterschiedlicher Chromosomen in Zellen, die durch „Aspiration“ gewonnen wurden. Angegeben ist das Ergebnis des *Likelihood Ratio Tests* (Chi²) sowie das Signifikanzniveau, der prozentuale Anteil der erklärten Varianz (R²) und die Anzahl der untersuchten Fälle (N).

Sonde	Prediktor	Chi ²	R ²	N
Centromer, Chromosom 7	nicht-diploide Zellen (%)	11,9***	54,2	25
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	25
	triploide Zellen (%)	10,3**	46,8	25
	tetraploide Zellen (%)	n.s.	-	25
	polyploide Zellen (%)	8,4**	38,2	25
Centromer, Chromosom 8	nicht-diploide Zellen (%)	14,2***	65,7	24
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	24
	triploide Zellen (%)	14,9***	69,0	24
	tetraploide Zellen (%)	n.s.	-	24
	polyploide Zellen (%)	5.1*	23,4	24
Centromer, Chromosom 17	nicht-diploide Zellen (%)	5,8*	33,6	21
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	21
	triploide Zellen (%)	n.s.	-	21
	tetraploide Zellen (%)	4.0*	23,1	21
	polyploide Zellen (%)	n.s.	-	21
Centromer, Chromosom 20	nicht-diploide Zellen (%)	5.0*	28,6	22
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	22
	triploide Zellen (%)	4,7*	27,1	22
	tetraploide Zellen (%)	3,9*	22,2	22
	polyploide Zellen (%)	n.s.	-	22

n.s. P > 0,05; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Tabelle 16. Ergebnisse der Anpassung eines logistischen Regressionsmodells an eine unabhängige Variable zur Beschreibung der Diagnostizierbarkeit des Karzinoms (maligne vs. benigne) anhand von prozentualen Ploidie-Veränderungen unterschiedlicher Gen-Loci in Zellen, die durch „Aspiration“ gewonnen wurden. Angegeben ist das Ergebnis des *Likelihood Ratio Tests* (Chi²) sowie das Signifikanzniveau, der prozentuale Anteil der erklärten Varianz (R²) und die Anzahl der untersuchten Fälle (N).

Sonde	Prediktor	Chi²	R²	N
<i>EGFR</i> -Locus, Chromosom 7	nicht-diploide Zellen (%)	13,1***	59,4	25
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	25
	triploide Zellen (%)	7,8***	35,7	25
	tetraploide Zellen (%)	12,4***	56,4	25
	polyploide Zellen (%)	n.s.	-	25
<i>MYC</i> -Locus, Chromosom 8	nicht-diploide Zellen (%)	n.s.	-	24
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	24
	triploide Zellen (%)	4,1*	18,7	24
	tetraploide Zellen (%)	8,8**	40,1	24
	polyploide Zellen (%)	11,1***	51,3	24
<i>Her2</i> -Locus, Chromosom 17	nicht-diploide Zellen (%)	4,8*	28,2	20
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	20
	triploide Zellen (%)	n.s.	-	20
	tetraploide Zellen (%)	n.s.	-	20
	polyploide Zellen (%)	4,2*	24,9	20
<i>AIB1</i> -Locus, Chromosom 20	nicht-diploide Zellen (%)	4,0*	23,5	23
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	23
	triploide Zellen (%)	4,4*	24,5	23
	tetraploide Zellen (%)	n.s.	-	23
	polyploide Zellen (%)	4,1*	23,1	23

n.s. P > 0,05; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

4.3.2 Bürstenzytologie

In der Klinik für Gastroenterologie des Oskar-Ziethen-Krankenhauses in Berlin wurden im Zeitraum von Mai 2005 bis Juni 2006 während der ERCP von 12 Patienten Proben mit einer Biopsiebürste gewonnen. Aus den Proben von 11 dieser 12 Patienten (ca. 92%) ließen sich Zellkerne isolieren (Kollektiv 2). Fünf der Patienten hatten Karzinome (1 Neuroendokriner Tumor des Pankreas, 3 Adenokarzinome des Pankreas, 1 Gallengangskarzinom), in den anderen 6 Patienten, meistens mit chronischer Pankreatitis, konnte kein Hinweis auf Malignität im Pankreas gefunden werden. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung lag zwischen 39 und 80 Jahren (Median 58,6). 8 der Patienten waren männlich, 3 waren weiblich.

Im Mittel wurden für die Chromosomen 7, 8 und 20 weniger diploide Zellen in den Proben der Patienten mit einer malignen Erkrankung ($85,8 \pm 12,1\%$; $89,4 \pm 10,7\%$; $86,4 \pm 12,6\%$) gegenüber den Patienten mit chronischer Pankreatitis gefunden ($95,2 \pm 1,8\%$; $96,7 \pm 1,2\%$; $96,5 \pm 1,4\%$) (Tabelle 17). Für Chromosom 17 wurden in beiden Gruppen ähnlich hohe Ergebnisse erzielt ($87,2 \pm 7,8\%$ diploide Zellen in Zytologien von Patienten mit Karzinom vs. $84,7 \pm 4,8\%$ bei chronischer Pankreatitis). Auch in diesem Kollektiv war in der Gruppe der Patienten mit einem Karzinom eine sehr heterogene Verteilung von Ploidie-Veränderungen detektierbar (Bereich 69-100% diploide Zellen vs. 86-99% diploide Zellen in Präparaten von Patienten mit chronischer Pankreatitis).

Amplifikationen von Onkogenen konnten nur in der Ausnahme gefunden werden. Bei einem Patienten mit einem Adenokarzinom (Fall B-14) konnte eine hochgradige Amplifikation für den *MYC*-Locus beobachtet werden (45% der Zellen hatten eine Ratio größer 2). In der Probe dieses Patienten wurde ansonsten kein deutlicher Gewinn oder Verlust von untersuchten chromosomalen Regionen nachgewiesen.

Den besten Vorhersagewert für das Vorliegen eines Karzinoms lieferte die Anzahl von diploiden Zellen für Chromosom 20 ($\chi^2 = 5,8$; $p < 0,05$, $R^2 = 38\%$) (Tabelle 18). Von den untersuchten Fällen mit einem Karzinom war in 100 % eine Abnahme des Anteils von für Chromosom 20 diploiden Zellen zu verzeichnen (Bereich von diploiden Zellen 69-97%; Mittelwert $89,4 \pm 10,7\%$). In den Proben der Patienten mit chronischer Pankreatitis konnten für Chromosom 20 diploide Zellen im Bereich von 95-98% gefunden werden (Mittelwert $96,5 \pm 1,4\%$). Der Einsatz von Locus-spezifischen Sonden ergab die beste Differenzierbarkeit zwischen malignen und benignen Erkrankungen unter Betrachtung des Anteils an diploiden Zellen für *Her2* ($\chi^2 = 6,2$; $p < 0,05$, $R^2 = 40,8\%$) (Tabelle 19), gefolgt von dem Anteil an Trisomien für *AIB1* ($\chi^2 = 5,1$; $p < 0,05$, $R^2 = 33,4\%$).

Tabelle 17. Ergebnis der Ploidieanalysen an Bürstenzytologien des Pankreas. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für die prozentualen Anteile an, für das jeweilige Chromosom, ha- bis polyploiden Zellen, sowie die Anzahl (n) der Fälle in denen Nuklei mit diesem Ploidiestatus detektiert wurden.

	Chromosom							
	7	(n)	8	(n)	17	(n)	20	(n)
haploide Zellen (%)								
Karzinome	4,2 ± 6,1	5/5	5,3 ± 2,1	4/5	7,7 ± 3,8	5/5	2,9 ± 1,2	5/5
Chronische Pankreatitis	2,0 ± 1,0	5/6	2,0 ± 1,1	6/6	4,7 ± 4,6	6/6	2,8 ± 0,8	6/6
diploide Zellen (%)								
Karzinome	85,8 ± 12,1	5/5	89,4 ± 10,7	5/5	87,2 ± 7,8	5/5	86,4 ± 12,6	5/5
Chronische Pankreatitis	95,2 ± 1,8	6/6	96,7 ± 1,2	6/6	84,7 ± 4,8	6/6	96,5 ± 1,4	6/6
triploide Zellen (%)								
Karzinome	7,6 ± 6,3	5/5	4,7 ± 3,8	3/5	8,0 ± 8,7	3/5	8,3 ± 7,3	4/5
Chronische Pankreatitis	3,0 ± 2,4	6/6	1,9 ± 1,0	4/6	1,3 ± 0,6	3/6	1,0 ± 0,0	4/6
tetraploide Zellen (%)								
Karzinome	5,5 ± 4,0	2/5	6,0 ± 5,7	2/5	0,0	0/5	9,0 ± 4,2	2/5
Chronische Pankreatitis	1,0	1/6	1,0	1/5	0,0	0/6	0,0	0/6
polyploide Zellen (%)								
Karzinome	1,0	1/5	6,0	1/5	2,0	1/5	3,0	1/5
Chronische Pankreatitis	0,0	0/6	0,0	0/6	0,0	0/6	0,0	0/6

Tabelle 18. Ergebnisse der Anpassung eines logistischen Regressionsmodells an eine unabhängige Variable zur Beschreibung der Diagnostizierbarkeit des Karzinoms (maligne vs. benigne) anhand von prozentualen Ploidie-Veränderungen unterschiedlicher Chromosomen in Zellen, die durch „Bürsten“ gewonnen wurden. Angegeben ist das Ergebnis des *Likelihood Ratio Tests* (Chi^2) sowie das Signifikanzniveau, der prozentuale Anteil der erklärten Varianz (R^2) und die Anzahl der untersuchten Fälle (N).

Sonde	Prediktor	Chi^2	R^2	N
Centromer, Chromosom 7	nicht-diploide Zellen (%)	4,0*	26,1	11
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	triploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	tetraploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	polyploide Zellen (%)	n.s.	-	11
Centromer, Chromosom 8	nicht-diploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	triploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	tetraploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	polyploide Zellen (%)	n.s.	-	11
Centromer, Chromosom 17	nicht-diploide Zellen (%)	4,4*	29,1	11
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	triploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	tetraploide Zellen (%)	zu wenig Befunde		11
	polyploide Zellen (%)	n.s.	-	11
Centromer, Chromosom 20	nicht-diploide Zellen (%)	5,8*	38,0	11
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	triploide Zellen (%)	4,9*	31,0	11
	tetraploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	polyploide Zellen (%)	n.s.	-	11

n.s. $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Tabelle 19. Ergebnisse der Anpassung eines logistischen Regressionsmodells an eine unabhängige Variable zur Beschreibung der Diagnostizierbarkeit des Karzinoms (maligne vs. benigne) anhand von prozentualen Ploidie-Veränderungen unterschiedlicher Gen-Loci in Zellen, die durch „Bürsten“ gewonnen wurden. Angegeben ist das Ergebnis des *Likelihood Ratio Tests* (Chi^2) sowie das Signifikanzniveau, der prozentuale Anteil der erklärten Varianz (R^2) und die Anzahl der untersuchten Fälle (N).

Sonde	Prediktor	Chi^2	R^2	N
<i>EGFR</i> -Locus, Chromosom 7	nicht-diploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	triploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	tetraploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	polyploide Zellen (%)	4,4*	28,7	11
<i>MYC</i> -Locus, Chromosom 8	nicht-diploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	triploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	tetraploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	polyploide Zellen (%)	n.s.	-	11
<i>Her2</i> -Locus, Chromosom 17	nicht-diploide Zellen (%)	6,2*	40,8	11
	haploide Zellen (%)	4,9*	32,4	11
	triploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	tetraploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	polyploide Zellen (%)	n.s.	-	11
<i>AIB1</i> -Locus, Chromosom 20	nicht-diploide Zellen (%)	4,3*	28,6	11
	haploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	triploide Zellen (%)	5,1*	33,4	11
	tetraploide Zellen (%)	n.s.	-	11
	polyploide Zellen (%)	n.s.	-	11

n.s. $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.3.3 Messung des DNA-Gehaltes mittels Image-Cytometrie

Zur Qualitätskontrolle für die durchgeführten Ploidieanalysen wurde in einem Referenz-Labor (Prof. Dr. med. G. Auer am Karolinska Institut, Stockholm, Schweden) Messungen mittels Image-Cytometrie an ausgewählten Fällen durchgeführt [Haroske et al., 1998]. Mit Hilfe einer Feulgen-Färbung [Schulte u. Wittekind, 1989] wurde unter Einsatz von digitaler Bildanalyse eine Messung des Gesamt-Chromatingehalts der Zellkerne durchgeführt und so der Ploidiestatus der Proben ermittelt (Abbildung 12).

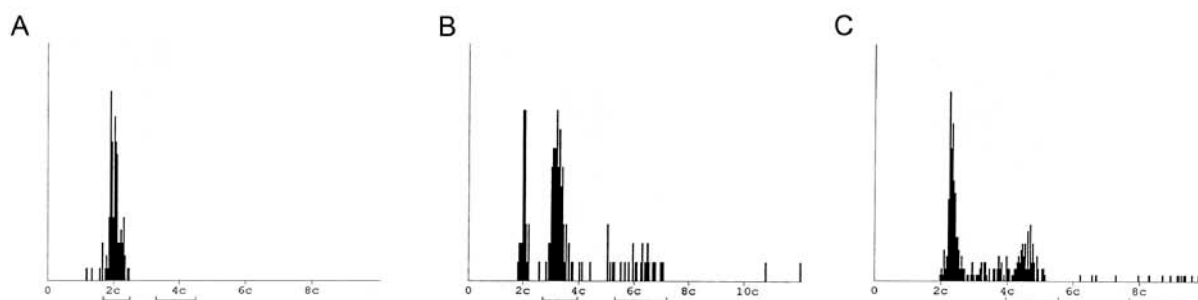


Abbildung 13. Repräsentative Beispiele für Histogramme der Ploidieanalysen mittels Image-Cytometrie. Die X-Achse zeigt das Maß der Ploidie ($2c$ = diploid) und die Y-Achse den prozentualen Anteil an Zellen. A: Diploider Fall (20). B: Aneuploider Fall (25). C: Aneuploide Pankreaskarzinom-Zelllinie (Capan1).

Tabelle 20. Vergleich der Ergebnisse der Image-Cytometrie (IC) und gemittelten mittleren Kopienzahl der Onkogen-Loci der untersuchten Fälle.

Fall	Typus	MWL	IC
Capan1	Karzinom ZL	4,12	4,6
18	benigne	2,01	2,0
20	benigne	2,00	2,0
25	maligne	3,85	3,2
B7	benigne	2,04	2,0
B8	maligne	2,23	3,8
B10	benigne	2,04	2,3
B11	maligne	2,01	2,0
B12	benigne	2,00	2,2

MWL: mittlere gemittelte Kopienzahl der Lous-spezifischen Sonden.

Die Ergebnisse der IC korrelieren mit den gemittelten Mittelwerten (MWL) der Ploidieveränderungen der untersuchten Gen-Loci (FISH). Die *Pearson Product Moment Correlation* ergab: $N=9$; $R^2=0,62$; $p=0,011$.

5 Diskussion

Das Pankreaskarzinom gehört mit ca. 6500 Neuerkrankungen pro Jahr zwar zu den selteneren bösartigen Erkrankungen, ist jedoch durch die damit verbundene sehr schlechte Prognose die vierthäufigste Todesursache durch Krebs in Deutschland [Robert-Koch-Institut, 2008]. Die geringe Überlebensrate des Pankreaskarzinoms ist hauptsächlich mit dem bereits fortgeschrittenen Tumorstadium der meisten Patienten (ca. 85%) zum Zeitpunkt der Diagnose verbunden [Goggins, 2007]. Daher ist die Verbesserung der Frühdiagnostik der wesentliche Faktor, um die Mortalität des Pankreaskarzinoms zu senken. Dies wird jedoch erheblich erschwert weil die Entwicklung des Pankreaskarzinoms zumeist bis zu einem späten Zeitpunkt nicht mit spezifischen Symptomen verbunden ist. Entsprechend können diese Patienten nicht frühzeitig einer geeigneten Diagnostik und Therapie zugeführt werden. Die Folge daraus ist, dass 80% dieser Patienten keine kurative Therapie in Form einer Tumoresektion erhalten können [Rosty u. Goggins, 2002; Goggins, 2007]. Da bereits Tumore mit weniger als einem Zentimeter Größe einen tödlichen Verlauf nehmen können [Ishikawa et al., 1999; Tsuchiya et al., 2001, Kimura, 2003], sollte die Frühdiagnostik im Idealfall bereits in der Erkennung von nicht-invasiven prä-neoplastischen Läsionen ansetzen. Der Nachweis von PanIN-Läsionen mit Hilfe von konventionellen bildgebenden Verfahren oder unter Verwendung molekularer Biomarker ist jedoch bisher nur unzureichend möglich [Takaori et al., 2004, Goggins, 2007]. Dabei liegt möglicherweise gerade im Nachweis von hochgradigen prä-kanzerösen PanIN-3-Läsionen das Potential, Patienten mit einer chronischen Pankreatitis frühzeitig vor dem Auftreten eines Karzinoms einem chirurgischen Eingriff zuzuführen. PanIN-3-Läsionen werden in weniger als 5% der Resektate mit chronischer Pankreatitis gefunden, diese Anzahl deckt sich überraschend gut mit der Anzahl an Patienten, die auf der Basis einer chronischen Pankreatitis ein Karzinom entwickeln [Lowenfels et al., 1993 u. 1997; Abraham et al., 2003; Andea et al., 2003].

