Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

Genomische und transkriptionelle Veränderungen im Pankreaskarzinom

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von Andreas Gerhardinger aus Krumbach (Schwaben)

Ulm, 2011

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
Erster Berichterstatter:	PD Dr. Lars Bullinger
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. Hildegard Kehrer-Sawatzki
Tag der Promotion:	20. 01. 2012

„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.“

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929), amerik. Soziologe u. Ökonom

Inhalt

INHALT I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

1. EINLEITUNG 1

1.1 Das Pankreas 1

1.2 Epidemiologie und Ursachen des duktalen Pankreaskarzinoms 2

1.3 Therapie und Prognose 3

1.4 Histologie 4

1.5 Molekulare Ursachen 6

1.6 Microarray-Technologien in der Tumor-Forschung 10

1.7 Bisherige Microarray-Untersuchungen zum Pankreaskarzinom 16

1.8 Zielsetzungen der Arbeit 18

2 MATERIAL UND METHODEN 19

2.1 Chemikalien, Kits und Gerätschaften 19

2.2 PDAC-Proben 21

2.3 Durchführung der Microarray-Experimente 26

2.4 Datenanalyse 32

2.5 Validierung der Ergebnisse 40

2.6 Verwendete Datenbanken und Software 45

3 ERGEBNISSE 47

3.1 Kopienzahl-Analyse 47

3.2 SNP-Analyse 51

3.3 LOH-Analyse 55

3.4 Differentielle Expression 62

3.5 Alternative Transkript-Varianten 65

3.6 Expression von miRNAs 70

4 DISKUSSION 74
4.1 Patientenproben 74
4.2 Kopienzahl-Veränderungen im Pankreaskarzinom 75
4.3 Prognostische SNPs 81
4.4 Prognostische LOH-Regionen 84
4.5 Differentielle Genexpression 88
4.6 Untersuchung von alternativem Transkript-Varianten 91
4.7 Prognostische miRNAs 97
4.8 Fazit 102
5 ZUSAMMENFASSUNG 103
6 LITERATURVERZEICHNIS 104
ANHANG 119
DANKSAGUNGEN 144

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µ	mikro
AUC	„Area under curve“, Fläche unter einer in einem Diagramm aufgetragenen Kurve
AML	Akute Myeloische Leukämie
bp	„Base Pair“, Basenpaar
BSA	„Bovine Serum Albumin“, Rinderserumalbumin
cDNA	„Complementary Deoxyribonucleic Acid“, komplementäre DNA
CGH	„Comparative Genomic Hybridization“, komparative genomische Hybridisierung
Chr	Chromosom
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
CNV	„Copy Number Variation”, Kopienzahl-Variation
d.h.	Das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleic Acid“, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	„Expressed Sequence Tag“ (durch cDNA-Sequenzierung identifizierte Sequenzen)
etc	et cetera (lat. „und so weiter“)
FC	„Fold Change”, Faktor der differentiellen Expression zwischen zwei Gruppen
FDR	„False discovery rate“
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GO	„Gene Ontology“, Ontologie-Datenbank
GSEA	„Gene Set Enrichment“-Analyse
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
hg18	„Human Genome Assembly 18“, Version 18 der Genom-Annotation des UCSC Genome Browsers
HSDNA	Herings-Sperma DNA
kb	Kilobasen
l	Liter
lat	Lateinisch
LOH	„Loss of Heterocygosity“, Heterozygotieverlust

m	Meter
m	milli
M	Mega
M	molar
Mb	Megabasen
MES	2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure
MiDAS	„Microarray Detection of Alternative Splicing“
min	Minute
miRNA	microRNA
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
OD	Optische Dichte
ORF	„Open Reading Frame“, offenes Leseraster
PAC	„Pattern Based Correlation“, Algorithmus zur Detektion von alternativem Spleißen
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PCR	„Polymerase Chain Reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	„Pancreatic Ductal Adenocarcinoma“, pankreatisches duktales Adenokarzinom
qRT-PCR	„Quantitative Realtime PCR“, Quantitative Echtzeit PCR
RE	Restriktions-Enzym
RISC	„RNA-induced Silencing Complex“, RNA-induzierter „silencing“ Komplex
RNA	„Ribonucleic Acid“, Ribonukleinsäure
RT	„Reverse Transcription“, reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„Reverse Transcriptase PCR“, Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SAPE	Streptavidin Phycoerythrin
SI	„Splice Index“, Spleiß-Index, Algorithmus zur Detektion von alternativem Spleißen
SNP	„Single Nucleotide Polymorphism“, Einzelnukleotid-Polymorphismus
snRNA	„small nuclear RNA“
ssDNA	„Single-Stranded DNA“, Einzelsträngige DNA
SSPE	„Saline-Sodium Phosphate-EDTA“-Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TF	Transkriptions-Faktor
TMACL	Tetramethylammoniumchlorid
Tm	„Melting Temperature“, Schmelztemperatur für doppelsträngige DNA

TNM	Tumor/Lymphknoten („Nodes“)/Metastasen-Klassifikation
U	„Unit“, Einheit
UCSC	University of California Santa Cruz
UICC	„Union internationale contre le cancer”, Internationale Vereinigung gegen Krebs
UPD	Uniparentale Disomie
UV	ultraviolett
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	„Untranslated Region” Untranslatierte Region
V	Volt
VSN	Varianz-Stabilisierende Normalisierung
w/v	Gewicht pro Volumen

1. EINLEITUNG

1.1 Das Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse („Pankreas“) ist die wichtigste Drüse für Verdauungsvorgänge im menschlichen Körper. Das quer im Oberbauch liegende Organ misst in der Länge 15-20 cm bei einem Gewicht von 70-100 g und wird unterteilt in Kopf, Körper und Schwanz (lat. Caput, Corpus, Cauda). Die Bauchspeicheldrüse übernimmt im Körper exokrine und endokrine Funktionen. Die exokrine Funktion besteht in der Ausschüttung des sogenannten Bauchspeichels, der Enzyme zur Spaltung von Eiweißen, Kohlenhydraten und Fetten enthält, in das Duodenum. Diese Enzyme spielen bei der Aufspaltung der Nahrung in ihre Grundbestandteile und die darauf folgende Resorption durch die Darmschleimhaut eine wichtige Rolle. Die Bildung dieser pankreatischen Verdauungsenzyme erfolgt in den Azinuszellen und wird über ein System von Gängen, das von den duktalen Zellen gebildet wird, in den Hauptausführgang geleitet. Neben der exokrinen Ausschüttung von Verdauungs-Enzymen besitzt das Pankreas mit der Ausschüttung von Insulin, Glucagon und Somatostatin in den Blutkreislauf außerdem eine endokrine Funktion. Diese Hormone werden in nur etwa 2% des Pankreas, den Langerhans-Inseln, gebildet und sind bei der Regulation des Blutzuckerspiegels beteiligt. Die Langerhans-Inseln bestehen zum größten Teil aus den sogenannten α- und β-Zellen, in denen Glukagon bzw. Insulin produziert wird.

Eine schematische Darstellung der Lage des Pankreas ist in Abbildung 1 zu sehen.

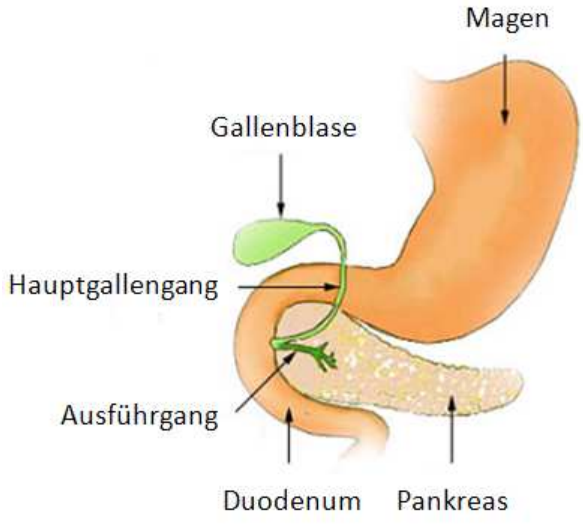


Abbildung 1: Schematische Lage des Pankreas (abgeändert nach http://training.seer.cancer.gov/anatomy/endocrine/glands/pancreas.html)

1.2 Epidemiologie und Ursachen des duktalen Pankreaskarzinoms

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma) ist der häufigste Tumor der Bauchspeicheldrüse und stellt in Industriestaaten die viert- bis fünfthäufigste Ursache für Tod durch Krebs dar (Abbildung 2). Patienten, bei denen dieser hochmaligne Tumor diagnostiziert wird, haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von unter 5% (Buchholz und Gress 2009). Statistisch werden beispielsweise in den USA für das Jahr 2011 etwa 44.000 neu diagnostizierte Fälle von PDAC erwartet, die zu 37.660 Todesfälle führen (American Cancer Society 2011). Das Lebenszeitrisiko, am Pankreaskarzinom zu erkranken, beträgt in Deutschland etwa 1,4%, wobei hier jährlich etwa 12.800 Fälle von Pankreaskarzinom auftreten (Hussmann et al. 2010). Diese vorwiegend bei älteren Menschen diagnostizierte maligne Neoplasie geht mit einer sehr schlechten Prognose einher, da der Tumor dazu neigt, früh Metastasen zu bilden und Symptome in den meisten Fällen erst sehr spät auftreten. Nur etwa 8% aller Fälle werden in einem frühen Stadium diagnostiziert, wobei diese durch das Fehlen von Frühsymptomen meist zufällig bei anderen Untersuchungen gefunden werden (American Cancer Society 2011).

Die Symptome umfassen abdominale Schmerzen, die bei fortgeschrittener Krankheit auch in den Rückenbereich ausstrahlen, Diabetes, Appetitlosigkeit, Depression, starker Gewichtsverlust und Ikterus (Hussmann et al. 2010).

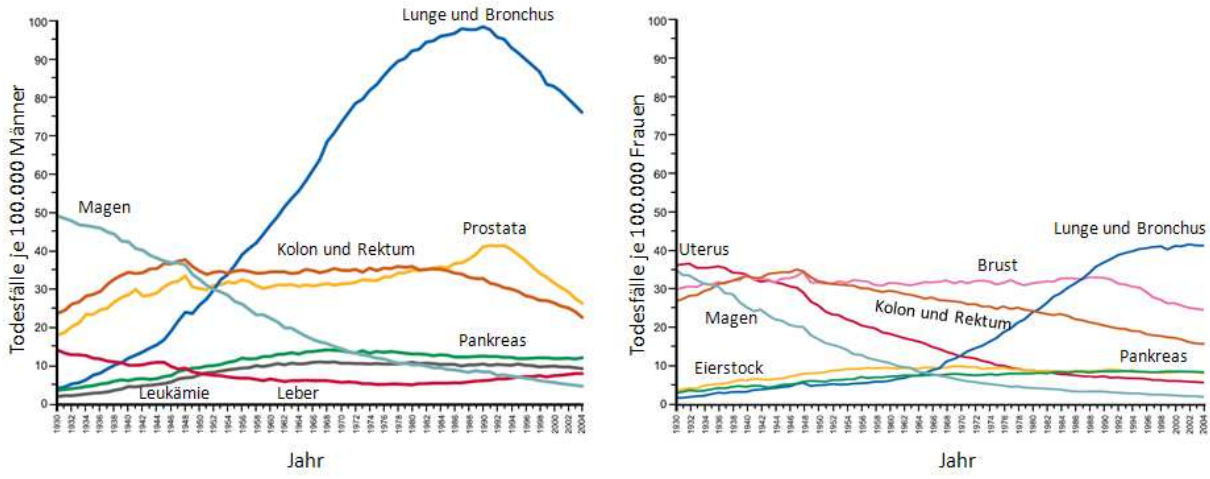


Abbildung 2: Vergleichende Darstellungen der häufigsten Todesursachen durch Krebs bei Männern (links) und Frauen (rechts). Abgeändert nach Cancer Statistics, 2008 (Jemal et al. 2008).

Der größte Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms ist Tabakkonsum. Raucher haben, je nach Häufigkeit des Tabakkonsums, ein zwei- bis fünffach erhöhtes Risiko, am Pankreaskarzinom zu erkranken (American Cancer Society 2011). Neben Rauchen ist das Alter ein entscheidender Faktor für das Auftreten eines Pankreaskarzinoms: ab einem Alter von etwa 60 Jahren steigt das Risiko stark an, wobei das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung für Männer bei etwa 68 und für Frauen bei etwa 75 Jahren liegt (Bruns et al. 2006). Neben Zigarettenrauch und Alter stellen hereditäre Risikomutationen – beispielsweise des BRCA2-Gens – eine erhöhte Gefahr dar, am PDAC zu erkranken. Bei Kenntnis dieser Mutationen kann durch regelmäßige Untersuchungen der Pankreas ein Karzinom aber frühzeitig erkannt werden. Weitere, teilweise aber noch umstrittene Risikofaktoren sind chronische Pankreatitis, Adipositas, Diabetes melitus sowie ein erhöhter Konsum von rotem Fleisch und Alkohol (American Cancer Society 2011). Eine Reihe anderer Faktoren, wie zum Beispiel ein übermäßiger Konsum von Kaffee oder Tee, konnten als Risikofaktoren für die Entstehung des Pankreaskarzinoms ausgeschlossen werden (Turati et al. 2011).

1.3 Therapie und Prognose

Bei der Diagnose Pankreaskarzinom stehen nahezu keine kurativen Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Einer Studie von Cress und Kollegen mit über 10.000 untersuchten PDAC-Fällen zufolge sterben etwa 20% aller Patienten innerhalb der ersten zwei Monate, 70% innerhalb von 12 Monaten und 90% innerhalb von 24 Monaten nach Diagnosestellung. In über 50% aller Patienten liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits ein metastasierendes Tumorstadium vor, bei dem nach heutigem medizinischen Kenntnisstand keine Heilung mehr möglich ist (Cress et al. 2006). Selbst bei einer Resektion des meist undeutlich vom Normalgewebe differenzierten Tumorgewebes, die nur bei etwa jedem fünften Fall in Frage kommt, besteht für den Patienten eine Wahrscheinlichkeit von nur etwa 20%, die nächsten fünf Jahre zu überleben (American Cancer Society 2011). Eine Ursache hierfür ist die meist späte Diagnose des PDAC und die rasche Ausbreitung von Metastasen, die sich bei einer Resektion des Pankreas oft schon verborgen in Leber, Lunge oder anderen Organen befinden (Nakao et al. 2006).

Patienten mit unbehandeltem PDAC haben eine mittlere Überlebenszeit von nur etwa 3-5 Monaten. Bei nicht operativ entfernbarem PDAC lässt sich durch Chemotherapie mit Zytostatika wie Gemcitabin (Pyrimidin-Analogon) oder Erlotinib (Tyrosinkinase-Hemmer)

die Lebensdauer der Patienten um mehrere Wochen bzw. Monate verlängern, die Krankheit an sich jedoch nicht aufhalten (Ghaneh et al. 2008).

Aufgrund der unzureichenden kurativen Behandlungsmöglichkeiten ist es daher essentiell, Methoden zur Früherkennung des Pankreaskarzinoms zu entwickeln. Eine frühzeitige Erkennung des PDAC ist die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung. Aufgrund der Lage der Bauchspeicheldrüse ist es schwierig, für Routineuntersuchungen mit geringem Aufwand an Biopsiematerial zu gelangen. Der derzeit am häufigsten verwendete Tumor-Marker für das Pankreaskarzinom CA 19-9 wird deswegen auch nicht in Biopsie-Material aus dem Pankreas, sondern in Blut nachgewiesen. CA 19-9 kann wegen seiner geringen Empfindlichkeit allerdings nicht für eine gesicherte Diagnosestellung des PDAC verwendet werden, dient aber als Therapie- und Verlaufskontrolle nach einer Resektion des Tumorgewebes (Boeck et al. 2006). Eine praktikable und verlässliche Möglichkeit zum routinemäßigen Screening auf PDAC ist derzeit noch nicht etabliert. Vor kurzem publizierte Daten zu mikroRNAs im humanen Blut deuten aber auf einen erfolgversprechenden Ansatz bei der einfachen Detektion verschiedener Tumorerkrankungen hin (Keller et al. 2011). Auch eine Kombination von CA 19-9 und der Expressionsstärke der miRNAs 16 und 196a im Blut-Plasma ist derzeit ein vielversprechender Ansatz für die Erkennung eines PDAC (Liu et al. 2011).

1.4 Histologie

Neben dem in dieser Arbeit untersuchten duktalen Adenokarzinom gibt es weitere Tumorformen des exokrinen Pankreas, wobei das PDAC aber mit 92% aller Fälle mit Abstand am häufigsten auftritt (Tabelle 1). Endokrine Tumoren des Pankreas, wie etwa das Inselzell-Karzinom, machen nur etwa 1-2% aller Fälle von Tumoren des Pankreas aus.

Tabelle 1: Häufigkeit von Tumoren des exokrinen Pankreas

Tumortyp	Häufigkeit (%)
Maligne Tumoren	
Duktales Adenokarzinom mit Varianten	92
Intraduktales papillär-muzinöses Karzinom	2
Muzinös-zystischer Tumor (muzinöses Zystadenokarzinom)	1
Azinuszellkarzinom	1
Andere Tumoren	3
Benigne Tumoren	
Seröses Zystadenom	1

Präkanzerose Veränderungen des Pankreasgangepithels werden als PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia; pankreatische intraepitheliale Neoplasie) bezeichnet. Es wird zwischen den Läsionen PanIN-1A (muzinöse Zellhypertrophie), PanIN-1B (duktale papilläre Hyperplasie und adenomatoide duktale Hyperplasie), PanIN-2 (mittelgradige Dysplasie) und PanIN-3 (hochgradige duktale Dysplasie bzw. Carcinoma in situ) unterschieden. Nur in einem kleinen Teil der Fälle erfolgt im Pankreaskarzinom eine Invasion von maligne veränderten Zellen in umgebendes Gewebe (Bruns et al. 2006). Eine Darstellung verschiedener PanIN-Stadien, sowie ein HE-gefärbter Schnitt einer in dieser Arbeit verwendeten Tumorprobe sind in den Abbildungen 3 und 4 zu sehen.

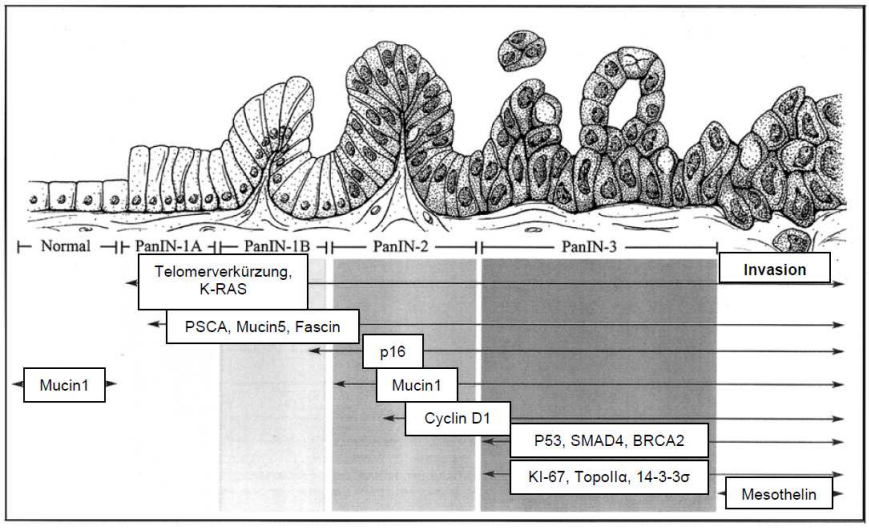


Abbildung 3: Schematische Darstellung verschiedener histologischer und molekularer Veränderungen bei der Entwicklung des pankreatischen duktalen Adenokarzinoms (Abgeändert nach Maitra et al. 2003).

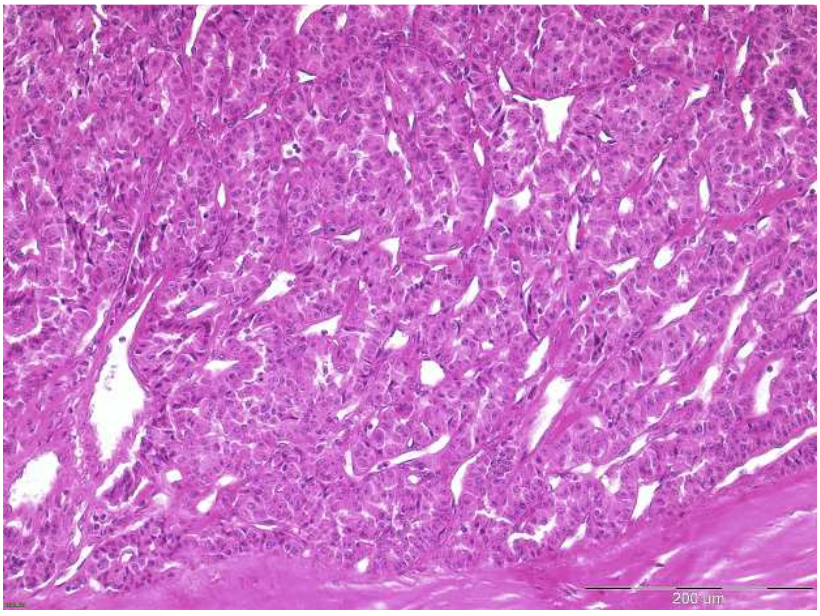


Abbildung 4: Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Schnitt einer in dieser Arbeit verwendeten Tumor-Probe.

Zur internationalen Standardisierung der Diagnose von malignen Erkrankungen des Pankreas wird die TNM-Klassifikation (Tabelle 2) der UICC von 2002 (Bruns et al. 2006) verwendet. Diese erlaubt die Dokumentation der Ausbreitungsstadien von Tumoren, regionären Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen (TNM; Tumor, Nodes, Metastases).