5.1 Auftreten von molekular- und zytogenetischen Veränderungen in prä-neoplastischen Läsionen in Geweben mit chronischer Pankreatitis

In der vorliegenden Arbeit wurden prä-neoplastische Läsionen in resezierten Pankreata mit chronischer Pankreatitis zytogenetisch auf Veränderungen des Ploidiestatus einzelner ausgewählter Chromosomen mit Hilfe der FISH-Technik analysiert. Diese Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit dem Institut für Pathologie am Klinikum Kassel (Priv.-Doz. Dr. med. Ernst Heinmöller und Dr. rer. nat. Meike Werther). Die dort erhaltenen molekulargenetischen sowie immunhistochemischen Ergebnisse werden im Folgenden mit den eigenen Daten diskutiert. Dabei soll unter anderem anhand der für das Pankreaskarzinom typischen genetischen Veränderungen gezeigt werden, ob

genetische/zytogenetische Veränderungen in PanIN aus Geweben von chronischer Pankreatitis mit solchen, wie sie in Geweben mit Pankreaskarzinomen gefunden werden, identisch sind und somit als echte Vorläuferläsionen für das PDAC in Geweben chronischer Pankreatitis betrachtet werden können. Ziel der Untersuchungen war die molekular- und zytogenetische Aufklärung des Auftretens und der zeitlichen Abfolge von genetischen Aberrationen im Verlauf der neoplastischen Progression in der PanIN-Sequenz. In dieser Arbeit wurden azinär-duktales Metaplasien (ADM), auch azinäre Gangmetaplasien genannt, in die Untersuchungen mit eingeschlossen, da zum gegenwärtigen Zeitpunkt in der Literatur über das prä-neoplastische Potential dieser Metaplasien diskutiert wird [Stanger et al., 2005, Guerra et al. 2007, Esposito et al. 2007]. Dies sind kleine bis mittelweite, selten ektatische Gangstrukturen mit einer flachen zytologisch unauffälligen Epithelauskleidung, welche in der Regel von narbig umgebautem Pankreasgewebe ummauert werden. Hierbei handelt es sich am ehesten um regenerative Proliferate neuer Drüsen aus ehemaligen Azini auf dem Boden einer narbigen chronischen Obstruktion der vorgeschalteten Gangstrukturen. Die Ursprungszelle der duktales Metaplasie ist noch nicht eindeutig identifiziert. Am wahrscheinlichsten handelt es sich um Proliferate der so genannten zentroazinären Zellen, welche im Normalgewebe zwischen den Azinuszellen und den ersten duktales Zellen lokalisiert sind [Hezel et al., 2006; Heinmöller, 2006; Werther, 2007].

Aneuploidie in PanIN-Läsionen in Geweben mit chronischer Pankreatitis

Ein besonderes Merkmal der duktales Pankreaskarzinome ist die ausgeprägte chromosomale Instabilität, welche in Form von komplexen chromosomalen Abberationen, dem Zugewinn oder Verlust von chromosomalen Bereichen oder ganzer Chromosomen auftritt. Die Bedeutung dieser Veränderungen im Verlauf der Karzinogenese und speziell der Zeitpunkt des Auftretens wurde bisher nicht exakt untersucht. Einen Einfluss auf die Bildung einer chromosomalen Instabilität haben hauptsächlich Störungen der Centrosomen und der Telomere. Für das Pankreaskarzinom ist beides bereits beschrieben worden [Sato et al., 1999 u. 2001; van Heek et al., 2002; Zhu et al., 2005]. So konnte auch der Zusammenhang zwischen abnehmender Telomerlänge und der Akkumulation von chromosomalen Anomalien gezeigt werden [Gisselson et al., 2000 u. 2001]. Untersuchungen der Telomerlängen von prä-neoplastischen Läsionen im Pankreas zeigten bereits in 91% der frühesten Läsionen (PanIN-1A) kritisch verkürzte Telomere. Normale Epithelzellen aus gesundem Gewebe zeigten dagegen keine Telomerverkürzungen [van Heek et al., 2002]. Ob sich das Auftreten von Aneuploidien zu einem vergleichbar frühen Zeitpunkt detektieren lässt, war Gegenstand dieser Untersuchungen. Im Rahmen dieser Arbeit bot sich die Gelegenheit, zytogenetische Veränderungen unter Einsatz der Interphase-FISH-Technik über das gesamte Spektrum von PanIN-1- bis PanIN-3- sowie ADM-Läsionen in Geweben mit chronischer Pankreatitis zu

untersuchen. Zur Analyse der Aneuploidie wurden Centromersonden für die Chromosomen 3, 7, 8 und 17 ausgewählt. Diese Chromosomen sind im Pankreaskarzinom häufig im aneuploiden Status detektiert worden [Solinas-Toldo et al., 1996; Ghadimi et al., 1999; Mahlamaki et al., 2002; Harada et al., 2002 u. 2008].

In den analysierten PanIN- und ADM-Läsionen wurde für alle untersuchten Chromosomen ein gradueller Anstieg der Aneuploidierate korrespondierend zum PanIN-Grad festgestellt. Der prozentuale Anteil von Zellen mit nicht-diploiden Signalen in normalen Geweben ohne histologische Veränderungen lag zwischen 4,5 und 5,2%. Die Zunahme von nicht-diploiden Zellen korrelierte hoch signifikant mit dem Grad der histologischen Veränderung. In einer Studie von Postier und Kollegen [2003] wird über chemisch induzierte Pankreatitis bzw. Pankreaskarzinome in syrischen Hamstern berichtet. In den untersuchten prä-kanzerösen Läsionen in Geweben mit chronischer Pankreatitis der Versuchstiere fanden sich atypische duktale Zellen, die Aneuploidien im nahen diploiden Bereich aufwiesen. Polyploide Zellen wurden in den als „atypische Hyperplasien“ bezeichneten Läsionen nicht detektiert. Bisher publizierte Daten über Aneuploidien in Gängen ohne histologische Veränderungen in humanen Geweben mit chronischer Pankreatitis lagen zwischen 7% (Monosomien für Chromosom 18) und 39% (Zellen mit mehr als zwei Kopien von Chromosom 11) [Moskovitz et al., 2003]. Die Ursache für die unterschiedlichen Werte in dieser Studie zu den publizierten Daten könnte im methodischen Ansatz begründet sein. Während in dieser Arbeit histologisch gesicherte mikrodissezierte Läsionen aus Paraffin-eingebetteten Pankreata untersucht worden sind, waren in der Studie von Moskovitz und Kollegen Zellen nach einer Zellkulturpassage Gegenstand der Untersuchung. Außerdem fanden unterschiedliche chromosomale Sonden Anwendung. Eine weitere Studie zeigt die Untersuchung von PanIN-1-Läsionen aus Paraffin-eingebetteten Resektaten mit chronischer Pankreatitis ohne Karzinom [Soldini et al., 2003]. In dieser Studie wird über das Auftreten von Monosomien für die Chromosomen 6, 17 und 18 in jeweils 36%, 27% und 0% der untersuchten Fälle berichtet. Polysomien sind hingegen für keines der untersuchten Chromosomen gefunden worden. Das Vorliegen einer Monosomie war dabei als das Fehlen einer Chromosomenkopie in mindestens 30%, das Vorliegen einer Polysomie mit mehr als zwei Chromosomenkopien in mindestens 15% der untersuchten Zellen definiert. Nach dieser Definition zeigten sechs der von Soldini et al. untersuchten Fälle mit chronischer Pankreatitis keine chromosomalen Anomalien. Ein wesentlicher Unterschied zu der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchung lag auch hier im methodischen Ansatz: Zwar ist in beiden Studien Paraffin-eingebettetes Gewebe untersucht worden, aber in der vorliegenden Arbeit erfolgte die Isolation der Zellkerne aus 10 µm dicken Schnitten, wohingegen in der Studie von Soldini und Kollegen die FISH-Analysen an 4 µm dicken Schnitten durchgeführt wurden.

Eventuell kann eine zu geringe Schnittdicke der Präparate zu einem Anschneiden der Zellkerne führen und somit zu verfälschten Ergebnissen [Schlake et al., 2003]. Das in dieser und der Arbeit von Soldini und Kollegen gemeinsam untersuchte Chromosom 17 ist in dieser Arbeit in allen untersuchten Fällen (8/8) in den PanIN-1-Läsionen in $9,5 \pm 1,6\%$ der Zellen in haploider Form detektiert worden. Dagegen berichten Soldini und Kollegen über das Vorliegen von Monosomien in mehr als 30% der untersuchten Zellen in 3 von 11 der analysierten Fälle. Ein Vergleich der Ergebnisse ist somit nur schwer möglich. Übereinstimmend mit den hier aufgeführten Arbeiten ist das Fehlen von Polysomien. Ein weiteres übereinstimmendes Ergebnis aus allen drei Untersuchungen ist, dass Veränderungen in der Kopiezahl der Chromosomen bereits in normalem Epithel und in den frühesten prä-neoplastischen Läsionen messbar sind. Dies könnte darauf hindeuten, dass in frühen Stadien der prä-neoplastischen Progression keine komplexen chromosomalen Aberrationen auftreten und die Ursache für die Kopiezahl-Veränderungen eher in einfachen Mitosefehlern als im Vorliegen einer CIN auslösenden Mutation begründet sind. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die Frequenzen, mit denen Veränderungen auftraten, für alle Chromosomen in etwa gleich hoch waren. Der post-hoc Test zeigte lediglich einen Trend für das Vorliegen von im Durchschnitt häufigeren Monosomien als Trisomien für Chromosom 17. Im Gegensatz dazu sind im Durchschnitt höhere Anteile von trisomen Zellen für Chromosom 3 detektiert worden. Ob dies jedoch auf einer Selektion im Sinne eines Vorteils für die betroffene Zelle (z.B. durch den Verlust eines *p53*-Allels auf 17p oder dem Zugewinn einer *MUC4*-Kopie auf 3q) begründet ist, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die zytogenetischen Untersuchungen in den duktalem Metaplasien ergaben Frequenzen für das Auftreten von Ploidie-Veränderungen die zwischen denen von PanIN-1- und PanIN-2-Läsionen lagen. Damit ist die ADM-Läsion mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls als Veränderung mit neoplastischem Potential einzustufen, möglicherweise auch die diesbezüglich histomorphologisch erste erkennbare Veränderung im Gewebe. Die in dieser Arbeit untersuchten PanIN-3- und ADM-Läsionen entstammten alle einem Resektat (CP10), so dass die Veränderungen in diesen histologischen Stufen weitere Analysen an einer ausgedehnten Fallzahl für die Validierung der Ergebnisse benötigen. Allerdings ist festzuhalten, dass die in CP10 gefundenen Veränderungen in PanIN-1 und PanIN-2 mit denen der anderen sieben in dieser Arbeit untersuchten Resektate übereinstimmend waren.

Molekulare Analysen von Pankreaskarzinom-Signatur-Genen

Gegenwärtig ist über die Präsenz von Mutationen der Tumor-Suppressor-Gene *p16*, *p53* und *DPC4* in Geweben mit chronischer Pankreatitis nur wenig bekannt, wobei insbesondere hier die molekulare Untersuchung von PanINs fast vollständig fehlt [Heinmöller, 2006]. Eine gleichzeitige molekulargenetische Untersuchung aller drei Pankreaskarzinom-Signatur-Gene

in Geweben chronischer Pankreatitis lag bislang nicht vor. Im Rahmen des Kooperationsprojektes mit dem Institut für Pathologie am Klinikum Kassel wurden die ersten Ergebnisse molekulargenetischer Studien von Laser-mikrodissezierten PanINs aus Geweben chronischer Pankreatitis von 21 Patienten generiert. Hierbei sind sowohl LOH-Analysen der Gene *p53*, *p16* und *DPC4* als auch partiell Sequenzanalysen der Gene *p53* und *p16* durchgeführt worden. Ergänzt wurden diese Untersuchungen durch immunhistochemische Expressionsanalysen der Proteine p16, p53 und DPC4. Hierbei sollte untersucht werden, ob es bereits in Geweben mit chronischer Pankreatitis zu Mutationen dieser Gene kommt.

Mutationen in allen drei TSG sind sowohl in PanINs als auch in ADM detektiert worden, allerdings in geringer Anzahl. Eine Ausnahme hiervon bildeten PanIN-3-Läsionen. PanIN-1-Läsionen zeigten zusammen mit ADM eine LOH-Rate zwischen 2,1% (*p53*-LOH) und 5,8% (*p16*-LOH), wobei hier kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit einzelner Genveränderungen zu erkennen war. Allerdings zeigt sich ein Trend für ein häufigeres LOH-Ereignis am *p16*-Genlocus. Analog zu Daten beim Pankreaskarzinom zeigen auch die in dieser Arbeit präsentierten Daten eine Steigerung der LOH-Ereignisse im Übergang zu PanIN-2 und auch zum Übergang zum PanIN-3-Stadium. Hier findet sich eine signifikante Anhäufung der LOH-Ereignisse aller drei untersuchten Genloci, so dass auch die PanINs in chronischer Pankreatitis als echte Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms angenommen werden müssen. Dies gilt insbesondere für die höhergradigen PanINs (PanIN-2 und PanIN-3) [Heinmöller, 2006].

In den immunhistochemischen Expressionsanalysen in ADM- und PanIN-1-Läsionen war kein Ausfall von p16, p53 oder DPC4 vorhanden. Auch in PanIN-2-Läsionen wurde kein Ausfall des p53-Proteins und des DPC4-Proteins gemessen, allerdings hatte das p16-Protein bereits in 20% der Gänge eine reduzierte Expression, was auf eine Genalteration hindeutet. Hervorzuheben ist, dass in ADM-Läsionen eine ähnlich hohe Anzahl von Veränderungen aller drei TSG wie in PanINs gefunden wurde, so dass diese Gangläsionen für das molekulargenetische Progressionsmodell eine gleichartige Wertigkeit wie insbesondere PanIN-1-Läsionen erhalten sollten [Heinmöller, 2006].

Die im Rahmen des Kooperationsprojektes gefundenen Mutationsraten der Gene *p16* und *p53* in den Geweben chronischer Pankreatitis decken sich nur teilweise mit den bisher publizierten Daten. Allerdings wurden in bisher durchgeführten Studien keine LOH-Analysen durchgeführt und/oder PanIN-Läsionen nur unzureichend klassifiziert, weshalb die Daten dieser Arbeit mit andernorts erhobenen Daten nur eingeschränkt vergleichbar sind. Das *p53*-

Gen wurde bisher in nur wenigen Studien untersucht. Mittels Immunhistochemie konnte kein Genausfall von *p53* bestätigt werden [Lüttges et al., 2000]. Allerdings korreliert die Immunhistochemie nur eingeschränkt mit dem Mutationsstatus, insbesondere in chronischer Pankreatitis, wo z.B. eine positive P53-Protein-Immunhistochemie als Folge der Entzündung häufig bei wild-typ *p53* auftritt [Heinmöller, 2006]. Heterozygote Mutationen, die ein erhöhtes Risiko für den Ausfall des zweiten wild-typ-Allels darstellen, werden durch diese Technik nicht erfasst. In einer Studie, bei der molekulare Untersuchungen zum Status des *p53* Gens bei chronischer Pankreatitis durchgeführt wurden, konnten *p53*-Mutationen bei 10% der Patienten gefunden werden [Gansauge et al., 1998]. Allerdings ist in dieser Studie keine Mikrodissektion der entsprechenden Gangläsionen durchgeführt worden und es wurde keine histomorphologische Einstufung vorgenommen, so dass diese Daten nur sehr unvollständig und wenig hilfreich für eine genaue Zuordnung von Morphologie und molekularer Diagnostik sind. Das *p16*-Gen ist bisher nur in wenigen Serien von Fällen mit chronischer Pankreatitis untersucht worden. Immunhistochemische Analysen fanden einen Expressionsverlust in 40% der untersuchten PanIN-1A [Gerdes et al., 2001]. Sequenzänderungen der DNA wurden nicht gefunden. Leider wurde in dieser Studie keine LOH-Diagnostik durchgeführt, so ist letztendlich der genaue molekulare Inaktivierungsmechanismus des *p16*-Gens unerforscht geblieben. In einer Studie mit Geweben von 122 Patienten mit chronischer Pankreatitis fanden Rosty und Kollegen [2003] einen graduellen Anstieg des *p16*-Expressionsverlustes mit steigendem Grad der PanIN-Läsionen (0%, 11%, 16%, und 40% für PanIN-1A, -1B, -2, und -3), wobei diese Daten den in vorliegender Arbeit gefundenen Daten am nächsten kommen. Für das *DPC4*-Gen liegen gegenwärtig nur vereinzelte Berichte zu Untersuchungen in Geweben chronischer Pankreatitis vor, diese basieren sämtlich auf immunhistochemischen Untersuchungen auf der Grundlage der Arbeiten von Wilentz et al. [2000b], worin gezeigt wird, wie ein Verlust der *DPC4*-Färbung in der Immunhistochemie eine Inaktivierung des Gens auf molekularer Ebene verlässlich widerspiegelt. Allerdings gibt die immunhistochemische Expressionsanalyse analog zu der Untersuchung des *p53*-Proteins keine Auskunft über eine möglicherweise bereits vorliegende heterozygote Mutation in PanIN-1 oder PanIN-2. Tang und Kollegen [2002] fanden keine *DPC4*-Inaktivierung in 6 Geweben. McCarthy und Kollegen [2001] fanden in 2 Patienten mit chronischer Pankreatitis PanIN-3-Läsionen, in denen bei einem Patienten ein Expressionsverlust des *DPC4*-Proteins messbar war. PanIN-1- und PanIN-2-Läsionen zeigten keinen Expressionsverlust. Kein Verlust der *DPC4*-Proteinexpression konnte in der oben erwähnten Studie von Rosty et al. [2003] in Läsionen PanIN-1A bis PanIN-3 detektiert werden. Unterschiedliche methodische Ansätze sind möglicherweise auch für die diskrepanten Ergebnisse verantwortlich. Insbesondere die immunhistochemische Beurteilung der Expression des *p16*-Proteins ist problematisch [Heinmöller, 2006]. In PanIN-1-Läsionen findet sich gewöhnlich eine nur