Tabelle 2: TNM-Klassifikation zur räumlichen Ausbreitung von Tumoren des exokrinen Pankreas der UICC von 2002

T	**Primärtumor**
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor begrenzt auf Pankreas, ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor begrenzt auf Pankreas, > 2 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich jenseits des Pankreas aus, jedoch ohne Infiltration des Truncus coeliactus oder der Arteria mesenterica superior
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliactus oder der Arteria mesenterica superior
N	**Regionäre Lymphknoten**
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine nachweisbaren regionäre Lymphknoten
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M	**Fernmetastasen**
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine nachweisbaren Fernmetastasen
M1	Nachweisbare Fernmetastasen

1.5 Molekulare Ursachen

Studien, die sich mit den molekularen Ursachen des Pankreaskarzinoms beschäftigten, führten in den letzten Jahren zur Kenntnis verschiedener tumorrelevanter Veränderungen im Pankreaskarzinom. Hierzu zählen unter anderem Mutationen, Deletionen, Duplikationen, differentielle Gen-Expression und epigenetische Modifikationen. Dies ermöglicht es, ein Tumor-Progressionsmodell zu erstellen (Abbildung 3 (Maitra et al. 2003)), bei dem wichtige tumorrelevante Ereignisse in Verbindung mit Tumor-Progessionsstufen gebracht werden. Der heutige Kenntnisstand umfasst eine Anzahl von gut untersuchten Genen, die in der Onkogenese des PDAC beteiligt sind. Die wichtigsten malignen Veränderungen sind im Folgenden aufgeführt:

K-Ras (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)

Dieses Gen kodiert für ein membrangebundenes Protein, das am MAPK/ERK-Signalweg beteiligt ist und dort, nach Binden des Wachstumsfaktors EGF, durch das am Rezeptor gebundene Protein SOS von einem GDP-Rest befreit wird. An dessen Stelle kann GTP binden und K-Ras so aktivieren. In diesem GTP-gebundenen Zustand kann K-Ras die MAPK-Kaskade aktivieren, die wiederum eine Aktivierung spezifischer Gene (u.a. für Proliferation und Anti-Apoptose) bewirkt. K-Ras geht nach der Aktivierung der MAPK-Kaskade wieder in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand über. Mutationen bewirken ein Verbleiben von K-Ras im GTP-gebundenen Zustand, wodurch die nachfolgende MAPK-Kaskade dauerhaft aktiviert bleibt und so zu einer verstärkten Proliferation führt.

Diese somatischen K-Ras-Mutationen treten schon in frühen Stadien auf und sind in vielen Tumoren wie dem Pankreaskarzinom, Leukämien sowie Kolon- und Lungenkarzinomen weit verbreitet. Maligne Mutationen betreffen in der Regel Codon 12 (in manchen Fällen auch Codon 13 oder 61) und kommen im Pankreaskarzinom mit Häufigkeiten von 75-90% aller Fälle vor (Buchholz und Gress 2009).

BRCA2 (Breast Cancer 2, early-onset)

Dieses zur Klasse der „Caretaker"-Gene gehörende Gen ist für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Bildung eines Komplexes aus RAD51 und PALB2 essentiell, und hat dadurch eine zentrale Rolle in der Erhaltung der genomischen Stabilität (Feldmann et al. 2007). Nicht reparierte DNA-Doppelstrangbrüche führen zu gravierenden genomischen Veränderungen wie Translokationen, Inversionen, Amplifikationen oder Deletionen, wodurch weitere tumorrelevante Gene involviert werden können.

Im Pankreaskarzinom kann bei diesem Gen, speziell in fortgeschrittenen PanINs, häufig eine Deletion oder eine loss-of-function Mutation beobachtet werden, wodurch ein für die Zelle wichtiger DNA-Reparaturmechanismus entfällt. Bestimmte Mutationen, sogenannte „Hochrisiko-Mutationen" des BRCA2-Gens, sind Ursache eines familiär vererbten Risikos für PDAC. Etwa 7-10 % aller Patienten mit PDAC weisen diese Mutationen, die außer dem Risiko für das PDAC auch das Risiko für das Auftreten von anderen Krebsarten erhöhen, auf (Feldmann et al. 2007). Mutationen im BRCA2-Gen wurden auch in Volksgruppen mit erhöhtem Risiko für PDAC gefunden, wie zum Beispiel den Ashkenazi-Juden (Roa et al. 1996) oder hawaiianischen (Carney et al. 2010) und isländischen (Arason et al. 1998) Bevölkerungsgruppen.

p53 (Tumor protein 53)

Beim Auftreten von DNA-Schäden in einer Zelle kommt es zur Akkumulation des unter normalen Umständen schnell abgebauten Proteins p53, was durch die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor zur Expression des Gens CDKN1A (p21) führt. Dies führt zu einem Stopp des Zellzyklus, wodurch sich die Zelle nicht mehr teilt und dadurch Zeit für die Ausführung von DNA-Reparaturen gewonnen wird (Abbas und Dutta 2009). Sind die Schäden am Genom zu gravierend um beseitigt zu werden, führt die weitere Akkumulation von p53 zur p53-vermittelten Expression von Genen der Bcl2-Familie, was mittels einer Signalkaskade über mehrere Caspasen in der Induktion der Apoptose endet. Eine loss-of-function Mutation des TP53-Gens ist in vielen Tumorarten und Leukämien zu finden (Ozaki und Nakagawara 2011). Aufgrund dieser zentralen Rolle bei der Überwachung – und gegebenenfalls Induktion der Apoptose – einer Zelle wird p53 auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane 1992). Ebenso wie BCRA2 ist das Tumorsuppressor-Gen TP53 in etwa 50-70% aller Pankreaskarzinome durch Deletion oder Mutation bi-allelisch inaktiviert (Buchholz und Gress 2009), wodurch der Verlust einer wichtigen Kontrollmöglichkeit des Zellzyklus bzw. der Apoptose beim Auftreten von Schäden im Genom bewirkt wird.

c-Myc

Das Protoonkogen c-Myc wird vom MYC-Gen kodiert und ist an der Regulation von etwa 15% aller humanen Gene beteiligt (Gearhart et al. 2007). Hierunter befinden sich viele Gene aus den Bereichen Zellteilung, Zellwachstum und Apoptose. Mutationen im MYC-Gen können die dauerhafte Expression von c-Myc bewirken, was zu einer unlimitierten Expression von vielen an der Proliferation beteiligten Gene führt. Neben Mutationen kann eine dauerhafte Aktivierung von MYC auch über eine Reihe von Signalwegen erfolgen, darunter der Wnt-, EGF-, und PI3K/MAPK-Signalweg. Im Burkitt-Lymphom wird das MYC-Gen beispielsweise über eine Translokation dauerhaft einem Expressionssignal ausgesetzt (Yustein und Dang 2007), beim PDAC dagegen erfolgt eine gesteigerte Expression des Gens meist durch Mutationen von Genen der vorausgehenden Signalwege (Buchholz und Gress 2009). Aufgrund seiner zentralen Position in vielen onkologisch relevanten Signalwegen spielt MYC eine bedeutende Rolle bei der Tumorentstehung und ist ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung neuer Therapieansätze.

CyclinD1

Eine erhöhte Expression des durch das Gen CCND1 kodierten Proteins CyclinD1 ist im PDAC, wie auch in fast allen anderen malignen Tumoren, zu finden. CyclinD1 fungiert beim Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus als regulatorische Untereinheit eines Komplexes mit CDK4 bzw. CDK6. Dieser Komplex ermöglicht der Zelle den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus und wird anschließend aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert, wo er abgebaut wird. In Tumorzellen findet der Export des nukleären CyclinD1 nicht statt, wodurch dieses auch während der S-Phase innerhalb des Zellkerns aktiv ist und dort zu genomischer Instabilität führt (Kim und Diehl 2009). CyclinD1 ist außerdem ein Co-Faktor bei der Phosphorylierung und Inaktivierung des Rb-Proteins (Retinoblastoma), das ebenfalls eine zentrale Rolle im Zellzyklus einnimmt (Feldmann et al. 2007).

CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

Ein weiteres Gen, das im Pankreaskarzinom häufig betroffen ist, ist das Tumorsuppressor-Gen CDKN2A ($p16^{INK4A}$). Dieses kodiert für ein Protein, das an die am Zellzyklus beteiligten Proteine CDK4 und CDK6 bindet und dadurch die Bildung eines Proteinkomplexes mit CyclinD1 verhindern kann. Dies führt zu einem Stopp des Zellzyklus. In bis zu 95% aller Pankreaskarzinome ist dieses Gen durch Mutation, Deletion oder durch Methylierung funktionsunfähig oder nicht exprimiert (Buchholz und Gress 2009, Feldmann et al. 2007), wodurch ein wichtiger Kontrollmechanismus für den Zellzyklus entfällt.

SMAD4 (SMAD family member 4)

SMAD4, das auch unter dem Namen DPC4 (Deleted in Pancreatic Carcinoma) bekannt ist, ist ein weiterer Tumorsuppressor, der in etwa der Hälfte aller Pankreastumoren deletiert oder funktionell inaktiviert vorliegt (Buchholz und Gress 2009). SMAD4 hat im **TGF-β Signalweg** eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktor und trägt im Falle einer niedrigen Expression, bzw. eines Funktionsverlustes, zu verringerter Wachstumsinhibition und unkontrolliertem Zellwachstum bei (Feldmann et al. 2007).

Matrix Metalloproteasen

Matrix Metalloproteasen (MMPs) bewirken in Tumoren unter anderem den Abbau verschiedener Zell-Adhäsions-Moleküle und den Umbau der extrazellulären Matrix, und sind auch in anderen tumorrelevanten Bereichen wie Proliferation, Apoptose und Angiogenese beteiligt (Gialeli et al. 2011, Kessenbrock et al. 2010). Im Pankreaskarzinom ist

beispielsweise eine Überexpression von MMP-7 in einem Großteil der invasiven PDACs zu beobachten (Feldmann et al. 2007). Aufgrund der schnellen Ausbreitung von Metastasen im Pankreaskarzinom sind MMPs ein wichtiges Forschungsgebiet bei der Entwicklung von Therapien für Patienten mit Pankreaskarzinom.

PI3K/AKT Signalweg

Der PI3K/AKT-Signalweg wird durch extrazelluläre Wachstumssignale, wie beispielsweise EGF („Epidermal Growth Factor“) aktiviert und führt zur Aktivierung des Proteins PI3K, durch das im Anschluss die Aktivierung von AKT erfolgt. AKT hat Einfluss auf mehrere wichtige regulatorische Proteine, darunter mTOR (wichtig für Überleben und Proliferation) und der Transkriptionsfaktor NF-κB, der die Expression von Genen aus Bereichen wie Zellwachstum, Angiogenese und Invasion steuert. Neben der Aktivierung durch verschiedene Wachstumssignale ist AKT Ziel einer Reihe von Proteinen (z. B. PTEN) und miRNAs (z. B. miR-149 oder miR-222), die sich im duktalen Pankreaskarzinom durch Deletion, Mutation oder eine veränderte Expression gegenüber gesunden duktalen Zellen auszeichnen (Hill et al. 2010, Lin et al. 2010, Zhang et al. 2010).

1.6 Microarray-Technologien in der Tumor-Forschung

Um Veränderungen im Genom oder Transkriptom von Tumorzellen zu detektieren, ist es nötig, Aussagen über die relative Menge an genomischer DNA bzw. mRNA zwischen Tumor- und Nicht-Tumor-Proben machen zu können. Dazu muss an einer Vielzahl von genomischen Positionen bzw. in Transkripten/Exons die Menge an DNA bzw. RNA gemessen werden. Da dies mittels etablierter Methoden wie der qRT-PCR aufgrund der Menge an Einzelexperimenten nicht praktikabel wäre, wurde die Microarray-Technik entwickelt. Bei dieser lassen sich in kurzer Zeit über eine Million paralleler Einzelexperimente mit hoher Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit durchführen.