geringe Expression des p16-Proteins (etwa 1% der Epithelien) zusammen mit einer häufig geringen Zahl von Epithelien. In der Regel handelt es sich um kleine Gangläsionen. Hierdurch besteht die Gefahr, dass es zur falsch positiven Diagnose eines Verlusts der p16-Proteinexpression kommt. Welche der bisher publizierten Daten am ehesten der in vivo Situation bei chronischer Pankreatitis entsprechen, muss durch weitere Studien geklärt werden, hier insbesondere unter Berücksichtigung einer Sequenzanalyse einzelner Gene, welche eine Erfassung heterozygoter Genausfälle gestattet. Generell lässt sich festhalten, dass sich ähnlich wie in duktalem Pankreaskarzinomen assoziierten PanINs auch in chronischer Pankreatitis ein LOH einzelner Gene vor dem immunhistochemisch detektierten Ausfall des jeweiligen Proteins findet [Lüttges et al., 2001]. Die molekulargenetischen Untersuchungen der PanINs des Studienpatienten CP10 belegten die Präsenz heterozygoter als auch homozygoter Mutationen sowohl im *p16*-Gen als auch im *p53*-Gen. Heterozygote Mutationen im *p16*-Gen fanden sich nur in einer PanIN (PanIN-2), allerdings fand sich die doppelte Anzahl von in der Sequenzanalyse detektierten Mutationen im Vergleich zu LOH in ADM, PanIN-1A und PanIN-1B. Mutationen in heterozygoter Form fanden sich sowohl im *p53*-Gen bereits in den frühesten PanIN-Läsionen als auch in ADM, wohingegen in höhergradigen PanIN die Mutationen zumeist in homozygoter Form vorlagen, begleitet von LOH und Proteinexpressionsverlust in der immunhistochemischen Untersuchung sowie einer Akkumulation von multiplen Mutationen in PanIN-2- und PanIN-3-Läsionen. Dies deutet auf eine klonale Expansion dieser Mutationen im Gangsystem des Pankreasgewebes hin. Auch in den vorliegenden Untersuchungen am Gewebe des Studienpatienten CP10 fand sich analog zu den Daten von Lüttges und Kollegen [2001] LOH-Ereignisse im *p16*-Gen und im *p53*-Gen bereits vor der immunhistochemisch detektierten vollständigen Geninaktivierung, welche im *p16*-Gen im Stadium PanIN-2 und im *p53*-Gen im Stadium PanIN-3 erfolgte. Während die heterozygoten Mutationen im *p53*-Gen in ADM- und PanIN-1A-Läsionen ohne Nachweis eines LOH in diesen Läsionen klar für die Hypothese spricht, dass es zuerst zu einer Basenmutation in einem Allel kommt, gefolgt von einer Geninaktivierung durch LOH des zweiten Allels, ist die Situation am *p16*-Genlokus weniger klar. Hier sind sowohl homozygote Genmutationen als auch LOHs in PanIN-1A, PanIN-1B und ADM nachweisbar, wobei die Sequenzänderungen in der Überzahl sind. Dies liegt möglicherweise an der Sensitivität der einzelnen Analysetechniken. Während für die Detektion eines LOH mindestens 50% der untersuchten Zellpopulation einen Allelverlust aufweisen müssen, sind in der Sequenzanalyse bereits Mutationen in 10% der Zellpopulation detektierbar, wobei heterozygote und homozygote Mutationen dokumentiert werden können. Allerdings detektiert die Sequenzanalyse nicht den LOH eines der beiden Allele im Falle einer fehlenden Genmutation auf beiden Allelen. Somit überschneiden sich beide Analysetechniken, ergänzen einander jedoch nicht vollständig. Es ist nicht ausgeschlossen dass im Falle der

detektierten heterozygoten Mutationen im *p53*-Gen bereits in einem Teil der Zellen ein LOH vorgelegen hat, welches durch die Mikrosatellitenanalyse jedoch nicht bestätigt wird. Dass heterogene Zellpopulationen in einzelnen PanINs vorliegen zeigt die immunhistochemische Expressionsanalyse der Gene *p53* und *p16* in dieser Arbeit. Allerdings hätte man in den PanIN-1A, PanIN-1B und ADM einen Proteinausfall in zumindest einem Teil der Gängepithelien detektieren müssen bei biallelischer Inaktivierung der Gene, dies war aber nicht der Fall [Heinmöller, 2006].

Bedeutung der chronischen Pankreatitis für die Karzinogenese

Die Beantwortung der Frage nach den molekularen Ereignissen im Verlauf der Karzinogenese des duktales Pankreaskarzinoms ist von fundamentaler Bedeutung für das Verständnis der Biologie dieses aggressiven Tumors sowie für die generellen Mechanismen der Karzinogenese. Ferner sind diese Erkenntnisse hilfreich für die Entwicklung von Früherkennungsstrategien. Die Assoziation zwischen dem langjährigen Bestehen einer chronischen Pankreatitis und der Entstehung eines Pankreaskarzinoms wird seit über 50 Jahren diskutiert [Comfort und Steinberg, 1954]. In der nachfolgenden Zeit haben große epidemiologische Studien das Bestehen einer chronischen Pankreatitis als signifikanten Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms belegt, wobei das Risiko nach 10 Jahren etwa 1,8% beträgt und sich nach 20 Jahren auf etwa 4% steigert, unabhängig vom jeweiligen Typ der chronischen Pankreatitis [Lowenfels et al., 1993 u. 1997]. Auch wenn PanINs am häufigsten in Geweben mit duktalem Pankreaskarzinom vorkommen, werden PanINs auch in Geweben ohne Pankreaskarzinom gefunden, einschließlich akuter und chronischer Pankreatitis. PanIN-1- und ADM-Läsionen repräsentieren das überwiegende Spektrum der Gangläsionen in chronischer Pankreatitis. PanIN-2-Läsionen und PanIN-3-Läsionen sind weitaus seltener im Vergleich zu Geweben mit bereits manifestem duktalem Pankreaskarzinom und sind in dieser Arbeit in sehr ähnlicher Anzahl im Vergleich zu bisher publizierten Daten zu finden [Abraham et al., 2003; Andea et al., 2003]. Die Häufigkeit der PanIN-3-Läsionen von unter 5% in Geweben mit chronischer Pankreatitis deckt sich mit dem Progressionsrisiko für ein Karzinom auf dem Boden einer chronischen Pankreatitis und spiegelt möglicherweise den Schweregrad bzw. die Dauer des Vorliegens der chronischen Entzündung wieder [Andea et al., 2003]. Dass Patienten mit chronischer Pankreatitis und nachgewiesenen PanIN-3-Läsionen ein stark erhöhtes Risiko einer Progression zu einem invasiven Karzinom besitzen ist bisher mehrfach an Hand von Fallberichten dokumentiert worden [Takaori et al., 1998 u. 2003; Brat et al., 1998; Brockie et al., 1998]. Als hypothetischer pathogener Mechanismus, der über ein langjähriges Bestehen der chronischen Pankreatitis zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms führt, wird eine chronische zelluläre Dysfunktion, Entzündung und ein gesteigerter Zellumsatz bei erhöhter

Proliferationsrate diskutiert [Bardeesy und DePinho 2002]. Möglicherweise liegt hier der Schlüssel zum Verständnis der Karzinogenese. Ein erhöhter Zellumsatz kann mit einem beschleunigten Alterungsprozess des betroffenen Gewebes gleichgesetzt werden. Die Daten über Telomerverkürzungen in Pankreata mit chronischer Pankreatitis und in normalen Pankreata zeigen dies [van Heek et al., 2002; Ishii et al., 2006]. Die Verkürzung der Telomere in frühen Stufen der prä-neoplastischen Veränderungen könnte einen wesentlichen Beitrag in der Destabilisierung des Genoms leisten. So existieren Beweise dafür, dass Anaphase-Brücken-Bildungen und -Brüche häufiger in Tumoren mit unspezifischen chromosomalen Abberationen und einer ausgeprägten intratumoralen Heterogenität zu finden sind. Dies lässt vermuten, dass die Kombination von mitotisch instabilen Chromosomen und einer erhöhten Toleranz gegenüber chromosomalen Schäden zu einer fortschreitenden genomischen Umstrukturierung in vielen Karzinomen führt und damit ein flexibles genetisches System für die klonale Evolution und Progression darstellt [Gisselsson et al., 2000]. Duesberg [2005] stellte die Hypothese auf, dass die Karzinogenese durch sporadisch auftretende Aneuploidien ausgelöst wird. In der Folge würde, durch eine unbalancierte Expression einer Vielzahl von Proteinen, die in die Teilung, Synthese und Reparatur von Chromosomen involviert sind, eine Destabilisierung der Zahl und Struktur von Chromosomen erfolgen. Dies würde eine Art Kettenreaktion von chromosomalen Variationen auslösen, welche im klassischen darwinistischen Sinn zur Selektion einer neuen „Zellspezies“ mit neoplastischem Pheno- und Karyotyp führen würde. Es zeigte sich außerdem, dass das Auftreten von PanIN in Geweben mit chronischer Pankreatitis signifikant abhängig vom Alter ist (57 ± 14 Jahre mit PanIN vs. 51 ± 15 Jahre ohne PanIN) [Rosty et al., 2003]. Eine Analyse von Fibroblasten aus unterschiedlichen Altersgruppen ergab Expressionsunterschiede in Genen die den Zellzyklus und die Proliferation kontrollieren. Dabei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten altersbedingter Aneuploidien und dem Expressionsniveau von Genen die in Centromer- und Kinetochorfunktion sowie Aufbau der Mikrotubuli und des Spindelapparates involviert sind [Geigl et al., 2004]. So haben beispielsweise die überwiegende Mehrzahl von prä-karzinösen Läsionen von Prostata-, Uterus- und Brustkarzinomen Centrosomendefekte. In den hochgradigen Läsionen treten Centrosomendefekte, Fehler im Spindelapparat und chromosomale Instabilität zusammen auf [Pihan et al., 2003]. Da die Mehrzahl dieser prä-invasiven Läsionen keine *p53*-Mutationen tragen, scheint die Entwicklung von Centrosomendefekten nicht vom Verlust der *p53*-Funktion abhängig zu sein. Dies zeigt, dass Centrosomenanomalien zusammen mit chromosomaler Instabilität und zytologischen Veränderungen in den frühesten identifizierten Stufen der Krebsentwicklung auftreten. Zusammen mit fortschreitenden strukturellen chromosomalen Veränderungen könnte dies

den Zugewinn von Allelen mit (proto-) Onkogenen und den Verlust von Allelen mit wild-typ TSG verursachen und damit die Karzinogenese beschleunigen [Pihan et al., 2003].

Wie lassen sich die hier gefundenen Veränderungen in den prä-neoplastischen Läsionen bei chronischer Pankreatitis nun in ihrer biologischen Konsequenz einordnen? Aneuploidien und Mutationen in TSG finden sich bereits in den frühesten histomorphologisch fassbaren Gangläsionen. Auf der Basis der hier dargestellten Ergebnisse kann spekuliert werden, dass im Verlauf der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms Mutationen und Aneuploidien zu einem frühen Zeitpunkt, ausgelöst durch exogene Noxen, sporadisch und fast zeitgleich auftreten. Möglicherweise könnte eine milde Aneuploidie von nur wenigen Chromosomen, die durch die Teilung einer zuvor diploiden Zelle entstanden ist, von einer Mutation in einem TSG begleitet werden. Vorausgesetzt, dass weder die Aneuploidie noch die Mutation lethal für die Zelle sind und keine Apoptose induziert wird, würde sich daraus eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die klonale Expansion dieser Zelle ergeben [Michor et al., 2004]. Vermutlich wird der Prozess der Karzinogenese jedoch durch ein komplexeres Muster von Ereignissen ausgelöst und ist nicht auf die einfache Frage reduzierbar, ob zuerst eine Mutation oder eine Aneuploidie auftritt. In dieser Arbeit fanden sich häufiger Monosomien als Trisomien für Chromosom 17 in PanIN-1- und PanIN-2-Läsionen. In Kombination mit einer Mutation von *p53* im verbliebenen haploiden Chromosom könnte dies zu einer vollständigen Inaktivierung führen. Zellen mit einer Monosomie 17 würden demnach einen deutlichen evolutionären Vorteil besitzen. Im direkten Vergleich der FISH-Daten zeigte sich ein häufigeres Vorliegen einer Monosomie für Chromosom 17, als die in der LOH-Analyse gefundenen *p53*-Allelverluste. Während für die Detektion eines LOH mittels Mikrosatelliten-PCR mindestens 50% der untersuchten Zellen einen Allelverlust aufweisen müssen, kann die FISH-Technik einen chromosomalen Verlust in einer einzelnen Zelle nachweisen. Dies bedeutet, dass die Monosomien von Chromosom 17, welche in PanIN-1- und PanIN-2-Läsionen nach FISH-Analyse bei ca. 10% lagen, den Verlust eines Chromosoms in jeder zehnten untersuchten Zelle widerspiegeln. Im Gegensatz zeigte die LOH-Analyse einen Allelverlust von *p53* in nur 2% (PanIN-1) bzw. 12% (PanIN-2) der untersuchten Läsionen. Häufig erfolgt die Inaktivierung von *p53* erst kurz vor der Transition vom präinvasiven zum invasiven Tumorwachstum [Heinmöller, 2006]. Erst zum Zeitpunkt der fortgeschrittenen Erosion der Telomere nach multiplen Zellteilungen, welche ein potentes Signal zur Initiierung des *p53*-modulierten Zellteilungsstops aussenden, wird eine Inaktivierung des *p53*-Gens oder assoziierter Gene im *p53*-Signaltransduktionsweg zur weiteren klonalen Expansion der Zellen unerlässlich. Somit wäre die alleinige Existenz von heterozygoten *p53*-Mutationen in normalen Geweben im Sinne eines Mutation Load für die einzelne Zelle nicht von großem Risiko für eine neoplastische Transformation. Dieses Szenario würde sich allerdings in dem

Moment ändern, wenn z.B. weitere Mutationen in dieser Zelle auftreten oder es zu einer Aneuploidie in der bis dahin normalen Zelle kommt [Heinmöller, 2006]. Alterationen im *p16*-Gen und im *p53*-Gen lassen sich bereits in den ersten histomorphologisch fassbaren Gangveränderungen nachweisen, wobei dem *p16*-Gen eine treibende Kraft im weiteren Prozess der Karzinogenese zugeschrieben werden kann. *P53*-Mutationen werden erst zu einem späteren Zeitpunkt für die Expansion einzelner Zellklone relevant, worauf die erst spätere biallelische Inaktivierung schließen lässt. Eine ähnliche Funktion erscheint dem *DPC4*-Gen zuzukommen, die Inaktivierung erfolgt hier erst spät im Karzinogeneseprozess im Stadium eines *Carzinoma in situ* (PanIN-3).

Es ist festzuhalten, dass die molekulargenetischen Analysen Belege dafür gaben, dass die PanIN-Läsionen aus Geweben mit chronischer Pankreatitis denen aus Geweben mit einem Karzinom gleichzusetzen sind. Veränderungen des Ploidiestatus einzelner Chromosomen konnten bereits in den frühesten histologisch veränderten Gängen in Pankreasgeweben detektiert werden. Hervorzuheben ist, dass in ADM-Läsionen eine ähnlich hohe Anzahl von molekular- und zytogenetischen Veränderungen im Vergleich zu PanINs (1B bis 2) gefunden wurde, so dass diese Gangläsionen für das molekulargenetische Progressionsmodell als möglicherweise früheste erfassbare histomorphologische Veränderung mit neoplastischem Potential eine Beachtung erhalten sollten [Heinmöller, 2006]. Zusammengefasst kann in der vorliegenden Arbeit gefolgert werden, dass sich Veränderungen in der Anzahl der Kopien einzelner Chromosomen, sowie Basenmutationen in den frühesten Gangläsionen finden und möglicherweise klonal expandiert werden, zusammen oder häufiger gefolgt von LOH mit nachfolgender Geninaktivierung. Die diffuse und variable Verteilung der Genmutationen vor allem im *p16*-Gen in dieser Arbeit und in den Arbeiten anderer Autoren [Moskaluk et al., 1997] lässt einen mutagenen Feldeffekt vermuten, in welchem endogene (z.B. Pankreasenzyme, oxidativer Stress) und/oder exogene (z.B. Nikotin, Alkohol) Noxen auf verschiedene Gänge während einer langen Zeit einwirken [Heinmöller, 2006]. Eine weitere Unterstützung dieser Hypothese erfolgt aus dem Spektrum der in dieser Arbeit und in anderen Arbeiten gezeigten Mutationen im Pankreasgewebe, insbesondere G>A Transitionen. Diese Mutationen treten besonders häufig unter dem Einfluss von Nitrosaminen oder alkylierenden Agentien auf. Personen mit Defekten in der Reparatur von DNA-Alkylierungsprodukten besitzen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms [Li, 2001; Li et al., 2002].

Die erhaltenen Daten liefern Anhaltspunkte, dass die in Geweben mit chronischer Pankreatitis auftretenden prä-neoplastischen Läsionen eine Progression durchmachen, in der sich sporadische Defekte wie Basenmutationen und Mitosefehler (Aneuploidien)

akkumulieren. Besonders das gehäufte Auftreten dieser Aberrationen in PanIN-2- und PanIN-3-Läsionen gibt Grund zu der Annahme, dass Patienten mit einer hochgradigen Veränderung ein hohes Risiko tragen ein Karzinom zu entwickeln. Ausgehend von diesen Daten wäre es von großem Wert, einen verlässlichen, einfachen und möglichst nicht invasiven Screening-Test zur Überwachung dieser Patientenpopulation zu besitzen. Dies ist bisher nicht der Fall [Goggins, 2007].

5.2 Entwicklung von Biomarkern zur Detektion von malignen Zellen im Pankreassekret

Auf Basis der im ersten Teil erhaltenen zytogenetischen Daten sollte ein Set von FISH-Sonden hergestellt und für den diagnostischen Einsatz etabliert werden. Das Ziel war die Erzeugung eines Sets von FISH-basierten Biomarkern für den Einsatz an endoskopisch gewonnenen zytologischen Präparaten aus dem Pankreas. Hierbei sollte die Zuverlässigkeit der selbst generierten Sonden und Ihre Verwendbarkeit im klinischen Umfeld für die Frühdiagnostik des Pankreaskarzinoms bzw. die Risikoabschätzung von Patienten mit chronischer Pankreatitis überprüft werden

In einem ersten Schritt wurden Sonden aus α -Satelliten-DNA spezifisch für die Centromer-Regionen der Chromosomen 4, 7, 8, 9, 12, 17, 18 und 20 erzeugt. Diese Chromosomen waren in GCH-Analysen an Pankreaskarzinomen am häufigsten von Aberrationen betroffen. Die Funktionstüchtigkeit der selbst generierten Sonden wurde zunächst an Leukozyten-Metaphase-Präparationen getestet. Für alle Sonden konnte die korrekte Lokalisation sowie das Ausbleiben von Kreuzhybridisierungen gezeigt werden. Der prozentuale Anteil von Zellen mit einem diploiden Muster lag bei durchschnittlich $97,5 \pm 1,1\%$. Die zuverlässige Bindung der Sonden konnte damit bestätigt werden.

Unter Einsatz der Centromersonden konnten in den neun untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien Ploidieveränderungen nachgewiesen werden. Die dabei aufgetretenen hohen Standardabweichungen zeigten für alle Zelllinien neben einer heterogenen Verteilung der Kopiezahlen der untersuchten Chromosomen eine ausgeprägte Aneuploidie. Diese Beobachtung deckte sich mit CGH und FISH Untersuchungen an Pankreaskarzinom-Zelllinien [Verdoodt et al., 1997; Ghadimi et al., 1999; Sato et al., 2001; Mahlamäki et al., 2004; Gysin et al., 2005]. Geringfügige Abweichungen zu den publizierten Daten in einzelnen Zelllinien waren vermutlich durch die Zahl der Zellkulturpassagen der chromosomal instabilen Zelllinien bedingt.

Entwicklung von Locus-spezifischen Sonden

Im nächsten Schritt wurden Sonden aus BAC- bzw. PAC-DNA spezifisch für die Loci der Gene *EGFR* (7p12), *cMYC* (8q24.3), *Her2* (17q21.1) und *AIB1* (20q12) erzeugt. Die Funktionstüchtigkeit der selbst generierten Sonden wurde an Leukozyten-Metaphase-Präparationen getestet. Für alle Sonden konnte die korrekte Lokalisation sowie das Ausbleiben von Kreuzhybridisierungen gezeigt werden. Der prozentuale Anteil von Zellen mit einem diploiden Muster lag zwischen 97 und 98%. Die zuverlässige Bindung der Sonden konnte damit bestätigt werden.

Der Einsatz von Locus-spezifischen Sonden zeigte in den fünf untersuchten Zelllinien SU.86.86, MiaPaCa-2, Capan-1, Capan-2, und Panc1 Zugewinne an Gen-Kopien, die in der Mehrzahl durch einen Zugewinn des vollständigen Chromosoms und nicht durch die Amplifikation der Loci bedingt war. Die Steigerung der Kopiezahlen von *cMYC* in der Zelllinie Capan-1 und von *Her2* in den Zelllinien Capan-1 und Capan-2 war übereinstimmend mit bereits publizierten Daten [Mahlamäki et al., 2004]. Die in dieser Arbeit gefundene Amplifikation von *AIB1* in der Zelllinie SU.86.86 wurde in der Untersuchung von Mahlamäki und Kollegen [2004] nicht gefunden. Die bisher publizierten Daten über Amplifikationen von *AIB1* sind sehr unterschiedlich und widersprechen sich teilweise. So hat Ghadimi et al., [1999] über eine hochgradige Amplifikation dieses Gens in einer Vielzahl der Zelllinien berichtet, welche von Mahlamäki und Kollegen [2004] und den Ergebnissen dieser Arbeit nicht bestätigt wurden. Die Daten der vorliegenden Arbeit sind mit den publizierten Daten von Mahlamäki et al., [2004] größtenteils übereinstimmend.

5.3 Ploidieveränderungen in Zellen aus Pankreassekreten

In der Fortführung wurden die hergestellten FISH-Sonden auf ihre Tauglichkeit in der Früherkennung des Pankreaskarzinoms im klinischen Kontext überprüft.

Zur Untersuchung standen Proben aus zwei Patienten-Kollektiven zu Verfügung, welche durch Aspiration (Kollektiv 1) und unter Einsatz einer Zytologiebürste (Kollektiv 2) während der ERCP gewonnen wurden. Es sollte untersucht werden welchen Einfluss methodische Unterschiede in der Probengewinnung auf die FISH-Analyse haben.

Tauglichkeit der Sonden für die Diagnose einer Malignen Veränderung

Die Differenzierbarkeit zwischen malignen und benignen Erkrankungen wurde für beide Kollektive unter der Verwendung zweier unterschiedlicher Auswertungsmethoden untersucht:

- 1) die Kopiezahl-Veränderungen der Chromosomen 7, 8, 17 und 20 sowie
- 2) die Kopiezahl-Veränderungen der Loci der Onkogene *EGFR*, *cMYC*, *Her2* und *AIB1*.

Kollektiv 1

Die Analyse der Kopiezahl-Veränderungen der Chromosomen durch die Hybridisierung von Centromersonden ergab im Mittel niedrigere Anteile von diploiden Zellen in den Proben der Patienten mit einem Karzinom. Dabei zeigte sich jedoch ein breites Spektrum der Kopiezahl-Veränderungen (Bereich 11-95% diploide Signale). In den Proben der Patienten ohne nachgewiesenes Karzinom fanden sich im Mittel 89-94% diploide Zellen (Bereich 81-99%). Die relativ hohe Zahl von Zellen mit Ploidie-Veränderungen in der Patientengruppe mit benignen Erkrankungen könnte auf das Vorliegen von prä-neoplastischen Läsionen hinweisen.

Am besten geeignet für die Diagnose eines Karzinoms war der Anteil von für das Chromosom 8 triploiden Zellen. In der Gruppe der Patienten mit einem Karzinom wurden zwischen 9 und 70% der Zellen mit drei Kopien von Chromosom 8 gefunden (Mittelwert $25,5 \pm 29,3\%$). Von den Fällen ohne Karzinom hatte nur einer der Patienten (4,1%) in 9% der Zellen eine Trisomie 8. Dagegen wurden in der Gruppe der malignen Erkrankungen in allen Patienten mindestens 9% der Zellen mit einer Trisomie 8 detektiert.

Der prozentuale Anteil von Zellen mit zwei Signalen für Chromosom 8 war negativ mit dem Vorliegen einer malignen Erkrankung korreliert (26-86% diploide Zellen bei Patienten mit Karzinom vs. 83-98% ohne Karzinom). Von den Patienten mit einer benignen Erkrankung hatten 10% (2/20) der Fälle in weniger als 86% der Zellen diploide Signale für Chromosom 8.

Unter Einsatz der Locus-spezifischen Sonden war die Kopiezahl-Veränderung des *EGFR*-Locus am besten für die Differenzierung zwischen malignen und benignen Erkrankungen geeignet. Der Anteil von für *EGFR* diploiden Zellen lag in der Gruppe von Patienten mit malignen Erkrankungen zwischen 11% und 88%, in der Gruppe mit benignen Erkrankungen lagen die Anteile zwischen 78,5% und 97%. Von den Fällen mit einer benignen Erkrankung hatten 19% (4/21) in weniger als 88% der Zellen zwei Kopien des *EGFR*-Locus. Das Vorhandensein von Tetrasomien für das *EGFR*-Gen war ebenfalls ein guter Indikator für das Vorliegen eines Karzinoms (Bereich maligne 0-42% vs. benigne 0-3%). In einem der vier Patienten mit Karzinom wurden keine Tetrasomien für den *EGFR*-Locus gefunden, in den drei weiteren Patienten wurden jeweils in mindestens 10% der Zellen vier Kopien von *EGFR* nachgewiesen.

Kollektiv 2

Die Analyse der Kopiezahl-Veränderungen der Chromosomen durch die Hybridisierung von Centromersonden ergab für die Chromosomen 7, 8 und 20 im Mittel niedrigere Anteile von diploiden Zellen in den Proben der Patienten mit einem Karzinom. Für Chromosom 17 ergab

die Analyse in beiden Gruppen annähernd gleich hohe Anteile von diploiden Zellen. Dabei zeigte sich auch in diesem Kollektiv in der Gruppe der Patienten mit Karzinom eine sehr heterogene Verteilung von Ploidie-Veränderungen (Bereich 69-100% diploide Zellen vs. 86-99% diploide Zellen in Präparaten von Patienten mit chronischer Pankreatitis). Die relativ hohe Zahl von Zellen mit Ploidie-Veränderungen in der Patientengruppe mit benignen Erkrankungen könnte auch in diesem Kollektiv auf das Vorliegen von prä-neoplastischen Läsionen hinweisen.

Am besten geeignet für die Diagnose eines Karzinoms war der Anteil von für das Chromosom 20 diploiden Zellen. In der Gruppe der Patienten mit einem Karzinom wurden zwischen 69 und 97% der Zellen mit zwei Kopien von Chromosom 20 gefunden (Mittelwert $89,4 \pm 10,7\%$). In den Fällen ohne Karzinom wurden zwischen 95 und 98% (Mittelwert $96,5 \pm 1,4\%$) für Chromosom 20 diploide Zellen detektiert.

Unter Einsatz der Locus-spezifischen Sonden war der Anteil von Zellen mit zwei Kopien des *Her2*-Locus am besten für die Differenzierung zwischen malignen und benignen Erkrankungen geeignet. Der Anteil von für *Her2* diploiden Zellen lag in der Gruppe von Patienten mit malignen Erkrankungen zwischen 75 und 96,5%. In der Gruppe mit benignen Erkrankungen lagen die Anteile zwischen 95 und 99%. Das Vorhandensein von Trisomien des *AIB1*-Locus war ebenfalls ein guter Indikator für das Vorliegen eines Karzinoms (Bereich maligne 1-12% vs. benigne 0-4%). In zwei der fünf Patienten mit Karzinom wurden weniger als 4% der Zellen mit einer Trisomie für den *AIB1*-Locus gefunden.

Methodendiskussion

Zur Qualitätskontrolle der Ploidiemessungen wurden ausgewählte Fälle im Labor von Prof. Dr. med. G. Auer am Karolinska Institut (Stockholm, Schweden) mittels Image-Cytometrie auf Ploidieveränderungen untersucht. Für den Vergleich der Untersuchungen wurden die mittleren Kopiezahlen der in dieser Arbeit untersuchten Onkogen-Loci für jeden Fall gemittelt und so ein relativer Ploidiestatus berechnet. Die *Pearson Product Moment Correlation* ergab eine signifikante ($p=0,011$) Übereinstimmung der Ploidiemessungen mittels FISH und Image-Cytometrie. Damit konnte gezeigt werden, dass die hier verwendeten Marker für die Bestimmung von Ploidie-Veränderungen gut geeignet waren.

Bei der Aspirationszytologie konnten aus dem Sekret von 25 von insgesamt 50 Patienten ausreichende Mengen von Zellkernen isoliert werden. Von den Proben, die durch Bürstencytologie gewonnen wurden, ließen sich aus 11 von 12 (ca. 92%) ausreichende Mengen von Zellkernen isolieren. In den Proben, welche nicht analysiert werden konnten,

war nicht genügend zelluläres Material vorhanden. Die Bürstenzytologie lieferte dabei in der Mehrzahl der untersuchten Fälle eine höhere Zahl von Zellen in den Proben als die Aspirationszytologie (92% vs. 50% auswertbare Proben).

Die Unterschiede in der Probengewinnung sind vermutlich auch für Unterschiede in der Aussagekraft der verwendeten Marker in den beiden Kollektiven verantwortlich. In Kollektiv 1 waren für die Differenzierung zwischen benignen und malignen Erkrankungen die Anteile an Zellen mit einer Trisomie von Chromosom 8 am besten geeignet, gefolgt vom Anteil an Disomien von Chromosom 8 und Chromosom 7. In Kollektiv 2 war dagegen der Anteil an Zellen mit zwei Kopien von Chromosom 20 der beste Indikator für das Vorliegen eines Karzinoms. Auch die Verwendung der Locus-spezifischen Marker lieferte in beiden Kollektiven unterschiedliche Ergebnisse. So waren in den Aspirationszytologien die Kopiezahl-Veränderungen des *EGFR*-Locus und des *MYC*-Locus die besten Marker für das Vorliegen eines Karzinoms. Dagegen lieferten Kopiezahl-Veränderungen von *Her2* und *AIB1* bei den Bürstenzytologien die besten Ergebnisse für die Differenzierung zwischen dem Vorliegen eines Karzinoms und einer benignen Erkrankung. Da in beiden Kollektiven nur eine relativ geringe Zahl von malignen Fällen zur Verfügung stand, ist ein weiterer Vergleich der Probeentnahme und mögliche daraus resultierende Unterschiede für die Diagnostizierbarkeit eines Karzinoms nur durch die Analyse einer größeren Fallzahl möglich. Festzuhalten ist jedoch, dass die Zuverlässigkeit bzw. die Aussagekraft der Sonden in Kollektiv 1 durchweg höher war. Entscheidend hierfür ist vermutlich die Kontamination mit Zellen aus normalem Epithel in Kollektiv 2. Während in der Aspiration lediglich solche Zellen gefunden werden, die vom Epithel in die Gänge abgesondert werden, wird mit der Bürste mechanisch Zellmaterial abgetragen. Sofern dabei nicht nur eine Striktur bzw. eine Läsion erfasst wird, ist mit einer Beladung der Probe von nicht-neoplastischen Zellen zu rechnen. Dies erklärt auch die unterschiedliche Menge von auswertbaren Fällen in beiden Kollektiven.

In beiden Kollektiven wurden in der Gruppe von Fällen ohne nachgewiesenem Karzinom teilweise hohe Mengen an aneuploiden Zellen detektiert. Dies könnte auf die Existenz von prä-neoplastischen Läsionen in diesen Patienten hinweisen. Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit an prä-neoplastischen Läsionen aus dem Pankreas zeigten, dass sich in Patienten mit einer chronischen Pankreatitis vermutlich lange vor der Bildung eines Karzinoms aneuploide Zellpopulationen nachweisen lassen. Jedoch kann in diesen Fällen auch das Vorliegen eines Karzinoms nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die diagnostischen Möglichkeiten für die Detektion eines Tumors mit nur geringer räumlicher Ausdehnung sehr begrenzt sind. Die Patienten wurden über einen Zeitraum von mindestens 24 Monaten nachbeobachtet. Von keinem der Patienten, welche mit benignen

Grunderkrankung eingestuft waren, lag bis zur Fertigstellung dieser Arbeit ein Bericht über die Entwicklung eines Karzinoms vor. Nicht alle in dieser Studie untersuchten Patienten mit Karzinom hatten größere Mengen an aneuploiden Zellen in den analysierten Proben. Die wahrscheinlichste Erklärung für falsch-negative Ergebnisse ist das Fehlen von Tumorzellen in der Probe, was vermutlich in einer unzureichenden Probenentnahme begründet ist. Mögliche Ursachen für Schwierigkeiten bei der Probenentnahme beinhalten: eine schlechte Sichtbarkeit der Läsion während der ERCP, eine schwierige anatomische Lokalisation der Läsion, ein Tumor der das Gangsystem von außen abdrückt und nicht in diesem wächst, oder ein Tumor der durch eine desmoplastische Reaktion keine „echten“ Tumorzellen in das Gangsystem abgegeben hat [Barr-Fritcher et al., 2007].

Bei einer vorliegenden chronischen Entzündung ist die ERCP allein nicht ausreichend sensitiv um zwischen malignen und benignen Prozessen zu unterscheiden, da Gangverengungen neben Karzinomen auch durch benigne Konditionen wie z.B. Gallenwegsentzündungen oder chronische Pankreatitis verursacht werden können [Sears et al., 1998; Barr-Fritcher et al., 2007]. Die Probeentnahme durch Ultraschall-gestützte Fein-Nadel-Aspirationen bietet zwar die Möglichkeit von einem relativ genauen anatomischen Punkt innerhalb des Organs Gewebe zu entnehmen, ist aber mit einem hohen Risiko der Tumorzell-Ausbreitung durch den Biopsiekanal verbunden [Sears et al., 1998; Uchida et al., 2007]. Das Aufspüren von malignen Zellen bei in der ERCP gewonnenen Aspirations- und Bürstenzytologien ist generell hoch spezifisch (bis zu 100%), aber mit einer geringen Sensitivität von 20-80% verbunden. Dabei kommt es häufig zu hohen Raten von falsch negativen Ergebnissen und niedrigen negativ prädiktiven Werten [Volmar et al., 2006; Moreno-Luna et al., 2006; Uchida et al., 2007; Barr-Fritcher et al., 2007]. Die korrekte Einstufung von malignen Fällen liegt dabei meistens bei ca. 50% [Volmar et al., 2006; Uchida et al., 2007]. Der Anteil von nicht auswertbaren Proben lag in anderen Studien zwischen 0% und 58% [Volmar et al., 2006; Uchida et al., 2007]. In einigen Studien wurde der Versuch unternommen weitere diagnostische Kriterien neben der reinen Zytologie zu verwenden. So konnte z.B. unter Verwendung der Image-Cytometrie in Ergänzung zur Zytologie die Sensitivität für die Detektion eines Malignoms auf 82% gesteigert werden, dabei wurde eine Spezifität von 82% erreicht [Sears et al., 1997]. Es existieren bisher wenige Studien, die FISH-Analysen an zytologischen Präparaten, die während der ERCP gewonnen wurden durchgeführt haben [Kipp et al., 2004; Moreno-Luna et al., 2006, Barr-Fritcher et al., 2007]. Für die Hybridisierungen wurden kommerzielle Sonden für die Centromere der Chromosomen 3, 7, und 17 sowie für den Locus 9p21 verwendet (UroVision, Vysis). Die dabei erreichte Sensitivität lag bei 34% in Bürstenzytologien bzw. 23% in Aspirationszytologien [Kipp et al., 2004]. Dabei wurde das Auftreten einer Polysomie in

mindestens 5 Zellen als positives FISH-Ergebnis eingestuft. Die Polysomie war dabei als Zugewinn von Signalen bei mindestens zwei der eingesetzten Sonden definiert [Kipp et al., 2004]. Aufbauend auf den Daten von Kipp et al. wurde in einer weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe an einer erweiterten Fallzahl das gleiche Sonden-Set verwendet. Hier wurde das Vorliegen eines Karzinoms über die bereits in der Studie von Kipp et al. 2004 verwendeten Polysomien definiert, jedoch durch die Detektion von Trisomien für die Chromosomen 7 und 3 in mehr als 10% der untersuchten Zellen erweitert [Moreno-Luna et al., 2006]. Die damit erreichte Sensitivität lag bei 59-63%. Trisomien für Chromosom 7 wurden in der Studie von Moreno-Luna und in der vorliegenden Arbeit in neoplastischen und nicht-neoplastischen Geweben gefunden. Aus diesem Grund müssen Trisomien mit Vorsicht interpretiert und im klinischen Kontext betrachtet werden [Moreno-Luna et al., 2006]. In der Studie von Barr-Fritcher et al. [2007] waren ebenfalls nur 54% der Fälle mit einer Trisomie 7 mit einer malignen Neoplasie vergesellschaftet.