Alle Microarrays für genomische und transkriptomische Analysen basieren auf dem Prinzip der DNA-Hybridisierung. Hierbei bindet ein DNA-Fragment in einer biologischen Probe an einen komplementären Sequenzabschnitt („Probe“), der auf einer festen Oberfläche angebracht ist. Um gebundene Zielsequenzen detektieren zu können wird bei Affymetrix-Microarrays die zu untersuchende Probe mit Biotin markiert und anschließend auf den Microarray hybridisiert. Nach dem Entfernen der ungebundenen Nukleinsäuren wird die

Biotin-markierte Probe in zwei Schritten mit einem Fluoreszenz-Farbstoff angefärbt und die entstehende Fluoreszenz gemessen. Je mehr Proben-DNA am Array gebunden hat, desto größer ist die Signalintensität, die anschließend im Scanner gemessen wird. Ein Schema der Funktionsweise der in dieser Arbeit verwendeten Microarrays ist in Abbildung 5 dargestellt.

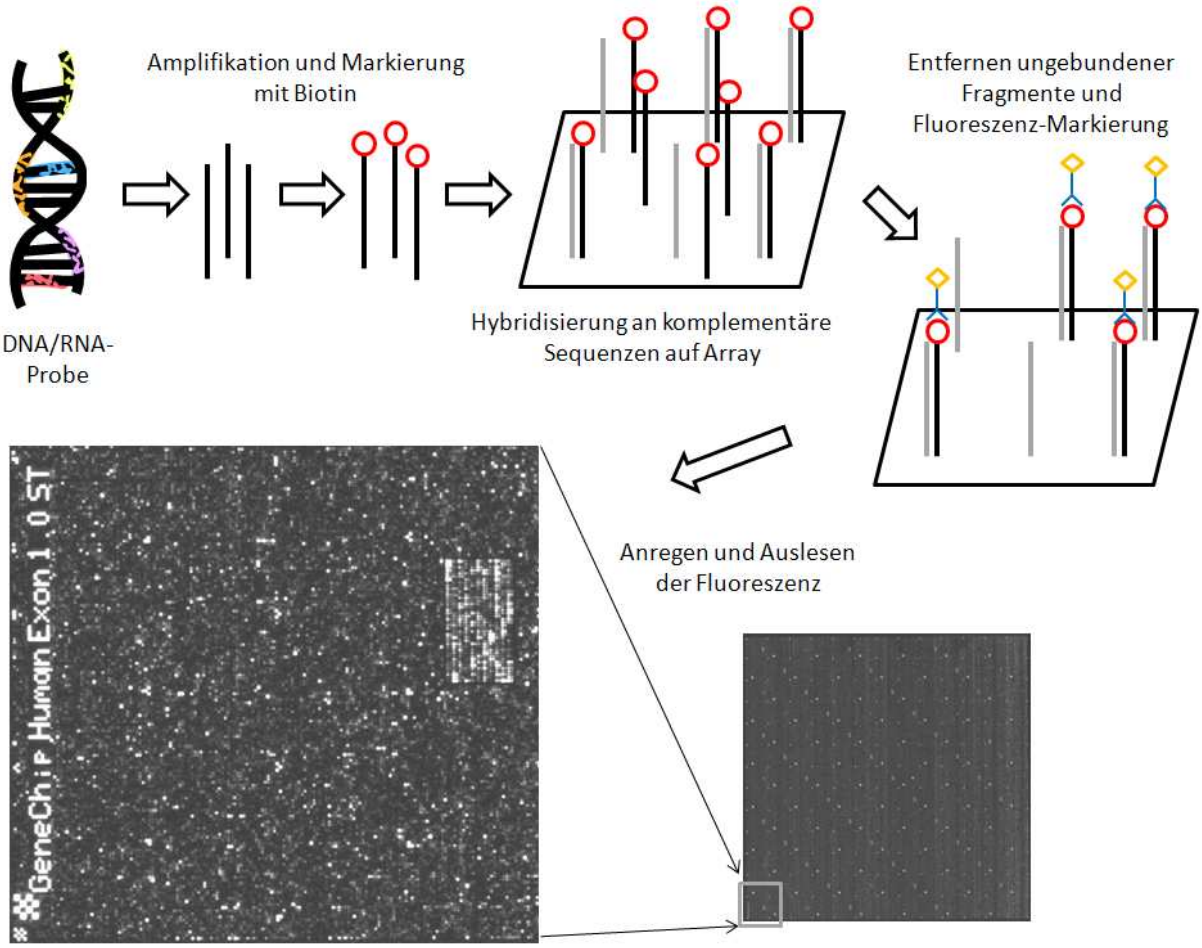


Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung der Funktionsweise der verwendeten Microarrays.

Die Synthese der einzelnen Probes durch Photolithographie direkt auf der Microarray-Oberfläche erlaubt eine starke Verkleinerung der Fläche eines einzelnen Probe im Vergleich zu konventionellen Arrays, bei denen zuvor erstellte DNA-Abschnitte mithilfe eines Spotting-Roboters auf einen Array aufgebracht werden. Durch diese Art der Array-Herstellung lassen sich auf kleinen Oberflächen sehr hohe Dichten erreichen. Auf dem Affymetrix SNP 6.0 Array sind beispielsweise etwa 1,8 Mio verschiedener Probes auf einer Fläche von nur etwa 1,6 cm^2 untergebracht. Eine exemplarische Darstellung von Affymetrix Microarrays ist in Abbildung 6 zu sehen.



Abbildung 6: Affymetrix Microarrays (Quelle: www.affymetrix.com)

Damit die beim Scannen eines Arrays gemessene Fluoreszenz-Intensität direkt mit anderen Fällen verglichen werden kann, ist eine Normalisierung der Roh-Intensitäten notwendig. Hierbei werden die gemessenen Fluoreszenz-Werte durch den Einsatz geeigneter Algorithmen (siehe Kapitel 2.4) so angepasst, dass Abweichungen durch experimentelle und technische Varianz minimiert werden, die realen Unterschiede aber erhalten bleiben.

SNP-Arrays

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Affymetrix GeneChip 250K Nsp SNP Array handelt es sich um einen Array-Typ, mit dem genomische DNA untersucht werden kann. Etwa 260.000 über das humane Genom verteilte „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs, Einzelnukleotid-Polymorphismen) werden dabei durch komplementäre Probes auf dem Array abgedeckt. Für beide möglichen Ausprägungsformen eines zu untersuchenden SNP sind zwei komplementäre, 25 Basen lange Sequenzabschnitte auf dem Microarray vorhanden. Durch direkten Vergleich beider Intensitätswerte kann die Ausprägung eines SNP (d.h. Allelstatus AA, BB oder AB) in einer Probe bestimmt werden. Kommt in einer Probe auf beiden Chromosomen die gleiche Variante eines SNPs vor, so wird an der entsprechenden komplementären Sequenz auf dem Array die größere Signalintensität gemessen. Sind beide Ausprägungen eines SNP vertreten, sind die Signalintensitäten beider Probes in etwa gleich groß. Die Zuordnung der Intensitäten von Probesets zu den Allelen A und B erfolgt durch geeignete Software-Pakete und wird Genotypisierung genannt. Aus der Anzahl der erfolgreichen bzw. nicht möglichen Zuordnungen kann für jeden Array die „Call Rate“, die ein Maß für die Qualität der Array-Daten darstellt, errechnet werden.

Für jede Komplementärsequenz auf dem Array gibt es eine „Perfect Match-“ (entspricht der Komplementärsequenz) und eine „Missmatch-“Probe, die sind in der zentralen 13. Base unterscheiden. Die „Missmatch“-Probe dient hierbei zur Messung von unspezifisch bindendem Probenmaterial. Aus den Intensitätswerten der gemessenen „Perfect Match“ SNP-Probes kann, nach Normalisierung der Roh-Intensitäten (Kapitel 2.4), die Anzahl der Kopien für bestimmte Sequenzabschnittes ermittelt werden (Abbildung 7).

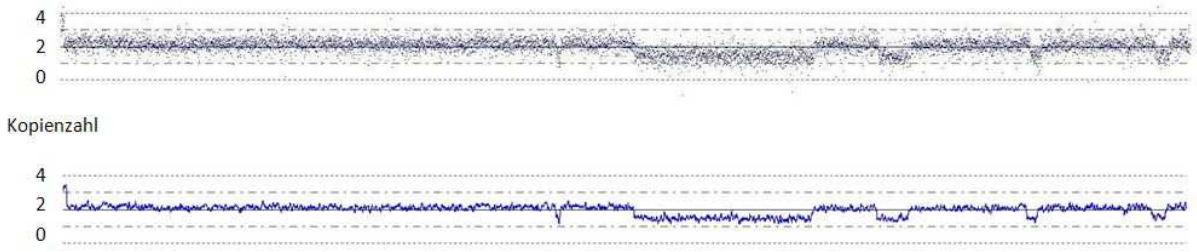


Abbildung 7: Darstellung der normalisierten Intensitätswerte einer Pankreaskarzinom-Probe (Chromosom 1) in der CNAG-Software mit Angabe der Kopienzahl. Oben: Nicht geglättete Darstellung, bei der jeder Daten-Punkt einen einzelnen SNP (Einzelnukleotid-Polymorphismus) repräsentiert. Unten: Geglättete Darstellung, bei der aus den Werten von 5 benachbarten SNPs ein Durchschnittswert berechnet wird.

Neben der Kopienzahl und dem Status der einzelnen SNPs können durch Software-Analysen außerdem Regionen identifiziert werden, die über lange Bereiche keine heterozygoten SNPs aufweisen. Diese Regionen werden LOH (Loss of heterozygosity, Heterozygotieverlust) genannt und können auf zwei verschiedene Arten entstehen. Die erste Möglichkeit ist Verlust einer Kopie einer genomischen Region, so dass im betroffenen Bereich nur jeweils ein Allel vorkommen kann. Diese Regionen können auch durch Kopienzahl-Analysen detektiert werden. Die zweite Möglichkeit ist der Verlust einer genomischen Region und eine darauf folgende Verdoppelung des verbliebenen homologen Abschnittes. Dieses Ereignis wird auch Kopienzahl-neutrales LOH bzw. „uniparentale Disomie“ (UPD) genannt, da beide Kopien der betreffenden Region vom selben Elternteil stammen. Betrifft diese Verdoppelung ein Gen, das entweder durch Mutation oder durch epigenetische Modifikation inaktiviert ist, steht für die Zelle kein funktionsfähiges Gen mehr zur Verfügung, was in vielen Fällen zum Auftreten von Krankheiten beitragen kann. Da UPDs nicht anhand der Kopienzahl detektiert werden können, bieten die hier verwendeten SNP-Arrays einen Vorteil gegenüber der Matrix-CGH.

Expressions-Arrays

Neben der relativen Menge an genomischer DNA kann mithilfe von Microarrays auch die relative Expression einzelner Gene gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Exon- und miRNA-Arrays eingesetzt. Bei Exon-Arrays erfolgt die Messung der Exon-cDNA über Probesets, die komplementär zu den zu untersuchenden Exons sind. Durch die relative Quantifizierung einzelner Exons ist hierdurch neben der Analyse der Gen-Expression auch die Analyse von differentiellem Spleißen möglich.

Differentielles Spleißen, das lange Zeit nur als ein entwicklungsspezifisches Phänomen angesehen wurde, konnte in den letzten Jahren zunehmend als ein onkologisch relevantes Gebiet identifiziert werden (David und Manley 2010, Dutertre et al. 2010). Erst durch die Entwicklung geeigneter Microarrays wurden, neben der Transkriptom-Sequenzierung, groß angelegte Screenings zum Auffinden onkologisch relevanter Transkript-Varianten möglich. Die Detektion und Validierung wird hierbei allerdings durch eine Vielzahl an möglichen Spleiß-Arten erschwert (Abbildung 8).

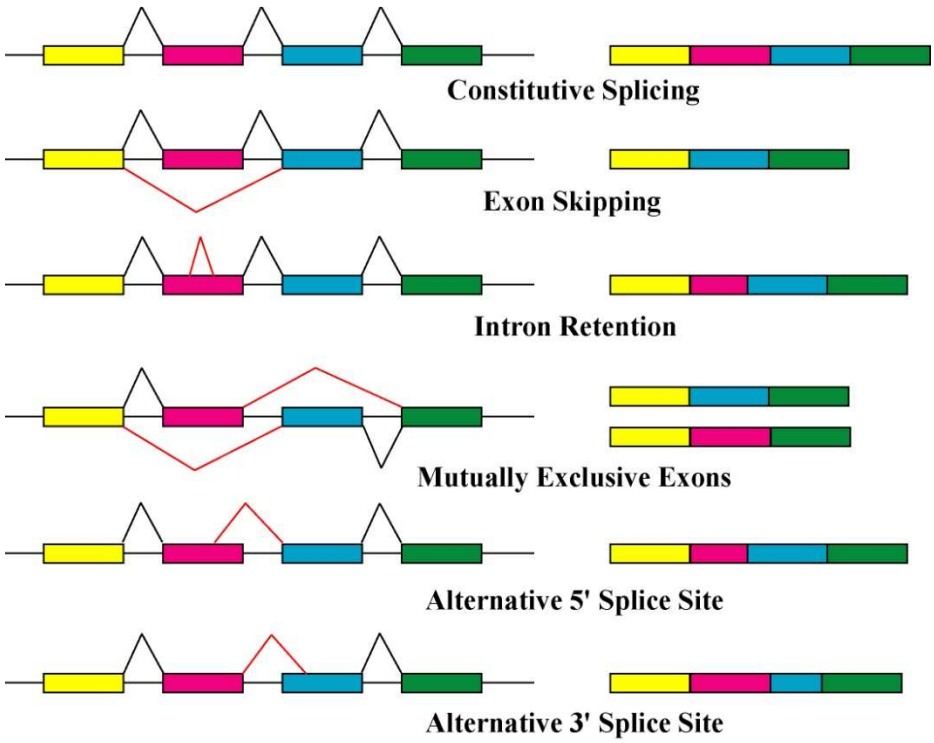


Abbildung 8:. Darstellung möglicher Spleiß-Arten für ein Transkript mit den gebräuchlichen englischsprachigen Bezeichnungen. (Quelle: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7a/Alternative_splicing.jpg)

Da unterschiedlich gespleißte Transkript-Varianten eines Gens mitunter sogar zu Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen führen können, kann es bei alternativen Transkript-Varianten dazu kommen, dass zelluläre Kontroll- bzw. Regulations-Systeme ihre Funktion verlieren. Bisher wurden in verschiedenen Tumor-Arten Gene gefunden, die sich durch alternative Transkript-Varianten zwischen Tumor- und Nicht-Tumor-Proben unterschieden. Bei der CLL beispielsweise bewirkt eine bestimmte Spleiß-Variante des CD20-Transkripts, dass das Protein nicht wie üblich in die Zellmembran eingebaut wird, sondern intrazellulär verbleibt (Henry et al. 2010). Da CD20 ein für die Behandlung von CLL-Patienten mit Rituximab wichtiger Rezeptor ist, macht eine Rituximab-Behandlung bei Patienten mit dieser Transkript-Variante keinen Sinn. Diese Entdeckung ermöglicht einen Test, bei dem schon vor Therapiebeginn refraktäre Patienten identifiziert und einer anderen Behandlung zugeführt werden können.
Beim Pankreaskarzinom gibt es bisher jedoch keine Untersuchung an Primärtumoren, bei der ein Transkriptom-weites Screening auf alternative Transkript-Varianten durchgeführt wurde.

Neben der Expression von Genen bzw. einzelnen Exons kann auch die Expression von micro-RNAs (miRNAs) mittels geeigneter Microarrays gemessen werden. Auf den Affymetrix GeneChip miRNA-Arrays wird dabei die Expression von 847 humanen miRNAs erfasst. Die Rolle von miRNAs in Tumorzellen ist aktuell ein wichtiges onkologisches Forschungsgebiet, da diese kurzen regulatorischen RNAs großen Einfluss auf tumorrelevante Vorgänge haben können. Es wird geschätzt, dass etwa 50% aller humanen Gene durch miRNAs reguliert werden, wobei jede miRNA an der Regulation von mehreren hundert verschiedenen Genen beteiligt sein kann (Park et al. 2011). Je nach Ähnlichkeit von miRNA und Zielsequenz können die Auswirkungen von leichter Inhibition der Translation bis hin zum vollständigen Abbau der Ziel-mRNA durch NMD („Nonsense-mediated mRNA decay“) reichen. miRNAs binden meist im 3’UTR der Ziel-mRNA, es wurden jedoch auch Bindestellen innerhalb der kodierenden Regionen von Genen gefunden. Computergestützte Vorhersagen, wie sie z. B. von den Datanbanken miRBase (www.mirbase.org) oder miRanda (www.microrna.org) bereitgestellt werden, liefern eine Vielzahl von potentiellen Bindestellen für jede miRNA, die aber größtenteils noch nicht experimentell validiert sind.
In Tumorzellen kann durch alternatives Spleißen im Bereich einer miRNA-Bindestelle der miRNA-Regulationsmechanismus umgangen werden. So kann beispielsweise in vielen proliferierende Zellen eine Verkürzung des 3’UTR beobachtet werden (Ryan et al. 2010), was auf einen weit verbreiteten Mechanismus für das Umgehen der miRNA-Regulation hindeutet

(Mayr und Bartel 2009). Neben alternativem Spleißen scheinen auch SNPs eine Rolle in Verbindung mit miRNA-Bindestellen zu spielen: Bei einigen Genen konnte eine Veränderung der miRNA-Zielsequenz durch einen SNP mit Krankheiten wie dem Tourette Syndrom oder Tumoren in Verbindung gebracht werden (Ryan et al. 2010).

1.7 Bisherige Microarray-Untersuchungen zum Pankreaskarzinom

Bei einer vergleichenden Betrachtung von Array-Untersuchungen, die bisher beim Pankreaskarzinom durchgeführt wurden, müssen zwei grundlegende Faktoren beachtet werden: Zum einen die Herkunft des Probenmaterials, zum anderen dessen Isolierung. PDAC-Proben können entweder, wie in dieser Studie aus Primärtumoren, oder aber aus Zellkultur von PDAC-Zelllinien stammen. Proben aus Primärtumoren bieten hierbei einen deutlichen Vorteil, da sich der Tumor im Ursprungszustand befindet, während Proben aus Zellkultur durch wiederholtes Passagieren und den dadurch erzeugten Selektionsdruck teilweise starke genomische Veränderungen gegenüber dem ursprünglichen Primärtumor-Zustand aufweisen. Der zweite Faktor, die Isolierung der Tumorzellen aus dem Zellverband, kann entweder manuell mittels Skalpell, oder durch Laser-Mikrodissektion erfolgen. Aufgrund der schlechten Trennbarkeit von Tumorzellen und Normalgewebe wird bei Probenmaterial des Pankreaskarzinoms häufig Laser-Mikrodissektion eingesetzt, um den Anteil von Tumorzellen in einer Probe zu erhöhen. Dies ist allerdings problematisch, da die Durchführung einer Mikrodissektion einige Zeit in Anspruch nimmt, die Proben in Kontakt mit verschiedenen Polymeren kommen (Espina et al. 2006), und durch die geringe Ausbeute an Zellen eine Amplifikation des gewonnenen Proben-Materials vor der Verwendung nötig ist. Diese Faktoren führen nach eigenen Erfahrungen zu einem starken Rauschen der durch Array-Experimente gewonnenen Roh-Intensitäten, was in einer schlechteren Detektierbarkeit von tumorspezifischen Veränderungen resultiert. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit Material gearbeitet, das nicht durch Laser-Mikrodissektion gewonnen wurde.

Zu Veränderungen der Kopienzahl im Pankreaskarzinom gibt es eine Reihe von Microarray-Untersuchungen, von denen ein großer Teil auf sogenannten „Matrix-CGH-Arrays“ untersucht wurde. Dieser Vorläufer-Array der heutigen SNP-Arrays verfügt über eine wesentlich geringere Abdeckung des Genoms mit Probes und ist aufgrund seines Aufbaus nicht direkt mit anderen Arrays vergleichbar. Viele dieser Matrix-CGH-Untersuchungen

wurden an Zell-Linien durchgeführt (Holzmann et al. 2004, Harada et al. 2009). Bei anderen Untersuchungen wurden zwar Proben aus Primärtumoren verwendet, diese wurden aber teilweise mit durch Mikrodissektion gewonnenem Probenmaterial durchgeführt (Loukopoulos et al. 2007, Harada et al. 2007). Bei diesen Untersuchungen wurden eine Reihe von genomischen tumorrelevanten Aberrationen wie z. B. MYC, EGFR, CCND1, CDKN2A oder ERBB2 gefunden, die allerdings größtenteils in Untersuchungen an Zell-Linien auftraten.

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen, die mit Affymetrix SNP-Arrays am Pankreaskarzinom durchgeführt wurden. Eine dieser Untersuchungen (Harada et al. 2008) wurde an 27 Primärtumoren des PDAC mit Affymetrix 100K SNP Arrays durchgeführt, wobei das Probenmaterial allerdings durch Mikrodissektion gewonnen wurde. Die aktuellste Untersuchung zu SNP-Status und LOHs im Pankreaskarzinom wurde von Gutiérrez und Kollegen anhand von nicht-mikrodisseziertem Primärtumor-Material (n = 20) durchgeführt. Hierbei konnte eine Reihe von Zugewinnen und Verluste aus früheren Untersuchungen bestätigt werden. Verluste von genomischem Material konzentrierten sich auf die Regionen 1p, 9p, 12q, 17p und 18q, Zugewinne wurden in den Regionen 1q, 7q, 8q und 20q detektiert. Die Analyse der Kopienzahl wurde hierbei als gepaarte Analyse (Abschnitt 2.4) durchgeführt, was eine sehr gute Trennung von tumor-spezifischen und nicht-tumor-spezifischen Veränderungen erlaubt. Veränderungen in Gene wie K-RAS, BRCA2, MYC, TP53 oder CCND1, die in PDAC-Zelllinien oft in veränderter Kopienzahl gefunden wurden, konnten in dieser Studie in den untersuchten Primärtumoren nicht bestätigt werden. LOHs wurden in dieser Analyse bei 17p13.1–17p11.2, 17p13.3–17p13.1, sowie auf 9p und 18q gefunden. Die Auswertung der LOH-Daten erfolgte hierbei allerdings nicht im Hinblick auf das Überleben von PDAC-Patienten (Gutiérrez et al. 2011).
Weniger Untersuchungen als zur Kopienzahl gibt es zu alternativen Transkript-Varianten im Pankreaskarzinom. Hierbei wurden in den letzten Jahren nur zwei Studien durchgeführt, von denen die eine im Mausmodell (Omenn et al. 2010) und die andere an PDAC-Zelllinien (Carrigan et al. 2011) auf Affymetrix GeneChip Exon Arrays durchgeführt wurde. Hierbei stellte sich heraus, dass die Anzahl der differentiell gespleißten Transkripte in PDAC-Zell-Linien geringer ist als in Zelllinien von nicht-malignen duktalen Zellen des Pankreas. Außerdem wurde festgestellt, dass viele am Spleißen beteiligten Gene in den PDAC-Zelllinien niedriger exprimiert waren.