Auch wenn das Auftreten von Kopienzahl-Veränderungen nicht eindeutig mit dem Auftreten eines Karzinoms verbunden ist, so erhöht es das relative Risiko für die Entstehung eines Tumors. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse der Analysen von prä-neoplastischen Läsionen und von zytologischen Proben von Patienten mit chronischer Pankreatitis belegen dies. Aus diesem Grund sollten solche Patienten in denen diese Veränderungen nachgewiesen werden engmaschig überwacht und in regelmäßigen Intervallen erneut untersucht werden.

Es ist festzuhalten, dass mit den verwendeten selbst generierten Sonden chromosomale Veränderungen in endoskopisch gewonnenen Präparaten des Pankreas messbar waren. Der limitierende Faktor hierbei war, wie auch bei anderen zytologischen Untersuchungen, die Probenentnahme, da nicht in allen Fällen mit nachgewiesenem Karzinom Zellen mit Kopienzahl-Veränderungen gefunden werden konnten. Daher sollte eine FISH-basierte Diagnostik nur in Ergänzung mit anderen diagnostischen Methoden durchgeführt werden. Allerdings zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass in Patienten mit einer chronischen Pankreatitis bereits vor der Entwicklung eines Malignoms Zellpopulationen mit Veränderungen der Chromosomen-Kopiezahl detektiert werden können. Die biologische Relevanz für die Tumorentstehung in diesen Fällen muss im klinischen Kontext betrachtet werden und liefert in Kombination mit weiteren Parametern, wie z.B. Alter und Dauer des Vorliegens der chronischen Pankreatitis, eine Möglichkeit das Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms individuell zu bestimmen und Patienten somit frühzeitig, noch vor der Manifestation eines Tumors, möglicherweise einer (Teil-)Resektion des Organs zuzuführen. Die hier vorgestellten Erkenntnisse bedürfen dazu sicherlich einer weiteren Validierung an

einem größeren Patientenkollektiv und benötigen zusätzlich gut dokumentierte klinische Verlaufsdaten, um Aussagen über die diagnostische Relevanz der untersuchten Marker zu erlauben. Eine entsprechende Diagnostik könnte in Zukunft eine Risikoabschätzung ermöglichen und so dem behandelnden Arzt entscheidende Hinweise geben.

6 Zusammenfassung

In Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen an Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreaskarzinom) bei Männern auf ca. 6.300, bei Frauen auf ca. 6.600 geschätzt. Durch die in den meisten Fällen zu späte Diagnose des bis dahin zumeist symptomfreien Malignoms existieren zurzeit keine erfolgsversprechenden Therapieoptionen. Selbst die Resektion des Tumors kann nur in wenigen Fällen durchgeführt werden und ist zudem meistens nicht kurativ. Daher ist die Entwicklung einer sensitiven Frühdiagnostik von entscheidender Bedeutung. Die Entwicklung des Pankreaskarzinoms steht im Zusammenhang mit Entzündung und Regeneration des Organs, wie sie bei einer langjährigen chronischen Pankreatitis auftreten. Dies kann zu einer schrittweisen Anhäufung von genetischen und histologischen Veränderungen führen. Obwohl sich solche Veränderungen bereits in den frühesten Läsionen finden lassen, war es bisher noch nicht möglich diese Marker in der Routine für die Frühdiagnostik zu nutzen. Ein besonderes Merkmal der Pankreaskarzinome ist die ausgeprägte chromosomale Instabilität. Das Auftreten von chromosomaler Instabilität könnte daher einen kritischen Punkt in der Genese des Pankreaskarzinoms darstellen und der Nachweis von Veränderungen im Ploidiestatus möglicherweise für die Frühdiagnostik nützlich sein.

Im Rahmen dieser Arbeit bot sich zum ersten Mal die Gelegenheit, zytogenetische Veränderungen über das gesamte Spektrum der als pankreatisch-intraepithelialen Neoplasien (PanIN) und azinär-duktales Metaplasien (ADM) bezeichneten Vorläuferläsionen aus Geweben mit chronischer Pankreatitis zu analysieren. Die Daten konnten mit vorliegenden Ergebnissen von molekulargenetischen und immunhistochemischen Analysen der Tumor-Suppressor-Gene (TSG) *p53*, *p16* und *DPC4* in den gleichen Patientenproben korreliert werden. Dies ermöglichte eine Einstufung des zeitlichen Auftretens der Veränderungen in der Karzinogenese bei einer vorliegenden chronischen Pankreatitis. Dabei zeigte sich, dass Veränderungen des Ploidiestatus einzelner Chromosomen bereits in normal erscheinendem Epithel in geringem Prozentsatz zu finden sind und mit zunehmenden histomorphologischen Veränderungen graduell ansteigen. Veränderungen in den TSG traten in einer vergleichbaren Abstufung wie bei Karzinom-assoziierten PanINs auf. Aneuploidien und Mutationen in TSG fanden sich bereits in den frühesten histomorphologisch fassbaren Gangläsionen. Die erhobenen Daten über zyto- und molekulargenetische Veränderungen in den ADM sind die ersten dieser Art und geben Hinweise dafür, dass diese Läsionen mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls als Veränderungen mit neoplastischem Potential einzustufen sind, möglicherweise sogar die diesbezüglich erste erkennbare Veränderung im Gewebe. Die gefundenen Daten liefern Anhaltspunkte, dass die in Geweben mit chronischer Pankreatitis auftretenden prä-neoplastischen Läsionen eine Progression durchmachen, in der sich sporadische Defekte wie Basenmutationen und Mitosefehler (Aneuploidien)

akkumulieren. Besonders das gehäufte Auftreten dieser Aberrationen in PanIN-2- und PanIN-3-Läsionen gibt Grund zu der Annahme, dass Patienten mit einer hochgradigen Veränderung ein hohes Risiko tragen ein Karzinom zu entwickeln. Ausgehend von diesen Daten wurden im zweiten Teil dieser Arbeit FISH-basierte Biomarker generiert um diese auf zytologische Präparate anzuwenden. Zum Einsatz kamen Sonden für die Onkogen-Loci *EGFR* (7p), *cMYC* (8q), *Her2* (17q) und *AIB1* (20q), in Kombination mit einer Sonde für die Centromer-Region des jeweiligen Chromosoms. Die Präparate wurden während eines endoskopischen Eingriffes (ERCP) durch Aspiration von Pankreassekreten und durch den Einsatz von Zytologiebürsten gesammelt. Eine interne Qualitätskontrolle der Sonden erfolgte an diploiden Leukozyten-Präparationen und aneuploiden Pankreaskarzinom-Zelllinien. Mit den verwendeten selbst generierten Sonden waren chromosomale Veränderungen in Präparaten des Pankreas messbar. Ein limitierender Faktor war dabei, wie auch bei anderen zytologischen Untersuchungen, die Probeentnahme, da nicht in allen Fällen mit nachgewiesenem Karzinom Zellen mit Ploidie-Veränderungen gefunden werden konnten. Allerdings zeigen die Ergebnisse, dass in Patienten mit einer chronischen Pankreatitis bereits vor der Entwicklung eines Malignoms Zellpopulationen mit Veränderungen der Chromosomen-Kopiezahl detektiert werden können. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse der Analysen von prä-neoplastischen Läsionen und von zytologischen Proben von Patienten mit chronischer Pankreatitis belegen dies. Aus diesem Grund sollten solche Patienten in denen diese Veränderungen nachgewiesen werden, engmaschig überwacht und in regelmäßigen Intervallen erneut untersucht werden. Die biologische Relevanz für die Tumorentstehung in diesen Fällen muss im klinischen Kontext betrachtet werden und liefert in Kombination mit weiteren Parametern, wie z.B. Alter und Dauer des Vorliegens der chronischen Pankreatitis, eine Möglichkeit das Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms individuell zu bestimmen und Patienten somit frühzeitig, noch vor der Manifestation eines Tumors, möglicherweise einem chirurgischen Eingriff zuzuführen. Die hier vorgestellten Erkenntnisse bedürfen dazu sicherlich einer Validierung an einem größeren Patientenkollektiv und benötigen zusätzlich gut dokumentierte klinische Verlaufsdaten, um Aussagen über die diagnostische Relevanz der untersuchten Marker zu erlauben. Eine entsprechende Diagnostik könnte in Zukunft eine Risikoabschätzung ermöglichen und so dem behandelnden Arzt entscheidende Hinweise geben.

Tabelle A1 FISH-Analysen mit Centromersonden an Pankreaskarzinom-Zelllinien. Für jede Centromersonde ist der prozentuale Anteil von Zellen mit einem bis gleich oder mehr als fünf Signalen von jeweils 100 ausgewerteten Nuklei angegeben. (Cep: Centromersonde)

Zelllinie	haploid	diploid	Cep 4 triploid	tetraploid	polyploid
AsPc-1	7	67	8	13	5
BxPc-3	5	25	57	8	5
Capan-1	6	85	8	1	0
Capan-2	0	2	30	61	7
CFPAC-1	0	19	55	25	1
Hs766T	8	79	7	5	1
Mia PaCa-2	0	71	16	11	2
Panc-1	2	65	19	10	4
SU86.86	0	6	58	17	19
Leukozyten	2	98	0	0	0

Zelllinie	haploid	diploid	Cep 7 triploid	tetraploid	polyploid
AsPc-1	3	3	15	75	4
BxPc-3	1	21	72	3	3
Capan-1	0	0	27	65	8
Capan-2	0	5	27	59	9
CFPAC-1	0	0	10	40	50
Hs766T	2	2	28	57	11
Mia PaCa-2	1	23	50	25	1
Panc-1	1	4	8	62	25
SU86.86	1	8	25	50	16
Leukozyten	4	96	0	0	0

Zelllinie	haploid	diploid	Cep 8 triploid	tetraploid	polyploid
AsPc-1	2	18	56	7	17
BxPc-3	3	25	56	14	2
Capan-1	0	14	80	3	3
Capan-2	0	1	29	64	6
CFPAC-1	0	57	43	0	0
Hs766T	1	66	25	5	3
Mia PaCa-2	0	5	90	3	2
Panc-1	1	8	64	5	22
SU86.86	0	3	14	52	31
Leukozyten	3	97	0	0	0

Zelllinie	haploid	diploid	Cep 9 triploid	tetraploid	polyploid
AsPc-1	1	95	4	0	0
BxPc-3	2	74	17	5	2
Capan-1	0	9	87	3	1
Capan-2	0	11	31	51	7
CFPAC-1	0	23	57	16	4
Hs766T	2	8	58	27	5
Mia PaCa-2	5	89	2	4	0
Panc-1	1	74	5	19	1
SU86.86	48	40	10	0	2
Leukozyten	1	96	3	0	0

Zelllinie	haploid	diploid	Cep 12 triploid	tetraploid	polyploid
AsPc-1	2	17	52	13	16
BxPc-3	4	87	6	3	
Capan-1	1	16	77	4	2
Capan-2	0	2	26	71	1
CFPAC-1	0	17	79	3	1
Hs766T	4	14	71	5	6
Mia PaCa-2	1	22	74	2	1
Panc-1	1	7	69	5	18
SU86.86	0	14	35	39	12
Leukozyten	2	98	0	0	0

Zelllinie	haploid	diploid	Cep 17 triploid	tetraploid	polyploid
AsPc-1	5	69	7	18	1
BxPc-3	9	81	6	4	0
Capan-1	0	0	14	85	1
Capan-2	2	62	34	2	0
CFPAC-1	0	0	13	85	2
Hs766T	4	89	4	3	0
Mia PaCa-2	0	11	74	6	9
Panc-1	4	9	22	37	28
SU86.86	0	9	64	12	15
Leukozyten	4	96	0	0	0

Zelllinie	haploid	diploid	Cep 18 triploid	tetraploid	polyploid
AsPc-1	8	58	18	14	2
BxPc-3	4	87	6	3	0
Capan-1	0	7	17	60	16
Capan-2	6	88	4	2	0
CFPAC-1	1	25	73	1	0
Hs766T	5	76	18	1	0
Mia PaCa-2	0	35	60	5	0
Panc-1	2	55	24	10	9
SU86.86	3	41	33	8	15
Leukozyten	3	95	2	0	0

Zelllinie	haploid	diploid	Cep 20 triploid	tetraploid	polyploid
AsPc-1	2	28	45	11	14
BxPc-3	1	5	15	61	18
Capan-1	4	28	37	15	16
Capan-2	0	6	27	55	12
CFPAC-1	1	2	20	73	4
Hs766T	2	5	18	48	27
Mia PaCa-2	0	18	49	21	12
Panc-1	2	22	54	4	18
SU86.86	1	24	42	22	11
Leukozyten	1	96	1	2	0

Tabelle A2. Ergebnisse der zwei-Farben-FISH-Experimente an Zelllinien und Leukozyten. Für jede Centromersonde ist der prozentuale Anteil von Zellen mit einem bis gleich oder mehr als fünf Signalen von jeweils 100 ausgewerteten Nuklei angegeben. (Cep: Centromersonde)

Zelllinie	Sonde	haploid	diploid	triploid	tetraploid	polyploid
Capan1	Cep7	1,00	4,00	19,00	53,00	23,00
Capan1	EGFR	0,00	4,00	22,00	44,00	30,00
Capan1	Cep8	1,00	5,00	53,00	23,00	18,00
Capan1	cMYC	2,00	4,00	20,00	39,00	35,00
Capan1	Cep17	1,00	1,00	24,00	65,00	9,00
Capan1	Her2	0,00	0,00	0,00	15,00	85,00
Capan1	Cep20	1,00	26,00	36,00	25,00	14,00
Capan1	AIB1	0,00	8,00	36,00	41,00	15,00
Capan2	Cep7	0,00	1,00	13,00	67,00	19,00
Capan2	EGFR	0,00	0,00	6,00	40,00	54,00
Capan2	Cep8	0,00	0,00	15,00	65,00	20,00
Capan2	cMYC	0,00	0,00	7,00	71,00	22,00
Capan2	Cep17	1,00	52,00	29,00	13,00	5,00
Capan2	Her2	0,00	7,00	61,00	11,00	21,00
Capan2	Cep20	1,00	1,00	19,00	58,00	21,00
Capan2	AIB1	0,00	2,00	15,00	62,00	21,00
MiaPaCa2	Cep7	0,00	5,00	38,00	43,00	14,00
MiaPaCa2	EGFR	0,00	3,00	29,00	45,00	23,00
MiaPaCa2	Cep8	0,00	10,00	67,00	10,00	13,00
MiaPaCa2	cMYC	0,00	1,00	19,00	57,00	23,00
MiaPaCa2	Cep17	2,00	25,00	66,00	5,00	2,00
MiaPaCa2	Her2	3,00	21,00	62,00	10,00	4,00
MiaPaCa2	Cep20	3,00	32,00	48,00	14,00	3,00
MiaPaCa2	AIB1	3,00	21,00	56,00	12,00	8,00
Panc1	Cep7	0,00	9,00	32,00	37,00	22,00
Panc1	EGFR	0,00	8,00	25,00	34,00	33,00
Panc1	Cep8	0,00	4,00	57,00	12,00	27,00
Panc1	cMYC	0,00	2,00	51,00	19,00	28,00
Panc1	Cep17	1,00	44,00	32,00	16,00	7,00
Panc1	Her2	0,00	10,00	21,00	31,00	38,00
Panc1	Cep20	0,00	15,00	54,00	12,00	18,00
Panc1	AIB1	0,00	13,00	46,00	17,00	24,00
Su8686	Cep7	0,00	5,00	49,00	21,00	25,00
Su8686	EGFR	0,00	4,00	39,00	25,00	32,00
Su8686	Cep8	0,00	3,00	31,00	39,00	27,00
Su8686	cMYC	0,00	2,00	27,00	41,00	30,00
Su8686	Cep17	0,00	4,00	50,00	20,00	26,00
Su8686	Her2	0,00	2,00	55,00	25,00	18,00
Su8686	Cep20	0,00	17,00	28,00	28,00	27,00
Su8686	AIB1	0,00	0,00	5,00	14,00	81,00
Leukozyten	Cep7	1,00	98,00	1,00	0,00	0,00
Leukozyten	EGFR	1,00	96,00	3,00	0,00	0,00
Leukozyten	Cep8	2,00	97,00	1,00	0,00	0,00
Leukozyten	cMYC	1,00	99,00	0,00	0,00	0,00
Leukozyten	Cep17	1,00	98,00	1,00	0,00	0,00
Leukozyten	Her2	2,00	98,00	0,00	0,00	0,00
Leukozyten	Cep20	1,00	98,00	1,00	0,00	0,00
Leukozyten	AIB1	1,00	97,00	2,00	0,00	0,00

Tabelle A3. Amplifikation von Onkogenen an Zelllinien und Leukozyten. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Zellen mit einem Quotient aus der Anzahl von Gen-spezifischen FISH-Signalen zu der Anzahl der Centromer-Signale

	<i>EGFR/CEP7</i>					<i>cMYC/CEP8</i>				
	<1	1	>1	2	>2	<1	1	>1	2	>2
Su8686	1	72	25	2			91	6	2	1
MiaPaCa2		79	20	1			28	65	7	
Capan1	11	71	16	1	1	3	31	50	6	10
Capan2	1	52	38	6	3	4	80	14	2	
Panc1	5	72	23			5	78	17		
Leukozyten		98	2			1	98		1	

	<i>Her2/CEP17</i>					<i>AIB1/CEP20</i>				
	<1	1	>1	2	>2	<1	1	>1	2	>2
Su8686	13	78	7	1	1		9	43	23	25
MiaPaCa2	7	79	9	5		2	80	17	1	
Capan1		9	71	15	5	14	39	34	10	3
Capan2		28	65	6	1	5	82	12	1	
Panc1		34	29	23	14	5	76	18	1	
Leukozyten	2	97	1				98	1	1	

(Quotient kleiner 1, 1, zwischen 1 und 2, 2 und größer 2).

Tabelle A4. Patientenkollektiv 1

Nr	Sex	Alter	Diagnose
Karzinome			
1	M	84	Pankreas-Adenokarzinom
2	W	67	Klatskin-Tumor
3	M	67	Adenokarzinom des Dc. Choledochus
25	W	71	Pankreas-Adenokarzinom
Chronische Pankreatitis			
5	M	38	Chronisch rezidivierende Pankreatitis (bek. A1-Antitrypsinmangel)
7	W	65	Chronische Pankreatitis
9	M	34	Chronische Pankreatitis
11	W	43	Chronisch kalzifizierende Pankreatitis und distale Stenose im D. Hepaticus
12	M	49	Chronische Pankreatitis; Entfernung eines Konkrementes aus D. Pankreatic.
14	M	50	Chronisch kalzifizierende Pankreatitis
15	W	68	Chronische Pankreatitis
23	w	45	Stenose des Dc. Pankreaticus
Cholecysto- und Choledocholithiasis			
4	w	78	Cholecystolithiasis
6	w	84	Cholestase bei ausgeprägter Choledocholithiasis
13	m	84	Choledochus Stenose
16	w	49	Choledocholithiasis
17	w	68	Choledocholithiasis
18	w	39	Choledocholithiasis
20	m	58	Cholecysto-und docholithiasis
21	m	77	hochmalignes B-Zell-Lymphom, Verschlußikterus bei Lymphomkompression
22	m	83	Choledocholithiasis, inkomplettes Pankreas divisum, Magenkarzinom
Lebererkrankungen			
8	w	55	Zustand nach Lebertransplantation; Merkelzelltumor der Wange
10	w	52	C2-toxische Leberzirrhose Child A
19	m	61	C2-toxische Leberzirrhose
24	w	41	Zustand nach Lebertransplantation; Anastomosenstenose

Tabelle A5. Ploidieanalyse in Kollektiv 1 mit Centromersonden. Angegeben sind die prozentualen Anteile von ha-, di-, tri-, tetra- und polyploiden Zellen mit jeweils 1, 2, 3, 4 und 5 oder mehr Signalen.

Patient	Ploidie Cep7 [%]					Ploidie Cep8 [%]					Ploidie Cep17 [%]					Ploidie Cep20 [%]				
	1	2	3	4	≥5	1	2	3	4	≥5	1	2	3	4	≥5	1	2	3	4	≥5
Karzinome																				
1	4	72	17	7		7	74	13	4	2										
2	2	81	10	6	1	5	83	9	3		10	84	6			9	85	6		
3	3	89	8			3	86	9	2		4	94	2			1	95	4		
25		12	26	60	2	1	26	70	1	2	1	11	14	64	10		20	30	49	1
Chronische Pankreatitis																				
5	6	91	3			3	97				4	85	9	2		5	88	6	1	
7	4	92	4			4	89	4	3		1	92	6	1		1	91	7	1	
9	1	96	2				91	7	2							2	87	7	4	
11	3	95	2			1	98		1		4	95	1			1	96	3		
12		96	3	1		1	92	7			3	92	5			1	95	4		
14		90	10			1	87	7	5		3	93	4			1	93	4	1	1
15		96	4			1	93	5	1		1	96	3			2	95	3		
23	3	94	3			4	91	5			8	92				6	94			
Cholecysto- und Choledocholithiasis																				
4	4	92	4			4	93	3			4	96				5	87	8		
6	1	81	15	3		4	91	4		1	1	95	4			1	94	5		
13	1	96	3			3	85	9	3		2	90	6	2		4	89	7		
16	2	94	4			3	92	2	3							3	96	1		
17	2	88	10													4	94	2		
18	2	95	3			2	95	3			5	95				6	94			
20	2	97	1			5	94	1			5	93	2			3	97			
21	2	93	3	2		3	95	2			1	99				4	96			
22	2	98				2	98				6	91	2	1		4	95	1		
Lebererkrankungen																				
8		95	2	3		2	89	7	1	1	2	85	8	3	8	3	85	7	5	
10	4	92	4			3	90	5	1	1	1	94	2	3		3	91	4	2	
19	11	82	7			7	83	8	2											
24	3	92	5			3	95	2			7	92	1			4	94	2		

Tabelle A6. Ploidieanalyse in Kollektiv 1 mit Locus-spezifischen Sonden. Angegeben sind die prozentualen Anteile von ha-, di-, tri-, tetra- und polyploiden Zellen mit jeweils 1, 2, 3, 4 und 5 oder mehr Signalen.

Patient	Ploidie <i>EGFR</i> [%]					Ploidie <i>cMYC</i> [%]					Ploidie <i>Her2</i> [%]					Ploidie <i>AIB1</i> [%]				
	1	2	3	4	≥5	1	2	3	4	≥5	1	2	3	4	≥5	1	2	3	4	≥5
Karzinome																				
1	0,0	63,0	17,0	12,0	8,0	2,1	68,6	14,0	9,7	5,5										
2	1,0	73,0	13,0	10,0	3,0	0,0	81,0	10,0	6,0	3,0	5,0	86,0	8,0	0,0	1,0	3,0	91,0	6,0	0,0	0,0
3	4,0	88,0	8,0	0,0	0,0	3,0	84,0	9,0	4,0	0,0	1,0	95,0	4,0	0,0	0,0	1,0	94,0	5,0	0,0	0,0
25	0,0	11,0	14,0	42,0	33,0	1,3	17,3	1,3	2,0	78,1	0,0	14,0	10,0	50,0	26,0	0,0	31,6	26,6	35,0	6,8
Chronische Pankreatitis																				
5	2,0	95,0	2,0	1,0	0,0	4,0	87,0	7,0	2,0	0,0	0,0	87,0	6,0	4,0	3,0	3,0	90,0	6,0	1,0	0,0
7	3,0	92,0	5,0	0,0	0,0	3,0	89,0	5,0	3,0	0,0	1,0	90,0	8,0	1,0	0,0	1,0	90,0	8,0	1,0	0,0
9	1,0	94,0	2,0	2,0	1,0	0,0	91,4	6,9	1,7	0,0						2,0	86,0	8,0	4,0	0,0
11	0,9	96,3	2,8	0,0	0,0	0,0	99,0	0,0	1,0	0,0	2,0	97,0	1,0	0,0	0,0	2,0	94,0	3,0	1,0	0,0
12	0,0	96,0	2,0	2,0	0,0	0,0	92,0	8,0	0,0	0,0	0,0	93,0	7,0	0,0	0,0	1,0	88,0	11,0	0,0	0,0
14	0,0	84,0	15,0	1,0	0,0	0,0	87,0	7,0	6,0	0,0	2,0	92,0	6,0	0,0	0,0	1,0	93,0	4,0	1,0	1,0
15	0,0	96,0	4,0	0,0	0,0	1,0	93,0	5,0	1,0	0,0	1,0	94,0	5,0	0,0	0,0	1,0	96,0	2,0	1,0	0,0
23	1,0	96,0	3,0	0,0	0,0	1,0	91,0	7,0	1,0	0,0	1,5	96,5	1,0	1,0	0,0	2,0	98,0	0,0	0,0	0,0
Cholecysto- und Choledocholithiasis																				
4	4,0	92,0	4,0	0,0	0,0	2,0	92,0	4,0	2,0	0,0	1,0	98,0	1,0	0,0	0,0	3,0	88,0	9,0	0,0	0,0
6	0,0	82,0	15,0	3,0	0,0	4,0	91,0	4,0	0,0	1,0	2,0	92,0	5,0	1,0	0,0	1,0	94,0	5,0	0,0	0,0
13	1,0	93,0	5,0	1,0	0,0	2,0	86,0	9,0	3,0	0,0	2,0	88,0	7,0	3,0	0,0	4,0	91,0	5,0	0,0	0,0
16	3,5	91,0	5,5	0,0	0,0	2,0	88,5	4,5	3,0	2,0						2,6	96,1	1,3	0,0	0,0
17	2,2	85,8	11,5	0,5	0,0											4,0	89,5	3,0	3,0	0,0
18	1,0	94,0	5,0	0,0	0,0	0,0	96,0	4,0	0,0	0,0	4,0	95,0	0,0	1,0	0,0	4,0	95,0	1,0	0,0	0,0
20	2,0	98,0	0,0	0,0	0,0	1,0	99,0	0,0	0,0	0,0	4,0	93,0	2,0	1,0	0,0	1,0	96,0	2,0	1,0	0,0
21	2,0	92,0	4,0	2,0	0,0	0,0	97,0	3,0	0,0	0,0	1,0	97,0	1,0	1,0	0,0	2,0	95,0	3,0	0,0	0,0
22	2,0	97,0	1,0	0,0	0,0	0,0	98,0	2,0	0,0	0,0	3,0	94,0	2,0	1,0	0,0	2,0	97,0	1,0	0,0	0,0
Lebererkrankungen																				
8	0,0	91,0	6,0	2,0	1,0	0,0	87,0	10,0	2,0	1,0	2,0	84,0	9,0	3,0	2,0	3,0	85,0	7,0	5,0	0,0
10	4,0	92,0	4,0	0,0	0,0	2,0	91,0	5,0	1,0	1,0	1,0	93,0	3,0	3,0	0,0	3,0	88,0	6,0	3,0	0,0
19	8,0	78,5	11,5	2,0	0,0	8,0	85,5	4,5	2,0	0,0										
24	1,0	93,0	6,0	0,0	0,0	2,0	96,0	2,0	0,0	0,0	2,0	97,0	1,0	0,0	0,0	3,0	93,0	3,0	1,0	0,0

Tabelle A7. Amplifikationsanalyse in Kollektiv 1.

Patient	<i>EGFR / Cep7</i>					<i>cMYC / Cep8</i>					<i>Her2 / Cep17</i>					<i>AIB1 / Cep20</i>				
	<1	1	>1	2	>2	<1	1	>1	2	>2	<1	1	>1	2	>2	<1	1	>1	2	>2
Karzinome																				
1	1	74	13	6	6	3	75	12	8	2										
2		88	5	7			85	7	8			92	2	5	1	1	92	1	6	
3	1	99					97	2	1			96	1	2	1		99	1		
25		65	20	12	3	2	18	3	3	74	8	63	19	6	4	15	78	7		
Chr. Pankreatitis																				
5		92	4	4			96	2	2		1	90	2	7			98		2	
7		98	1	1		1	96	2	1			98	2				99	1		
9	2	94	2	1	1		100										99	1		
11	1	97			2		99		1			98		2		2	95	3		
12		99	1				98	1	1			95	2	3		1	91	7	1	
14		94	5	1			97	2	1			97	2	1			100			
15		100					100					98	2			1	97		2	
23		97	1	2			95	1	3	1		94		6			96		4	
Cholecysto- und Choledocholithiasis																				
4		100					95	1	4			97		2	1	2	93	2	3	
6		99		1		1	98		1		1	97	1	1			100			
13		96	4			1	97	1	1			98	1	1		2	98			
16		97	2	1			96	3	1								100			
17		96	3	1													96	2	2	
18		97	2	1			97	1	2			98		2			97	1	2	
20	1	99				1	95		4		1	96		3			96	1	2	1
21		99	1				96	1	3		1	96	1	2			95	3	2	
22		99	1				96	2	2			97		3			98		2	
Lebererkrankungen																				
8		95	5			1	92	4	3			99	1			3	95		2	
10		100					99	1				99	1				97	2	1	
19	4	82	6	8		13	79	3	5											
24		99	1				99		1			95		5		1	95	1	3	

Tabelle A8. Patientenkollektiv 2

Nr	Sex	Alter	Diagnose
Karzinome			
B-1	w	65	Malig. Gallengangsstenose bei oss. und hepat. metast. Mammakarzinom
B-8	m	41	Neuroendokriner Pankreas-Tumor, hepatisch metastasierend
B-9	m	80	Adenokarzinom im Pankreaskopf
B-11	m	58	Pankreas-Adenokarzinom , hepatisch metastasierend
B-14	w	77	Mittelgradiges Pankreaskopfkarzinom
Benigne Erkrankungen			
B-2	m	39	Chronische Pankreatitis mit Gangveränderungen III
B-5	w	72	tubuläres Adenom der Papillenregion
B-7	m	50	Chronische Pankreatitis mit Pseudozyste und Plattenepithelmetaplasie
B-10	m	78	Chronische Pankreatitis, distale Gallengangsstenose
B-12	m	40	Chronische Pankreatitis mit Gangveränderungen III

Tabelle A9. Ploidieanalyse in Kollektiv 2 mit Centromersonden.

Patient	Ploidie Cep7 [%]					Ploidie Cep8 [%]					Ploidie Cep17 [%]					Ploidie Cep20 [%]				
	1	2	3	4	≥5	1	2	3	4	≥5	1	2	3	4	≥5	1	2	3	4	≥5
Karzinome																				
B-1	1	93	6			5	95				7	93				4	96			
B-8	15	76	7	2		3	72	9	10	6	14	82	4			3	77	14	6	
B-9	2	92	6			5	92	3			6	92	2			4	93	3		
B-11	1	98	1				100				7,5	93				2,5	97	1		
B-14	2	70	18	9	1	8	88	2	2		4	76	18	2		1	69	15	12	3
Chronische Pankreatitis																				
B-2	3	96	1			2	97	1			3	95	2			4	95	1		
B-5	2	94	4			1	96	3			2	98				3	96	1		
B-7		96	4			4	95		1		2	97	1			2	97	1		
B-10	1	92	7			2	96	2,5			13	86	1			3	97			
B-12	3	96	1			1	98	1			1	99				3	96	1		
B-13	1	97	1	1		2	98				7	93				2	98			

Tabelle A10. Ploidieanalyse in Kollektiv 2 mit Locus-spezifischen Sonden.

Patient	Ploidie <i>EGFR</i> [%]					Ploidie <i>cMYC</i> [%]					Ploidie <i>Her2</i> [%]					Ploidie <i>AIB1</i> [%]				
	1	2	3	4	≥5	1	2	3	4	≥5	1	2	3	4	≥5	1	2	3	4	≥5
Karzinome																				
B-1	1,0	91,0	7,0	0,0	1,0	1,5	97,5	1,0	0,0	0,0	3,5	96,5	0,0	0,0	0,0	1,5	97,5	1,0	0,0	0,0
B-8	10,0	79,0	3,0	7,0	1,0	1,0	75,0	8,0	10,0	6,0	8,0	84,0	8,0	0,0	0,0	1,0	76,0	11,0	11,0	1,0
B-9	1,0	93,0	6,0	0,0	0,0	2,7	94,0	3,3	0,0	0,0	4,0	94,0	2,0	0,0	0,0	2,0	93,0	5,0	0,0	0,0
B-11	1,0	97,0	2,0	0,0	0,0	0,0	98,0	2,0	0,0	0,0	4,0	94,5	1,5	0,0	0,0	0,0	97,0	2,5	0,5	0,0
B-14	2,0	68,0	16,0	11,0	3,0	1,2	47,5	2,5	3,8	45,0	0,0	75,0	22,0	1,0	2,0	1,0	67,0	12,0	17,0	3,0
Chronische Pankreatitis																				
B-2	2,0	95,0	3,0	0,0	0,0	0,0	91,0	7,0	2,0	0,0	0,5	97,5	2,0	0,0	0,0	3,0	93,0	4,0	0,0	0,0
B-5	1,0	95,0	4,0	0,0	0,0	0,0	98,0	2,0	0,0	0,0	2,0	95,0	2,0	1,0	0,0	1,0	99,0	0,0	0,0	0,0
B-7	0,0	95,0	5,0	0,0	0,0	1,0	95,0	3,0	1,0	0,0	0,0	95,0	5,0	0,0	0,0	1,0	97,0	2,0	0,0	0,0
B-10	1,0	90,0	8,5	0,0	0,5	1,0	95,0	4,0	0,0	0,0	2,0	96,0	2,0	0,0	0,0	0,0	98,0	1,0	1,0	0,0
B-12	2,0	95,0	3,0	0,0	0,0	1,0	96,0	2,0	1,0	0,0	2,0	96,5	1,5	0,0	0,0	2,0	98,0	0,0	0,0	0,0
B-13	0,5	97,0	1,5	1,0	0,0	1,0	99,0	0,0	0,0	0,0	1,0	99,0	0,0	0,0	0,0	1,0	97,0	2,0	0,0	0,0

Tabelle A11. Amplifikationsanalyse in Kollektiv 2.

Patient	<i>EGFR</i> / Cep7					<i>cMYC</i> / Cep8					<i>Her2</i> / Cep17					<i>AIB1</i> / Cep20				
	<1	1	>1	2	>2	<1	1	>1	2	>2	<1	1	>1	2	>2	<1	1	>1	2	>2
Karzinome																				
B-1		98	1		1		97		3			97		3			95	2	3	
B-8	1	87	3	9		5	90	3	2			92	2	4	2		90	7	3	
B-9	1	97	1	1			98	2			1	96	1	2			97	1	1	1
B-11		98	2			0,5	97	1	1	0,5		88	1	11			95	1	4	
B-14	1	92	5	2			50	1	4	45	2	89	4	3	2	2	93	3	2	1
Chr. Pankreatitis																				
B-2		97	2	1			90	6	4			97		3			97	2	1	
B-5		99		1		1	98	1				97	2	1		2	95		3	
B-7		99	1				94	3	3			95	3	1	1		97	2	1	
B-10		99	1				98	2				95	1,5	3,5			95,5	1,5	3	
B-12		97	2	1			98	1	1			99	1				99	1		
B-13		99		1			99		1			94		5			97		3	

8 Literaturverzeichnis

Abraham SC, Wilentz RE, Yeo CJ, Sohn TA, Cameron JL, Boitnott JK, Hruban RH (2003) Pancreaticoduodenectomy (Whipple resections) in patients without malignancy: are they all 'chronic pancreatitis'? *Am J Surg Pathol.* **27**: 110-120.

Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, Redston MS, DePinho RA (2003) Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* **17**(24): 3112-3126.

Ahrendt SA und Pitt HA (2002) Surgical management of pancreatic cancer. *Oncology* **16**: 725-734.

Andea A, Sarkar F, Adsay VN (2003) Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol.* **16**: 996-1006.

Apple SK, Hecht JR, Lewin DN, Jahromi SA, Grody WW, Nieberg RK (1999) Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53, and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis. *Hum Pathol.* **30**(2): 123-129.

Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* **277**(5328):965-968.

Bardeesy N und DePinho RA (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* **2**(12): 897-909.

Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng KH, Lopez LV, Hezel AF, Feng B, Brennan C, Weissleder R, Mahmood U, Hanahan D, Redston MS, Chin L, Depinho RA (2006) Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *PNAS USA* **103**(15): 5947-5952.