Während bisher nur wenige Studien zu genomischen Veränderungen durchgeführt wurden, gibt es für das Pankreaskarzinom umfangreiche Studien zu veränderter Genexpression. Neben dieser wurden in den letzten Jahren viele Studien zu veränderter Expression von miRNAs durchgeführt, wobei in der bisher größten Untersuchung an Primärtumor-Material des PDAC die Expression von 326 miRNAs untersucht wurde (Bloomston et al. 2007). Zu den aberrant exprimierten miRNAs zählen beispielsweise miR-21, miR-155, miR-221 (Park et al. 2011), miR-196a, miR-217 (Bloomston et al. 2007, Steele et al. 2011) und miR-421 (Hao et al. 2011).

1.8 Zielsetzungen der Arbeit

Da es für eine Verbesserung der Überlebenszeit von PDAC-Patienten sehr wichtig ist, sowohl den Tumor so früh wie möglich zu detektieren, als auch eine Prognose über den individuellen Verlauf treffen zu können, sollen in dieser Arbeit prognostische Marker für das Pankreaskarzinom identifiziert werden. Hierfür wurden insgesamt 70 Proben von PDAC Primärtumoren mit verschiedenen Microarrays auf prognostische Marker hin untersucht. Für die Detektion von Kopienzahl-Veränderungen, SNPs und LOHs wurden Affymetrix GeneChip 250K Nsp Arrays (n = 69) eingesetzt. Neben diesen wurden Affymetrix miRNA Arrays (n = 31) für die Analyse der miRNA-Expression, sowie Affymetrix Exon Arrays (n = 15) für die Detektion von alternativen Transkript-Varianten und die Analyse differentieller, bzw. prognostischer Gen-Expression verwendet.

Anhand der gewonnenen Daten sollen mittels geeigneter Algorithmen und Software-Paketen Faktoren identifiziert werden, die für das Überleben von PDAC-Patienten von Bedeutung sind. Besonders bei der Detektion von alternativem Spleißen ist eine umfangreiche Evaluation verschiedenster Programme für eine verlässliche Analyse der Exon-Array-Daten nötig, da es bisher keinen Goldstandard für diese Art der Analyse gibt.

Mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen soll ein wichtiger Beitrag zum genaueren Verständnis tumorrelevanter Vorgänge im Pankreaskarzinom geleistet werden. Zusätzlich sollen anhand neuer prognostischer Biomarker Grundlagen für eine verbesserte Früherkennung und eine individuell gestaltete Therapie von Patienten mit PDAC gelegt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Kits und Gerätschaften

Die im Methodenteil angegebenen Chemikalien und Puffersubstanzen wurden im Normalfall in Analysequalität bezogen. Verwendete Chemikalien, Enzyme, Kits und Geräte sind in den Tabellen 3, 4 und 5 aufgeführt.

Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Iso-Propanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MES (12x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SSPE (20x)	Lonza, Basel, Schweiz
Seakem LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
TMACL	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-Acetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 4: In dieser Arbeit eingesetzte Biochemikalien und Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Denhardt's Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FlashTaq Biotin HSR RNA Labeling Kit	Genisphere, Hatfield, PA
GeneChip Human Mapping 250K Nsp Assay Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA
GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA
GeneChip WT Expression Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA
GeneChip WT Terminal Labeling and Controls Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA
Cot-1-DNA	Invitrogen, Darmstadt
HSDNA	Promega, Mannheim
*mir*Vana™ miRNA Isolation Kit	Ambion, Austin, TX
*mir*Vana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit	Ambion, Austin, TX
*mir*Vana™ qRT-PCR Primer	Ambion, Austin, TX
*mir*Vana™ qRT-PCR Primer Set for Normalization (5S)	Ambion, Austin, TX
Oligonukleotide	Biomers.net, Ulm

Bezeichnung	Bezugsquelle
Phusion™ High Fidelity Polymerase Master Mix	NEB, Ipswich, MA
SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix	Invitrogen, Darmstadt
SYBR Green PCR Master Mix	Invitrogen, Darmstadt
Total RNA, Pankreas	Ambion (AM7954), BioChain (R1234188-50), Clontech (8062507A, 8081302A), Stratagene (540023)

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Gerätschaften

Bezeichnung, Bezugsquelle	Einsatzzweck
AEG Micromat, AEG, Nürnberg	Aufkochen von Lösungen
Analysenwaage 2004 MP , Sartorius AG, Karlsruhe	Waage
Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700, Carlsbad, USA	PCR
Biofuge 13 3637, Heraeus, Newport Pagnell, England	Zentrifugieren
Biometra Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen	Stromversorgung
Eppendorf Centrifuge 5471R, Eppendorf, Hamburg	Zentrifugieren
Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg	Zentrifugieren
Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg	Einengen von Lösungen
Eppendorf Research® 10, Eppendorf, Hamburg	Pipettieren von Lösungen
Eppendorf Research® 100, Eppendorf, Hamburg	Pipettieren von Lösungen
Eppendorf Research® 1000, Eppendorf, Hamburg	Pipettieren von Lösungen
Eppendorf Research® 200, Eppendorf, Hamburg	Pipettieren von Lösungen
Gelkammer, Biometra, Göttingen	Agarosegel-Elektrophorese
GeneChip® Fluidics Station 450, Affymetrix, Santa Clara, USA	Waschen von Arrays
GeneChip® Hybridization Oven 640, Affymetrix, Santa Clara, USA	Hybridisieren von Arrays
GeneChip® Scanner 3000 7G, Affymetrix, Santa Clara, USA	Scannen von Arrays
Grant Bio PCV-2400, VWR International, Darmstadt	Zentrifugieren
Grant QBT, VWR International, Darmstadt	Erhitzen
Liebisch Epptherm, Liebisch, Bielefeld	Erhitzen
Mörser, Pistill; VWR International, Darmstadt	Zerkleinern von Gewebeproben
NanoDrop 1000, Fisher Scientific, Schwerte	Bestimmen der Nukleinsäure-Konzentration
Pipetus® akku, VWR International, Darmstadt	Abmessen von Lösungen > 5ml
PTC-200 Peptier Thermal Cycler, MJ Research, Waltham, USA	PCR
T-Personal Thermal Cycler, Biometra, Göttingen	PCR

2.2 PDAC-Proben

Präparation der PDAC-Proben

Gewebeproben aus 70 Primärtumoren von Patienten mit histologisch bestätigtem duktalen Adenokarzinom des Pankreas wurden von der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universität Ulm und Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universität des Saarlandes (Homburg/Saar) bereitgestellt. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Eine Einwilligung zur wissenschaftlichen Verwendung der Proben wurde von allen Patienten unterzeichnet, sowie eine Genehmigung bei der Ethik-Kommission der Universität Ulm und der Universität des Saarlandes eingeholt. Es wurden ausschließlich Proben mit einem für das Pankreaskarzinom hohen Anteil an Tumorzellen (>50%) verwendet. Von den verwendeten 70 Patientenproben stammten 57 % (n = 40) von männlichen und 43% (n = 30) von weiblichen Patienten. Das mediane Alter bei Diagnosestellung lag bei 66 Jahren (♂ = 68 Jahre; ♀ = 63.5 Jahre; jüngster Patient 29 Jahre; ältester Patient 80 Jahre), die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung betrug 15,5 Monate (♂ = 14 Monate; ♀ = 17 Monate). Die kürzeste dokumentierte Überlebenszeit betrug 0 Monate, die längste 48 Monate. Bei 18 Patienten lagen keine Angaben zu Überlebenszeit oder Tumorstatus vor. Diese Proben wurden nur für Kopienzahl-Analysen verwendet, nicht jedoch für prognostische Berechnungen. Für 15 Patienten war eine genaue Überlebenszeit nicht dokumentiert, da die Patienten nach 24 Monaten aus der Überwachung ausschieden. Daten zu allen in dieser Arbeit verwendeten Patientenproben, sowie deren Tumorstatus und die Verwendung auf den eingesetzten Array sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Verwendete Patienten-Proben des duktalen Adenokarzinoms des Pankreas mit Angaben zu Alter, Geschlecht, Tumorstatus, und Überlebenszeit (ÜZ) sowie intern verwendete Probennummern für Affymetrix 250K-, Exon-, und miRNA-Arrays.

Fall	Alter	Geschlecht	Tumorstadium*	ÜZ**	250K	Exon	miRNA
Pp301	29	w	pTx,pNx,pMx	16+	45		
Pp273	33	w	pTx, pNx, pMx	n/a	40		
1851MKE1	35	m	pT3 pN1 pMx GIII R1	7	80	1	
0892UBA1	40	w	pT3, pN1, pM1(HEP), GIII	18	96	7	22
Pp531	42	w	pT3, pN1, pM0, G II-III	n/a	52		
2232MSC1	46	w	pT3 pN1 R0 GII	14	95		8

Fall	Alter	Geschlecht	Tumorstadium*	ÜZ**	250K	Exon	miRNA
0522FOK1	48	m	pT2 pN1 M0, G3	9	71	6	16
1521UTO1	49	m	pT3N1bM0	22	99	21	9
1971AST1	52	m	pT3N1R0 GIII	11	79		
Pp512	53	w	pT3,pN0,pM0,GII	33+	51		
3021BVI1	53	w	pT3, N1, Mx, R0, G II	18	100	10	10
2152TWO1	53	w	pT3 N1Mx V1 L1 R1	+		14	15
3181JRU1	56	m	pT3N1 pMxR1 G III	2	76		1
2852HHA1	59	w	pT1N0M0 GI-II	+	107		
3022BSC1	60	w	pT3N1M1(HEP) G III	3	77		20
Pp287	61	m	pT3,pN1,pMx,GII-III	0	44		
2642HWE1	61	w	pT2N0R0 GIII	10	81		
1051HKR1	61	m	T2, N1b, M0, R0, GI-III	14	98	9	6
2892EHE1	61	w	pT3, N1, Mx, R0, G I - II	+	102	15	29
B38-04	62	w	pT3, pN0, pMx, R1, G II	n/a	3		
Pp539	62	w	pT3,pN0,pM0,GII	8d	53		
Pp689	62	w	pT3, pN0, pM0, G III	n/a	58		
0932JHA1	62	w	pT3N0 Mx R1 G II	16	91		
Pp7	63	w	pT3,pN1a,pM1, GII	13	25		
Pp163	64	m	pT3,pN1,pM1,GIII	2d	35		
Pp147	65	m	pT2,pN0,pM0, GIII	15	34		
0771WST1	65	m	pT1, pN0, pMx, G I, R 0	+	103	12	31
Pp76	66	m	pTx, pNx, pMx	n/a	28		
3561WKO1	66	m	pT3N1 V1 Mx R0 GII	6	89		17
3151FMA1	66	m	pT3N1MxR0 G II	20	94		7
1052MRE1	66	w	pT2 pN0 pMx GII R0	+	105	13	13
2891ABE1	67	m	pT3N1R1 GIII	11	82		2
1311FEN1	67	m	pT3N1 Mx Rx G III	6	84		3
2521MGR1	67	m	pT3N1R0 GIII	+	112		14
Pp671	68	m	pT3, pN1, pM0, G III	n/a	57		
3301HKI1	68	m	R pT3, R pN0 R pMX, GIII, R0	11	74	24	24
3221MPO1	68	m	pT3 pN1 M0 GI	40	114		
3512EDU1	69	w	pT3N1 GII	0	78		18
0581SKR1	69	m	pT3N1R0 G II	5	86		19
3251EKE1	69	m	pT3N1L1R0 GIII	+	109		
Pp276	70	m	pT1,pN0,pM0,GII-III	17+	42		
0181SRA1	70	m	pT3 N1 M0 R0 GII-III	4	73		25
3121EFA1	70	m	pT3, pN1, pMx, pV1, G III, R0	15	97	8	23
1831KST1	70	m	pT2N1a MxR0 G II	+	110		
Pp308	71	m	pTx, pNx, pMx	n/a	46		

Fall	Alter	Geschlecht	Tumorstadium*	ÜZ**	250K	Exon	miRNA
0721PDI1	71	m	pT3 pN0 Mx R1 GIII	5	85		
1541RAS1	71	m	pT3N0R0 GII	+	111		
1252GMO1	72	w	pT3N0R0 GII	28	106		32
0592LHE1	73	w	p T3 N1b M0 R0 GII	5	87	4	4
3452GLU1	73	w	pT3 pN1b pMx G1 R0	1	88	5	5
Pp87	74	m	pT2,pN0,pM1,GIII	1.5	31		
0091JFU1	74	m	pT3N1 GII	22	93		26
2931EHA1	75	m	pT3 N0 Mx R0 G II	16	92		
2492IEN1	76	w	pT3 pN1a M0 G2 R0	48	72	11	28
0692LFE1	76	w	pT3N1R0 GII-III	1	83		
B7143-02	77	m	pT3, pN0, pMx, G III	n/a	10		
2571KST1	80	m	pT3N1MxR0 G I - II	+	104		12
Pp49	n/a	w	n/a	n/a	26		
Pp82	n/a	m	n/a	n/a	30		
Pp668	n/a	m	n/a	n/a	56		
B673-05	n/a	w	n/a	n/a	59		
B4661-05	n/a	m	n/a	n/a	60		
Pp167	n/a	w	n/a	n/a	61		
Pp338	n/a	m	n/a	n/a	63		
Pp410	n/a	w	n/a	n/a	64		
Pp660	n/a	m	n/a	n/a	66		
Pp510	n/a	m	n/a	n/a	67		
1862RRO1	n/a	w	pT3,Nx,MLymR1 GII	33	75		27
1621HME1	n/a	m	pT1N0pMxR0 G II	+	101		11
0832AFU1	n/a	w	pT2N1R0G III	+	108		30

* Tumorklassifikation nach TNM; Neben den in Tabelle 2 beschriebenen Kategorien werden folgende Abkürzungen verwendet: G = Grading, Differenzierungszustand des Tumorgewebes (1 = gut differenziert, 4 = schlecht differenziert); R = Angabe, ob Tumorreste im Patienten nach Therapie verblieben sind (0 = kein Tumor verblieben; 1 = Mikroskopischer Residualtumor an Schnitträndern; 2 = Makroskopischer Tumor oder Metastasen); V = Invasion in Vene (0 = keine Invasion, 1 = mikroskopische Invasion, 2 = makroskopische Invasion); L = Invasion in Lymphgefäße (0 = keine Invasion, 1 = Invasion)

** Die Überlebenszeit ist, sofern nicht anders vermerkt, in Monaten angegeben. "+" gibt das Ausscheiden eines Patienten aus der Überwachung an, bei fehlender Zeitangabe handelt es sich hier um eine Mindest-Überlebenszeit von 24 Monaten

Isolierung von DNA und RNA

Alle Gewebeproben wurden mit Mörser und Pistill zerkleinert, um die Zellen aus dem Zellverband zu lösen und so einen effektiven Zellaufschluss zu ermöglichen. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, die Proben kontinuierlich gefroren zu halten. Dies wurde durch

Kühlung des Mörsers mit Trockeneis, sowie das Abkühlen der Probe, des Pistills und des Skalpells mit flüssigem Stickstoff vor und während des Zerkleinerns gewährleistet.

Die gleichzeitige Isolierung von DNA und mRNA erfolgte mithilfe des „AllPrep RNA/DNA Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein säulenbasiertes Trennungsverfahren („solid phase extraction“), bei dem zuerst wie oben beschrieben Gewebe zerkleinert, und im Anschluss mithilfe einer „QIAshredder“-Säule (Qiagen, Hilden) durch Zentrifugation aufgeschlossen wird. Nach dem Zell-Aufschluss wird die frei in Lösung befindliche DNA an die Membran einer DNA-Isolierungssäule gebunden, während die RNA nicht bindet und in einem zweiten Schritt an die Membran einer RNA-Isolierungssäule gebunden wird. DNA- und RNA-Säulen werden anschließend in mehreren Schritten mit einer ethanolhaltigen Waschlösung gewaschen. Im Fall der RNA-Isolierung wurde in dieser Arbeit vor der Elution zusätzlich eine DNase-I-Behandlung der RNA auf der Membran durchgeführt (15 min, RT). Die an die Säule gebundenen Nukleinsäuren wurden mit dem im Kit enthaltenen Elutions-Puffer (DNA) bzw. Nuklease-freiem H_2O (RNA) eluiert und bei -20 °C (DNA) bzw. -80°C (RNA) bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Isolierung von total RNA

Die Isolierung von total RNA (d.h. auch von kurzen RNAs wie miRNA oder siRNA, die bei normalen säulenbasierten Isolationsverfahren größtenteils verloren gehen würden) wurde mit dem „mirVana™ miRNA Isolation Kit“ (Ambion) bei 31 der 70 PDAC-Proben nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zerkleinerung der Gewebeproben erfolgte wie oben beschrieben mit Mörser und Pistill unter ständiger Kühlung. Die Isolierung der total RNA basiert auf der Kombination eines säulenbasierter Verfahrens („solid phase extraction“) mit der Phenol/Chloroform-Extraktion („organic extraction“) und erlaubt die Isolierung sehr reiner total RNA in hohen Ausbeuten. Die Lagerung der mit Nukleinsäure-freiem H_2O eluierten total RNA erfolgte bei -80°C.

Kommerziell erhältliche total RNA

Zusätzlich zu den selbst isolierten total RNAs wurden fünf kommerziell erhältliche total RNA-Proben gesunder Pankreas von folgenden Firmen bezogen: Ambion (AM7954), BioChain (R1234188-50), Clontech (8062507A, 8081302A) und Stratagene (540023).

Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte im NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Hierbei wird die Absorption einer Probe (1 µl Volumen) in einem Wellenlängenbereich von 220-750 nm photometrisch erfasst und je nach gewählter Einstellung (DNA, ssDNA oder RNA) in eine Nukleinsäure-Konzentration (ng/µl) umgerechnet. Die Umrechnung erfolgt auf der Annahme, dass 1 OD_{260} jeweils 50 mg/ml DNA, 40 mg/ml RNA, bzw. 33 mg/ml ssDNA entspricht. Das vorausgehende Einstellen eines Leerwertes wird je nach Elutions-Methode mit Nukleinsäure-freiem H_2O oder dem entsprechenden Elutions-Puffer durchgeführt. Durch die beiden zusätzlich ausgegebenen Quotienten der Wellenlängen 260/280 nm und 260/230 nm kann außerdem eine mögliche Kontamination mit Proteinen bzw. Lösungsmitteln eingeschätzt werden. Eine vernachlässigbare Kontamination der gemessenen Proben ist dabei jeweils bei einem Quotienten von mindestens 1,8 gegeben.

Agarose-Gelelektrophorese

Die qualitative Analyse von genomischer DNA, RNA und PCR-Produkten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurden 65 ml einfach konzentrierten Puffers (Tabelle 7) je nach benötigter Konzentration mit 0,5 - 1,3 g (entspricht 0,8% - 2% w/v) Agarose versetzt und in einem Erlenmeyer-Kolben erhitzt, bis die Agarose komplett gelöst war. Nach kurzem Abkühlen wurde 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und durch Schwenken des Kolbens mit dem Gel vermischt. Das fertige Gel wurde in eine Gel-Vorrichtung gegossen und am Kathoden-Ende (Minuspol) ein Kamm mit 13 Zähnen eingesetzt. Nach dem Aushärten des Gels wurde dieses in die Gel-Kammer gegeben, mit einfach konzentriertem TAE Puffer etwa 3-4 mm überschichtet, und der Kamm entfernt.

Zur Größenbestimmung der aufzutrennenden Proben wurde je nach Bedarf einer der folgenden Längenstandards aufgetragen: 50 bp DNA Ladder (NEB, Ipswich, MA), GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, bzw. GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (beide Fermentas, St. Leon-Rot).

Je 1-10 µl Probe wurde mit 1-2 µl Probenauftragspuffer („Loading Dye“, Fermentas, St. Leon-Rot) gemischt und in eine der vorgeformten Taschen des Gels pipettiert. Die anschließende Auftrennung der Nukleinsäuren nach Größe erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes (10 V/cm Elektrodenabstand) und wurde gestoppt, wenn die bei etwa 200 bp laufende Bromphenolblau-Front das letzte Viertel der zur Verfügung stehenden Laufstrecke erreicht hatte.

Das Gel wurde anschließend auf einen Transilluminator bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm betrachtet und in Form eines gedruckten Bildes und einer digitalen Kopie dokumentiert.

Tabelle 7: : Zusammensetzung des TAE Puffers (50x)

Komponente	Einwaage [g]	Konzentration
Tris-Acetat	242,2	2 M
EDTA	37,2	100 mM
H_2O	ad 1000 ml	

2.3 Durchführung der Microarray-Experimente

Affymetrix 250K Nsp SNP Arrays

Für die Analyse genomischer DNA im Hinblick auf Aberrationen, SNPs und LOHs wurden Affymetrix 250K Nsp Arrays verwendet. Diese decken das humane Genom mit etwa 260.000 Probesets, die im Durchschnitt einen physischen Abstand von 5,8 kb aufweisen, ab. Affymetrix 250K Nsp Arrays gehören zu einem Set von zwei Array-Typen, bei denen die Proben vor dem Amplifikationsschritt mit unterschiedlichen Enzymen (*Nsp*I und *Sty*I) geschnitten werden und die dadurch entstehenden DNA-Fragmente unterschiedliche genomische Bereiche repräsentieren. Aufgrund des höheren Hintergrundrauschens der GeneChip 250K Sty Arrays wurde die Analyse der Proben aber ausschließlich auf GeneChip 250K Nsp Arrays durchgeführt.