Barr Fritcher EG, Kipp BR, Slezak JM, Moreno-Luna LE, Gores GJ, Levy MJ, Roberts LR, Halling KC, Sebo TJ (2007) Correlating routine cytology, quantitative nuclear morphometry by digital image analysis, and genetic alterations by fluorescence in situ hybridization to assess the sensitivity of cytology for detecting pancreatobiliary tract malignancy. *Am J Clin Pathol.* **128**(2): 272-279.

Baumgart M, Heinmöller E, Horstmann O, Becker H, Ghadimi BM (2005) The genetic basis of sporadic pancreatic cancer. *Cell Oncol.* **27**(1): 3-13.

Berger DH, Chang H, Wood M, Huang L, Heath CW, Lehman T, Ruggeri BA (1999) Mutational activation of K-ras in nonneoplastic exocrine pancreatic lesions in relation to cigarette smoking status. *Cancer* **85**(2): 326-332.

Bergquist A, Lindberg B, Castro J, Tribukait B (2004) Methodologic aspects of evaluating brush samples from biliary strictures by cytology and DNA flow cytometry. *Acta Cytol.* **48**(3): 341-347.

- Boadas J, Mora J, Urgell E, Puig P, Roca M, Cussó X, Capellà G, Lluís F, Farré A** (2001) Clinical usefulness of K-ras gene mutation detection and cytology in pancreatic juice in the diagnosis and screening of pancreatic cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **13**(10): 1153-1159.
- Bouras T, Southey MC, Venter DJ** (2001) Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res.* **61**(3): 903-907.
- Brat DJ, Lillemoe KD, Yeo CJ, Warfield PB, Hruban RH** (1998) Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Surg Pathol.* **22**: 163-169.
- Brembeck FH, Schreiber FS, Deramautd TB, Craig L, Rhoades B, Swain G, Grippo P, Stoffers DA, Silberg DG, Rustgi AK** (2003) The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice. *Cancer Res.* **63**(9): 2005-2009.
- Brentnall TA, Bronner MP, Byrd DR** (1999) Early diagnosis and treatment of pancreatic dysplasia in patients with a family history of pancreatic cancer. *Ann Intern Med.* **131**: 247–255.
- Brockie E, Anand A, Albores-Saavedra J** (1998) Progression of atypical ductal hyperplasia/carcinoma in situ of the pancreas to invasive adenocarcinoma. *Ann Diagn Pathol.* **2**: 286-292.
- Canto MI, Goggins M, Yeo CJ** (2004) Screening for pancreatic neoplasia in high risk individuals. *Clin Gastro Hepatol.* **2**: 606–621.
- Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W, Rutter JL, Buckler A, Gabrielson E, Tockman M, Cho KR, Hedrick L, Bova GS, Isaacs W, Koch W, Schwab D, Sidranski D** (1995) Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genetics* **11**: 210-212.
- Chen CH, Tseng Lj, Yang CC, Yeh YH, Mo LR** (2001) The accuracy of endoscopic ultrasound, endoscopic retrograde cholangiopancreato-graphy, computed tomography, and transabdominal ultrasound in the detection and staging of primary ampullary tumors. *Hepatogastroenterol.* **48**: 1750-1753.
- Comfort MW und Steinberg AG** (1952) Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterol.* **21**:54-63.
- Cubilla AL und Fitzgerald PJ** (1976) Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. *Cancer Res.* **36**(7.2): 2690-2698.
- Dai JL, Turnacioglu KK, Schutte M, Sugar AY und Kern SE** (1998) Dpc4 transcriptional activation and dysfunction in cancer cells. *Cancer Res.* **58**(20): 4592-4597.
- Day JD, Diguseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN, Kern SE, Hruban RH** (1996) Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol.* **27**(2): 119-124.
- DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA** (1999) AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association. *Gastroenterol.* **117**: 1464–1484.

- Duesberg P** (2005) Does aneuploidy or mutation start cancer? *Science* **307**(5706): 41.
- Duesberg P und Li R** (2003) Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* **2**(3): 202-210.
- Esposito I, Seiler C, Bergmann F, Kleeff J, Friess H, Schirmacher P** (2007) Hypothetical progression model of pancreatic cancer with origin in the centroacinar-acinar compartment. *Pancreas* **35**(3): 212-217.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG** (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* **61**(8):3225-3229.
- Farrell JJ, van Rijnsoever M, Elsaleh H** (2005) Early detection markers in Pancreas Cancer. *Cancer Biomark.* **1**(2-3):157-175.
- Ferrone CR, Finkelstein DM, Thayer SP, Muzikansky A, Fernandez-delCastillo C, Warshaw AL** (2006) Perioperative CA19-9 levels can predict stage and survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* **24**: 2897-2902.
- Friess H, Berberat P, Schilling M, Kunz J, Korc M und Buchler MW** (1996) Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors. *J Mol Med.* **74**(1): 35–42.
- Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M** (2002) Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Pathol.* **160**: 1573–1581.
- Fukushima N, Walter KM, Uek T, Sato N, Matsubayashi H, Cameron JL, Hruban RH, Canto M, Yeo CJ, Goggins M** (2003) Diagnosing pancreatic cancer using methylation specific PCR analysis of pancreatic juice. *Cancer Biol Ther.* **2**(1): 78-83.
- Gansauge S, Schmid RM, Muller J, Adler G, Mattfeldt T, Beger HG** (1998) Genetic alterations in chronic pancreatitis: evidence for early occurrence of p53 but not K-ras mutations. *Br J Surg.* **85**(3): 337-340.
- Geigl JB, Langer S, Barwisch S, Pflieger K, Lederer G, Speicher MR** (2004) Analysis of gene expression patterns and chromosomal changes associated with aging. *Cancer Res.* **64**(23): 8550-8557.
- Gerdes B, Ramaswamy A, Kersting M, Ernst M, Lang S, Schuermann M, Wild A, Bartsch DK** (2001) P16INK4a alterations in chronic pancreatitis – indicator for high-risk lesions for pancreatic cancer. *Surgery* **129**: 490-497.
- Ghadimi BM, Schrock E, Walker RL, Wangsa D, Jauho A, Meltzer PS, Ried T** (1999) Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol.* **154**(2): 525-536.
- Ghadimi BM, Horstmann O, Jacobsen K, Feth J und Becker H** (2002) Delay of Diagnosis in Pancreatic Cancer Due to Suspected Symptomatic Cholelithiasis. *Scand J Gastroenterol.* **12**: 1437-1439.

Gisselsson D, Pettersson L, Höglund M, Heidenblad M, Gorunova L, Wiegant J, Mertens F, Dal Cin P, Mitelman F, Mandahl N (2000) Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *PNAS USA* **97**(10): 5357-5362.

Gisselsson D, Jonson T, Petersén A, Strömbeck B, Dal Cin P, Höglund M, Mitelman F, Mertens F, Mandahl N (2001) Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *PNAS USA* **98**(22): 12683-12688.

Glasbrenner B, Ardan M, Boeck W, Preclik G, Möller P, Adler G (1999) Prospective evaluation of brush cytology of biliary strictures during endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Endoscopy* **31**: 712-717.

Gnanapragasam VJ, Leung HY, Pulimood AS, Neal DE, Robson CN (2001) Expression of RAC 3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer. *Br J Cancer* **85**(12): 1928-36.

Goggins M, Schutte M, Lu J, Moskaluk CA, Weinstein CL, Petersen GM, Yeo CJ, Jackson CE, Lynch HT, Hruban RH und Kern SE (1996) Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* **56**(23): 5360-5364.

Goggins M, Hruban RH und Kern SE (2000) BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol.* **156**(5): 1767-1771.

Goggins M (2007) Identifying molecular markers for the early detection of pancreatic neoplasia. *Semin Oncol.* **34**(4): 303-310.

Gorunova L, Höglund M, Andrén-Sandberg A, Dawiskiba S, Jin Y, Mitelman F, Johansson B (1998) Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations. *Gen Chrom Canc.* **23**(2): 81-99.

Grandori C und Eisenman RN (1997) Myc target genes. *TIBS* **22**(5): 177-181.

Gress TM (2004) Molecular diagnosis of pancreatobiliary malignancies in brush cytologies of biliary strictures. *Gut* **53**(12): 1860-1865.

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

Grippo PJ, Nowlin PS, Demeure MJ, Longnecker DS, Sandgren EP (2003) Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice. *Cancer Res.* **63**(9):2016-2019.

Gronborg M, Bunkenborg J, Kristiansen TZ, Jensen ON, Yeo CJ, Hruban RH, Maitra A, Goggins MG, Pandey A (2004) Comprehensive proteomic analysis of human pancreatic juice. *J Proteome Res.* **3**(5): 1042-1055.

Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Pérez-Gallego L, Dubus P, Sandgren EP, Barbacid M (2007) Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* **2007** **11**(3): 291-302.

Gysin S, Rickert P, Kastury K, McMahon M (2005) Analysis of genomic DNA alterations and mRNA expression patterns in a panel of human pancreatic cancer cell lines. *Gen Chrom Canc.* **44**(1): 37-51.

Habermann JK, Paulsen U, Roblick UJ, Upender MB, McShane LM, Korn EL, Wangsa D, Krüger S, Duchrow M, Bruch HP, Auer G, Ried T (2007) Stage-specific alterations of the genome, transcriptome, and proteome during colorectal carcinogenesis. *Gen Chrom Canc.* **46**(1): 10-26.

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

Hainaut P und Hollstein M (2000) p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res.* **77**: 81-137.

Han H, Bearss DJ, Browne LW, Calaluce R, Nagle RB, Von Hoff DD (2002) Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res.* **62**(10): 2890-2896.

Harada T, Okita K, Shiraishi K, Kusano N, Kondoh S, Sasaki K (2002) Interglandular cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization in pancreatic cancer. *Cancer Res.* **62**(3): 835-839.

Harada T, Chelala C, Bhakta V, Chaplin T, Caulee K, Baril P, Young BD, Lemoine NR (2008) Genome-wide DNA copy number analysis in pancreatic cancer using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene* **27**(13): 1951-1960.

Haroske G, Giroud F, Reith A (1998) 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry: Part I. Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation -- European Society for Analytical Cellular Pathology. *Anal Cell Pathol.* **17**: 189-200.

Hedley DW (1983) *J Histochem Cytochem.* **31**: 1333-1335.

Heinmöller E, Dietmaier W, Zirngibl H, Heinmöller P, Scaringe W, Jauch KW, Hofstadter F und Rüschoff J (2000) Molecular analysis of microdissected tumors and preneoplastic intraductal lesions in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol.* **157**(1): 83-92.

Heinmöller E (2006) Charakterisierung frühester genetischer Veränderungen im Karzinogeneseprozess beim duktalem Pankreaskarzinom unter Zuhilfenahme optimierter molekulargenetischer Techniken an kleinen Zellpopulationen und Einzelzellen. Habilitationsschrift, Philipps Universität Marburg.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997) TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**(6659): 465-471.

Henke RT, Haddad BR, Kim SE, Rone JD, Mani A, Jessup JM, Wellstein A, Maitra A, Riegel AT (2004) Overexpression of the nuclear receptor coactivator AIB1 (SRC-3) during progression of pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* **10**(18 Pt 1): 6134-6142.

Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, DePinho RA (2006) Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Dev.* **20**: 1218-1249.

Hilgers W und Kern SE (1999) Molecular genetic basis of pancreatic adenocarcinoma. *Gen Chrom Canc.* **26**(1): 1-12.

Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**(6): 437-450.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA (2005) Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**(5): 469-483.

Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE (2000) Progression model for pancreatic cancer. *Clin Canc Res.* **6**: 2969-2972.

Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJ (2001) Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol.* **25**(5): 579-586.

Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Anver MR, Biankin AV, Boivin GP, Furth EE, Furukawa T, Klein A, Klimstra DS, Klöppel G, Lauwers GY, Longnecker DS, Lüttges J, Maitra A, Offerhaus GJ, Pérez-Gallego L, Redston M, Tuveson DA (2006) Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res.* **66**(1): 95-106.

Hruban RH, Pitman MB, Klimstra DS (2007) AFIP atlas of tumor pathology, series IV. Tumors of the pancreas. Washington (DC): American Registry of Pathology.

Ibelgaufts H (1990) Gentechnologie von A bis Z. *VCH Verlagsgesellschaft mbH*, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.

Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Fujitani Y, Fujitani S, Wright CV, Moses HL (2006) Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev.* **20**(22): 3147-3160.

Ishii A, Nakamura K, Kishimoto H, Honma N, Aida J, Sawabe M, Arai T, Fujiwara M, Takeuchi F, Kato M, Oshimura M, Izumiyama N, Takubo K (2006) Telomere shortening with aging in the human pancreas. *Exp Gerontol.* **41**(9): 882-886.

Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S, Nakaizumi A, Uehara H, Kitamura T, Kuroda C (1999) Minute carcinoma of the pancreas measuring 1 cm or less in diameter--collective review of Japanese case reports. *Hepatogastroenterol.* **46**: 8-15.

Jhala NC, Jhala DN, Chhieng DC, Eloubeidi MA und Eltoum IA (2003) Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. A cytopathologist's perspective. *Am J Clin Pathol.* **120**: 351-367

Kastan MB, Canman CE und Leonard CJ (1995) P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **14**(1): 3-15.

- Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW und Vogelstein B** (1992) Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* **256**(5058): 827-830.
- Kern S, Hruban R, Hollingsworth MA, Brand R, Adrian TE, Jaffee E, Tempero MA** (2001) A white paper: the product of a pancreas cancer think tank. *Cancer Res.* **61**(12): 4923-32.
- Kilic M, Gocmen E, Tez M, Ertan T, Keskek M, Koc M** (2006) Value of preoperative serum CA 19-9 levels in predicting resectability for pancreatic cancer. *Can J Surg.* **49**: 241-244.
- Kimura W** (2003) How many millimetres do atypical epithelia of the pancreas spread intraductally before beginning to infiltrate? *Hepatogastroenterol.* **50**(54): 2218-2224.
- Kipp BR, Stadheim LM, Halling SA, Pochron NL, Harmsen S, Nagorney DM, Sebo TJ, Therneau TM, Gores GJ, de Groen PC, Baron TH, Levy MJ, Halling KC, Roberts LR** (2004) A comparison of routine cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of malignant bile duct strictures. *Am J Gastroenterol.* **99**(9): 1675-1681.
- Klöpffel G, Bommer G, Ruckert K, Seifert G** (1980) Intraductal proliferation in the pancreas and its relationship to human and experimental carcinogenesis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* **387**(2): 221-233.
- Ko LJ und Prives C** (1996) p53: puzzle and paradigm, *Genes Dev.* **10**(9): 1054-1072.
- Kondo H, Sugano K, Fukayama N, Hosokawa K, Ohkura H, Ohtsu A, Mukai K, Yoshida S** (1997) Detection of K-ras gene mutations at codon 12 in the pancreatic juice of patients with intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. *Cancer* **79**(5): 900-905.
- Koopmann J, Buckhaults P, Brown DA** (2004) Serum Macrophage Inhibitory Cytokine 1 as a Marker of Pancreatic and other Periampullary Cancers. *Clin Canc Res.* **10**: 2386-2392.
- Kozuka S, Sassa R, Taki T, Masamoto K, Nagasawa S, Saga S, Hasegawa K, Takeuchi M** (1979) Relation of pancreatic duct hyperplasia to carcinoma. *Cancer* **43**(4): 1418-1428
- Lamerz R** (1999) Role of tumour markers, cytogenetics. *Ann Oncol.* **10**(Suppl 4): 145-149.
- Lane DP** (1992) p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-16.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B** (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**(6625): 623-627.
- Li D** (2001) Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *Cancer J.* **7**: 259-265.
- Li D, Firozi PF, Zhang W, Shen J, DiGiovanni J, Lau S, Evans D, Friess H, Hassan M, Abbruzzese JL** (2002) DNA adducts, genetic polymorphisms, and K-ras mutation in human pancreatic cancer. *Mutat Res.* **513**: 37-48.
- Li H und Chen JD** (1998) The receptor-associated coactivator 3 activates transcription through CREB-binding protein recruitment and autoregulation. *J Biol Chem.* **273**(10): 5948-5954.
- Li YJ und Ji XR** (2003) Relationship between the expression of beta-cat, cyclin D1 and c-myc and the occurrence and biological behaviour of pancreatic cancer. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* **32**(3): 238-241.

- Liang JJ, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, Tan D** (2009) Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* **2**: 1-10.
- Lindberg B, Arnelo U, Bergquist A, Thörne A, Hjerpe A, Granqvist S, Hansson LO, Tribukait B, Persson B, Broomé U** (2002) Diagnosis of biliary strictures in conjunction with endoscopic retrograde cholangiopancreatography, with special reference to patients with primary sclerosing cholangitis. *Endoscopy* **34**: 909–916.
- Lindberg B, Enochsson L, Tribukait B, Arnelo U, Bergquist A** (2006) Diagnostic and prognostic implications of DNA ploidy and S-phase evaluation in the assessment of malignancy in biliary strictures. *Endoscopy* **38**(6): 561-565.
- Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr.** (2006) ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol.* **24**: 5313-5327.
- Löhr M, Müller P, Mora J, Brinkmann B, Ostwald C, Farré A, Lluis F, Adam U, Stubbe J, Plath F, Nizze H, Hopt UT, Barten M, Capellá G, Liebe S** (2001) p53 and K-ras mutations in pancreatic juice samples from patients with chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc.* **53**(7): 734-743.
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, DiMagna EP, Andren-Sandberg A, Domellöf L** (1993) Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med.* **328**: 1433-1437.
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagna EP, Elitsur Y, Gates LK Jr., Perrault J, Whitcomb D** (1997) Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst.* **89**: 442-446.
- Lüttges J, Reinecke-Luthge A, Mollmann B, Menke MA, Clemens A, Klimpfinger M, Sipos B, Klöppel G** (1999) Duct changes and K-ras mutations in the disease-free pancreas: analysis of type, age relation and spatial distribution. *Virchows Arch.* **435**(5): 461-468.
- Lüttges J, Diederichs A, Menke MA, Vogel I, Kremer B, Klöppel G** (2000) Ductal lesions in patients with chronic pancreatitis show K-ras mutations in a frequency similar to that in the normal pancreas and lack nuclear immunoreactivity for p53. *Cancer* **88**(11): 2495-2504.
- Lüttges J, Galehdari H, Brocker V, Schwarte-Waldhoff I, Henne-Bruns D, Klöppel G, Schmiegel W und Hahn SA** (2001) Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* **158**(5): 1677-1683.
- Mahlamäki EH, Hoglund M, Gorunova L, Karhu R, Dawiskiba S, Andren-Sandberg A, Kallioniemi OP, Johansson B** (1997) Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Gen Chrom Canc.* **20**(4): 383-391.
- Mahlamäki EH, Bärlund M, Tanner M, Gorunova L, Höglund M, Karhu R, Kallioniemi A** (2002) Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Gen Chrom Canc.* **35**(4): 353-358.
- Mahlamäki EH, Kauraniemi P, Monni O, Wolf M, Hautaniemi S und Kallioniemi A** (2004) High-Resolution Genomic and Expression Profiling Reveals 105 Putative Amplification Target Genes in Pancreatic Cancer. *Neoplasia* **6**(5): 432 – 439.

- Mansfield JC, Griffin SM, Wadehra V, Matthewson K** (1997) A prospective evaluation of cytology from biliary strictures. *Gut* **40**:671–677.
- McCarthy DM, Brat DJ, Wilentz RE, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH** (2001) Pancreatic intraepithelial neoplasia and infiltrating adenocarcinoma: analysis of progression and recurrence by DPC4 immunohistochemical labeling. *Hum Pathol.* **32**: 638-642.
- Means AL, Meszoely IM, Suzuki K, Miyamoto Y, Rustgi AK, Coffey RJ Jr, Wright CV, Stoffers DA, Leach SD** (2005) Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development* **132**(16): 3767-3776.
- Menssen A und Hermeking H** (2002) Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *PNAS USA* **99**(9): 5757-5759.
- Michor F, Iwasa Y, Nowak MA** (2004) Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer* **4**: 197-205.
- Morales CP, Burdick JS, Saboorian MH, Wright WE, Shay JW** (1998) In situ hybridization for telomerase RNA in routine cytologic brushings for the diagnosis of pancreaticobiliary malignancies. *Gastrointest Endosc.* **48**: 402–405.
- Moreno Luna LE, Kipp B, Halling KC, Sebo TJ, Kremers WK, Roberts LR, Barr Fritcher EG, Levy MJ, Gores GJ** (2006) Advanced cytologic techniques for the detection of malignant pancreatobiliary strictures. *Gastroenterol.* **131**(4): 1064-1072.
- Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE** (1997) p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* **57**: 2140-2143.
- Moskovitz AH, Linford NJ, Brentnall TA, Bronner MP, Storer BE, Potter JD, Bell RH Jr, Rabinovitch PS** (2003) Chromosomal instability in pancreatic ductal cells from patients with chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Gen Chrom Canc.* **37**(2): 201-206.
- Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih leM, Vogelstein B, Lengauer C** (2002) The role of chromosomal instability in tumor initiation. *PNAS USA* **99**(25): 16226-16231.
- Ohuchida K, Mizumoto K, Ogura Y, Ishikawa N, Nagai E, Yamaguchi K, Tanaka M** (2005) Quantitative assessment of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA levels in pancreatic juice samples for the diagnosis of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* **11**(6): 2285-2292.
- Oster SK, Ho CS, Soucie EL, Penn LZ** (2002) The myc oncogene: Marvelously Complex. *Adv Cancer Res.* **84**: 81-154.
- Pasca di Magliano M, Sekine S, Ermilov A, Ferris J, Dlugosz AA, Hebrok M** (2006) Hedgehog/Ras interactions regulate early stages of pancreatic cancer. *Genes Dev.* **20**(22): 3161-3173.
- Phillips JL, Hayward SW, Wang Y, Vasselli J, Pavlovich C, Padilla-Nash H, Pezullo JR, Ghadimi BM, Grossfeld GD, Rivera A, Linehan WM, Cunha GR, Ried T** (2001) The consequences of chromosomal aneuploidy on gene expression profiles in a cell line model for prostate carcinogenesis. *Cancer Res.* **61**(22): 8143-8149.

- Pihan GA, Wallace J, Zhou Y, Doxsey SJ** (2003) Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res.* **63**(6): 1398-1404.
- Pour PM und Morohoshi T** (1994) Ductal Adenocarcinoma. Atlas of Exocrine Pancreatic Tumors. *Springer*, 117-154.
- Poch B, Gansauge F, Schwarz A, Seufferlein T, Schnelldorfer T, Ramadani M, Beger HG und Gansauge S** (2001) Epidermal growth factor induces cyclin D1 in human pancreatic carcinoma: evidence for a cyclin D1-dependent cell cycle progression, *Pancreas* **23**(3): 280-287.
- Postier RG, Lerner MR, Lightfoot SA, Vannarath R, Lane MM, Hanas JS, Brackett DJ** (2003) DNA ploidy and markovian analysis of neoplastic progression in experimental pancreatic cancer. *J Histochem Cytochem.* **51**(3): 303-309.
- Rajagopalan H und Lengauer C** (2004) Aneuploidy and cancer. *Nature* **432**(7015): 338-341.
- Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schröck E, Heselmeyer K, du Manoir S, Auer G** (1996) Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Gen Chrom Canc.* **15**(4): 234-245.
- Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schröck E, Auer G** (1999) Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Gen Chrom Canc.* **25**(3): 195-204.
- Rivera JA, Rall CJ, Graeme-Cook F, Fernandez-del Castillo C, Shu P, Lakey N, Tepper R, Rattner DW, Warshaw AL, Rustgi AK** (1997) Analysis of K-ras oncogene mutations in chronic pancreatitis with ductal hyperplasia. *Surgery* **121**(1): 42-49.
- Robert-Koch-Institut** (2008) Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg), Berlin.
- Rosty C und Goggins M** (2002) Early detection of pancreatic carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* **16**: 37–52.
- Rosty C, Geradts J, Sato N, Wilentz RE, Roberts H, Sohn T, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M** (2003) p16 Inactivation in pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs) arising in patients with chronic pancreatitis. *Am J Surg Pathol.* **27**: 1495-1501.
- Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ und Kern SE** (1997) Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* **57**(9): 1731-1734.
- Ruggeri BA, Huang L, Wood M, Cheng JQ und Testa JR** (1998) Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol Carcinog.* **21**(2): 81–86.
- Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, Fujita Y, Nakanishi M, Masuda K, Kimura A, Nakamura Y, Inazawa J, Abe T, Yamagishi H** (2000) Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int J Cancer* **89**(3): 217-223.

- Safran H, Steinhoff M, Mangray S, Rathore R, King TC, Chai L, Berzein K, Moore T, Iannitti D, Reiss P, Pasquariello T, Akerman P, Quirk D, Mass R, Goldstein L, Tantravahi U** (2001) Overexpression of the HER-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol.* **24**(5): 496-499.
- Sato N, Mizumoto K, Nakamura M, Nakamura K, Kusumoto M, Niiyama H, Ogawa T, Tanaka M** (1999) Centrosome abnormalities in pancreatic ductal carcinoma. *Clin Cancer Res.* **5**(5): 963-970.
- Sato N, Mizumoto K, Nakamura M, Maehara N, Minamishima YA, Nishio S, Nagai E, Tanaka M** (2001) Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells. *Canc Genet Cytogenet.* **126**(1): 13-19.
- Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M** (2003a) Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res.* **63**(13): 3735-3742.
- Sato N, Maitra A, Fukushima N, van Heek NT, Matsubayashi H, Iacobuzio-Donahue CA, Rosty C, Goggins M** (2003b) Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.* **63**(14): 4158-4166.
- Sato N, Fukushima N, Hruban RH, Goggins M** (2008) CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol.* **21**(3): 238-44.
- Schlake G, Liu Q, Heinmöller E, Hill KA, Weiss L, Sommer SS** (2003) Single-cell immunohistochemical mutation load assay (SCIMLA) using human paraffin-embedded tissues. *Environ Mol Mutagen.* **42**(3): 206-215.
- Schleger C, Arens N, Zentraf H, Bleyl U, Verbeke C** (2000) Identification of frequent chromosomal aberrations in ductal adenocarcinoma of the pancreas by comparative genomic hybridisation (CGH). *J Pathol.* **191**: 27-32.
- Schleger C, Verbeke C, Hildenbrand R, Zentgraf H, Bleyl U** (2002) c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance. *Mod Pathol.* **15**(4): 462-469.
- Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L and Bold RJ** (2003) Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Brit J Cancer* **89**: 2110-2115.
- Schulte E und Wittekind D** (1989) Standardization of the Feulgen-Schiff technique: Staining characteristics of pure fuchsin dyes; a cytophotometric investigation. *Histochemist.* **91**: 321-331.
- Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE und Herman JG** (1997) Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* **57**(15): 3126-3130.
- Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Luttes J, Kloppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A und Schmiegel W** (2000) Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *PNAS USA* **97**(17): 9624-9629.

Sears RJ, Duckworth CW, Decaestecker C, Bourgeois N, Ledent T, Deviere J, Salmon I, Kiss R, Yeaton P (1998) Image cytometry as a discriminatory tool for cytologic specimens obtained by endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Cancer* **84**(2): 119-126.

Seki K, Suda T, Aoyagi Y, Sugawara S, Natsui M, Motoyama H, Shirai Y, Sekine T, Kawai H, Mita Y, Waguri N, Kuroiwa T, Igarashi M, Asakura H (2001) Diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in pancreatic juice with sample qualification. *Clin Cancer Res.* **7**(7):1976-81.

Selvaggi SM (2004) Biliary brushing cytology. *Cytopathol.* **15**:74–79.

Sherr CJ (2001) The INK4A/ARF network in tumor suppression, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 731-737.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**(4785): 177-182.

Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, King W (2000) The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn.* **2**(3): 116-123.

Soldini D, Gugger M, Burckhardt E, Kappeler A, Laissue JA und Mazzucchelli L (2003) Progressive genomic alterations in intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas and morphologically similar lesions of the pancreatic ducts. *J Pathol.* **199**: 453–461.

Solinas-Toldo S, Wallrapp C, Muller-Pillasch F, Bentz M, Gress T, Lichter P (1996) Mapping of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* **56**(16): 3803-7.

Sommers SC, Murphy SA, Warren S (1954) Pancreatic duct hyperplasia and cancer. *Gastroenterol.* **27**(5): 629-640.

Stanger BZ, Stiles B, Lauwers GY, Bardeesy N, Mendoza M, Wang Y, Greenwood A, Cheng KH, McLaughlin M, Brown D, Depinho RA, Wu H, Melton DA, Dor Y (2005) Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas. *Cancer Cell* **8**(3): 185-195.

Steinberg W (1990) The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol.* **85**: 350–355.

Sturm PD, Hruban RH, Ramsoekh TB (1998) The potential diagnostic use of K-ras codon 12 and p53 alterations in brush cytology from the pancreatic head region. *J Pathol.* **186**: 247–253.

Suen CS, Berrodin TJ, Mastroeni R, Cheskis BJ, Lyttle CR, Frail DE (1998) A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J Biol Chem.* **273**(42): 27645-27653.

Takaori K, Matsusue S, Fujikawa T, Kobashi Y, Ito T, Matsuo Y, Oishi H, Takeda H (1998) Carcinoma in situ of the pancreas associated with localized fibrosis: a clue to early detection of neoplastic lesions arising from pancreatic ducts. *Pancreas* **17**: 102-105.

- Takaori K, Kobashi Y, Matsusue S, Matsui K, Yamamoto T** (2003) Clinicopathological features of pancreatic intraepithelial neoplasias and their relationship to intraductal papillary-mucinous tumors. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* **10**: 125-136.
- Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N** (2004) Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas* **28**: 257-262.
- Tang ZH, Zou SQ, Hao YH, Wang BJ, Yang XP, Chen QQ, Qiu FZ** (2002) The relationship between loss expression of DPC4/Smad4 gene and carcinogenesis of pancreatobiliary carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* **1**: 624-629.
- Tanno S, Tanno S, Mitsuuchi Y, Altomare DA, Xiao GH, Testa JR** (2001) AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* **61**(2): 589–593.
- Tascilar M, Skinner HG, Rosty C** (2001) The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* **7**: 4115–4121.
- Tobita K, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Ohtani Y, Oida Y, Yamazaki H, Nakamura M, Ueyama Y, Tanaka M, Inokuchi S, Makuuchi H** (2003) Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis. *Int J Mol Med.* **11**(3): 305-309.
- Tsuchiya R, Tajima Y, Matsuzaki S, Onizuka S, Kanematsu T** (2001) Early pancreatic cancer. *Pancreatol* **1**: 597-603.
- Tuveson DA, Zhu L, Gopinathan A, Willis NA, Kachatrian L, Grochow R, Pin CL, Mitin NY, Taparowsky EJ, Gimotty PA, Hruban RH, Jacks T, Konieczny SF** (2006) Mist1-KrasG12D knock-in mice develop mixed differentiation metastatic exocrine pancreatic carcinoma and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **66**(1): 242-247.
- Uchida N, Kamada H, Tsutsui K, Ono M, Aritomo Y, Masaki T, Kushida Y, Haba R, Nakatsu T, Kuriyama S** (2007) Utility of pancreatic duct brushing for diagnosis of pancreatic carcinoma. *J Gastroenterol.* **42**(8): 657-662.
- Uehara H, Nakaizumi A, Baba M, Iishi H, Tatsuta M, Kitamura T, Ohigashi H, Ishikawa O, Takenaka A, Ishiguro S** (1996) Diagnosis of pancreatic cancer by K-ras point mutation and cytology of pancreatic juice. *Am J Gastroenterol.* **91**(8):1616-1621.
- Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M** (2000) Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* **60**: 1835–1839.
- Ueki T, Toyota M, Skinner H, Walter KM, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M** (2001) Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* **61**: 8540–8546.
- Upender MB, Habermann JK, McShane LM, Korn EL, Barrett JC, Difilippantonio MJ, Ried T** (2004) Transfer induced aneuploidy results in complex dysregulation of the cellular transcriptome in immortalized and cancer cells. *Cancer Res.* **64**(19): 6941-6949.
- van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, Offerhaus GJ, Hicks JL, Wilentz RE, Goggins MG, De Marzo AM, Hruban RH, Maitra A** (2002) Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol.* **161**(5): 1541-1547.

- Verdoodt B, Charlette I, Maillet B, Kirsch-Volders M** (1997) Numerical aberrations of chromosomes 1 and 17 in tumor cell lines of the exocrine pancreas as determined by fluorescence in situ hybridization. *Canc Genet Cytogenet.* **94**(2): 125-130.
- Venkitaraman AR** (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**(2): 171–182.
- Vogelstein B und Kinzler KW** (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **9**(4): 138-141.
- Volmar KE, Vollmer RT, Routbort MJ, Creager AJ** (2006) Pancreatic and bile duct brushing cytology in 1000 cases: review of findings and comparison of preparation methods. *Cancer* **108**(4): 231-8.
- Wang Y, Yamaguchi Y, Watanabe H, Ohtsubo K, Motoo Y, Sawabu N** (2004) Detection of p53 gene mutations in the supernatant of pancreatic juice and plasma from patients with pancreatic carcinomas. *Pancreas* **28**(1): 13-19.
- Watanabe H, Ha A, Hu YX, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Motoo Y, Okai T, Toya D, Tanaka N, Sawabu N** (1999) K-ras mutations in duodenal aspirate without secretin stimulation for screening of pancreatic and biliary tract carcinoma. *Cancer* **86**(8):1441-8.
- Werther M** (2007) Identifizierung und Optimierung von Biomarkern der Karzinogenese des duktales Pankreaskarzinoms, des Kolonkarzinoms und des Prostatakarzinoms. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich 18 der Universität Kassel.
- Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJA, Kang M, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH** (1998) Inactivation of the *p16 (INK4A)* tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res.* **58**: 4740–4744.
- Wilentz RE, Goggins M, Redston M, Marcus VA, Adsay NV, Sohn TA, Kadkol SS, Yeo CJ, Choti M, Zahurak M, Johnson K, Tascilar M, Offerhaus GJ, Hruban RH, Kern SE** (2000a) Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity. *Am J Pathol.* **156**(5): 1641-1651.
- Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH** (2000b) Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* **60**(7): 2002-2006.
- Yeo CJ und Cameron JL** (1998) Prognostic factors in ductal pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg.* **383**: 129–133.
- Zhang L und Yuan SZ** (2002) Expression of c-erbB-2 oncogene protein, epidermal growth factor receptor, and TGF-beta1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hepatobil Pancreat Dis Int.* **1**(4): 620-623.
- Ziske C, Schlie C, Gorschluter M, Glasmacher A, Mey U, Strehl J, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG** (2003) Prognostic value of CA 19-9 levels in patients with inoperable adenocarcinoma of the pancreas treated with gemcitabine. *Br J Cancer* **89**: 1413-1417.
- Zhu J, Abbruzzese JL, Izzo J, Hittelman WN, Li D** (2005) AURKA amplification, chromosome instability, and centrosome abnormality in human pancreatic carcinoma cells. *Canc Genet Cytogenet.* **159**(1): 10-17.

Danksagungen

Ich danke allen, die mich während dieser Arbeit ermutigt und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Ghadimi, der diese Arbeit in der Klinik für Allgemeinchirurgie der Universität Göttingen ermöglicht hat. Ich danke ihm insbesondere für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz, seine Betreuung dieser Arbeit und ein kollegiales Verhältnis.

Herrn Prof. Dr. Hellmuth Zöltzer danke ich für die Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Naturwissenschaften der Universität Kassel zu übernehmen. Die mir von ihm entgegengebrachte Herzlichkeit und seine konstruktive Kritik verdienen meinen besonderen Dank.

Ich danke Herrn Prof. Rüschoff für seine Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Scharf aus der Klinik für Gastroenterologie der Universität Göttingen danke ich für seine Kooperationsbereitschaft, die mir diese Arbeit ermöglicht hat.

Ich danke Herrn PD Dr. Ernst Heimöller und Frau Dr. Meike Werther für den wissenschaftlichen Austausch. Dabei danke ich Herrn PD Dr. Heimöller für seine Diskussionsbereitschaft sowie seine fachliche Unterstützung. Beiden danke ich für ihre stets freundliche und offene Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren.

Mein Dank gilt Dr. Carsten Thies für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und für die vielen anregenden Gespräche, die sich daraus ergeben haben.

Ich danke allen ehemaligen Kollegen aus dem Labor der Allgemeinchirurgie für die stets gute Zusammenarbeit. Besonders danke ich Frau Jessica Eggert für ihre technische Assistenz. Allen anderen danke ich für das freundliche kollegiale Arbeitsklima.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.