Die Proben wurden nach dem von Affymetrix bereitgestellten Protokoll für den 250K Nsp-Array bearbeitet (Abbildung 9). Hierbei wurden 250 ng einer DNA-Probe durch *Nsp*I geschnitten und an den entstandenen überhängenden Schnittstellen ein dazu passender Adapter ligiert. Über einen zum Adapter komplementären Primer wurden die DNA-Fragmente anschließend in einer Ein-Primer-Amplifikation amplifiziert. Die PCR-Bedingungen (Tabelle 8) sind dabei von Affymetrix so vorgegeben, dass bevorzugt Fragmente mit einer Länge von 200-1100 bp vervielfältigt werden, wodurch eine starke Verringerung der Komplexität des genomischen Materials erreicht wird.

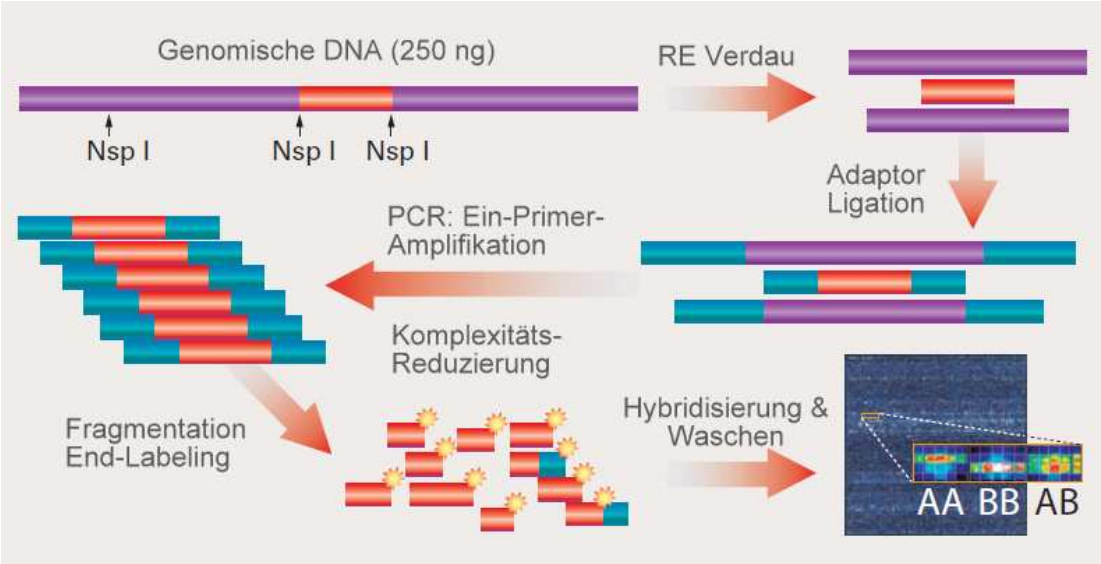


Abbildung 9: Schematischer Ablauf der Probenvorbereitung für den Affymetrix 250k Nsp Array (Verändert nach http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/500k_datasheet.pdf)

Tabelle 8: PCR-Bedingungen des Amplifikations-Schrittes für Affymetrix 250K Nsp Arrays

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	94 °C	500 sec	
Denaturierung	94 °C	30 sec	30 Zyklen
Annealing	60 °C	45 sec	
Elongation	68 °C	15 sec	
Abschließende Elongation	68 °C	420 sec	
Kühlen	4 °C	∞	

Im Anschluss an die Amplifikation des Probenmaterials erfolgten die Fragmentation und das „Labeling“ der Proben. Hierbei wird die amplifizierte DNA durch das Enzym DNase I an definierten Stellen geschnitten und anschließend die entstandenen Fragmente mit Biotin versehen („Labeling“). Die fertig bearbeitete Probe wurde im Anschluss im „Hybridisierungs-Mix“ (Tabelle 9) gelagert.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Hybridisierungs-Mixes

Komponente	Volumen (µl) pro Ansatz
MES Stock Buffer (12x)	12
Denhardt's Solution (50x)	13
EDTA (0.5 M)	3
HSDNA (10 mg/ml)	3
OCR, 0100	2
Human Cot-1 DNA® (1 mg/ml)	3
Tween-20 (3%)	1
DMSO (100%)	13
TMACL (5 M)	140

Im Hybridisierungs-Mix befinden sich neben der Probe und Puffersubstanzen unter anderem Kontroll-Oligonukleotide (OCR; „Oligo Control Reagent"), die eine Positiv-Kontrolle für die Array-Daten darstellen und zusätzlich als Orientierungspunkte für das Raster („Grid") fungieren. Das Raster wird zum späteren Auslesen der einzelnen Intensitätswerte benötigt. Eine Ansicht dieser hybridisierten Kontroll-Oligonukleotide ist in Abbildung 10 dargestellt.

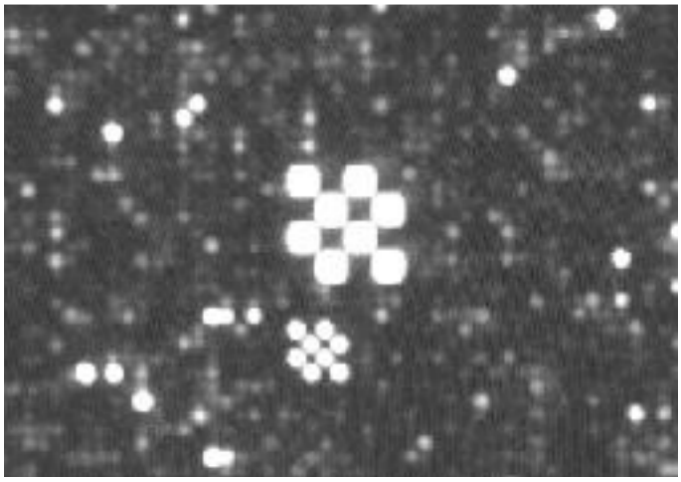


Abbildung 10: Ausschnitt aus einem gescannten Affymetrix Microarray. In der Mitte der Abbildung sind die durch Kontroll-Oligonukleotide definierten Punkte für die Ausrichtung des Rasters zu sehen.

Der fertige Hybridisierungs-Mix wird anschließend auf den Affymetrix 250K Nsp Array gegeben und für 16-18 h bei 49 °C und 60 Upm in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Nach dem Entfernen der ungebundenen DNA-Fragmente werden die auf dem Array gebundenen, mit Biotin versehenen DNA-Fragmente gefärbt. Hierbei wird zuerst der Fluoreszenz-Farbstoff

SAPE (Streptavidin Phycoerythrin) an das Biotin der auf dem Array gebundenen DNA-Fragmente gekoppelt. Im zweiten Schritt wird ein Biotin-gekoppelter Antikörper, der an SAPE bindet, eingesetzt. An diesen Antikörper wird im dritten Schritt erneut der Fluoreszenz-Farbstoff SAPE angehängt, um so eine Verstärkung der Gesamt-Fluoreszenz zu erreichen.
Alle Wasch- und Färbe-Schritte werden vollautomatisch in der Affymetrix Fluidics Station 450 durchgeführt. Die hierfür verwendeten Waschlösungen (Wash A und Wash B) sowie Färbe- bzw. Antikörper-Lösungen sind in den Tabellen 10-13 dargestellt. Die verwendeten Waschlösungen wurden vor Verwendung durch einen Sterilfilter (0,2 µm) gefiltert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des „Wash A"-Waschpuffers

Komponente	Volumen (ml)	Endkonzentration
SSPE (20x)	300	6 x
Tween-20 (10%)	1	0.01%
H_2O	Ad 1000 ml	

Tabelle 11: Zusammensetzung des „Wash B"-Waschpuffers

Substanz	Volumen (ml)	Endkonzentration
SSPE (20x)	30	0.6 x
Tween-20 (10%)	1	0.01 %
H_2O	Ad 1000 ml	

Tabelle 12: Zusammensetzung des „Array Holding"-Puffers

Komponente	Volumen (ml)	Endkonzentration
MES Stock Buffer (12x)	8.3	1 x
NaCl (5M)	18.5	0.92 M
Tween-20 (10%)	0.1	0.01 %
H_2O	Ad 100 ml	

Tabelle 13: Zusammensetzung des „Stain Buffer" je Probe

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration
SSPE (20x)	360	6 x
Tween-20 (3 %)	3.96	0.01 %
Denhardt's solution (50x)	24	1 x
H_2O	Ad 1188 µl	

Der Färbe-Puffer („Stain Buffer“) wurde in Volumen von 2x 594 µl für die SAPE-Lösung, bzw. die Antikörper-Lösung verwendet. Für die SAPE-Lösung („Sape Solution Mix“) wurden 594 µl Färbe-Puffer mit 6 µl Streptavidin Phycoerythrin (SAPE; 1 mg/ml) gemischt. Für die Antikörper-Lösung („Antibody Solution Mix“) wurden 594 µl Färbe-Puffer mit 6 µl biotinyliertem Antikörper (0,5 mg/ml) gemischt. SAPE-, Antikörper- und „Holding Buffer“-Lösungen wurden wie im Protokoll angegeben in der Waschstation verwendet.

Nach dem Färben des an den Array hybridisierten Probenmaterials wurden die Arrays eingescannt (Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G). Hierbei wird die Fluoreszenz durch einen Argon-Laser (488 nm) angeregt und die von dem auf dem Array gebundenen merkiertem Probenmaterial emittierte Fluoreszenzintensität (570 nm) für jedes einzelne Probeset gemessen

Die Qualitätskontrolle der eingescannten Arrays erfolgte über die so genannte „Call Rate“. Dabei werden durch die „Genotyping Console“-Software die Probesets für beide Ausprägungen eines SNP verglichen und je nach Intensität den Allelen A, B oder AB zugeordnet. Je höher die Rate der erfolgreichen Zuordnung der Allele ist, desto besser ist im Allgemeinen die Qualität der Daten eines Arrays. Eine „Call Rate“ von 0,9 würde beispielsweise bedeuten, dass bei 90% aller untersuchten SNPs eine eindeutige Zuordnung möglich war. Negativen Einfluss auf diesen Qualitätswert kann zum einen schlechte Qualität des Probenmaterials, zum anderen aber der Verlust beider Allele in einer Region haben. Die „Call Rate“ sollte nach Angaben von Affymetrix nicht weniger als 0,87 betragen. Proben mit guter DNA-Qualität und wenigen chromosomalen Aberrationen liegen im Normalfall bei mehr als 0,95.

Affymetrix GeneChip® Human Exon 1.0 ST Arrays

Die von Affymetrix ab 2008 produzierten GeneChip® Human Exon 1.0 ST Arrays erlauben sowohl die Bestimmung der relativen Expression eines Transkriptes, als auch der relativen Expression einzelner Exons, wodurch die Analyse von alternativen Transkript-Varianten ermöglicht wird. Neben den in Tabelle 6 aufgelisteten Patientenproben (n = 15) wurden fünf Proben von gesunder Pankreas auf den Affymetrix Exon Arrays untersucht.

Die Probenvorbereitung erfolgte nach dem von Affymetrix bereitgestellten Protokoll. Hierbei wird in den Proben enthaltene mRNA über mehrere Schritte (ähnlich dem oben beschriebenen

Protokoll für die Affymetrix 250K Nsp Arrays) amplifiziert, fragmentiert und mit Biotin versehen. Die Proben werden anschließend in den Hybridisierungs-Mix überführt und für 16-18 h bei 45 °C und 60 Upm im Hybridisierungsofen auf die Arrays hybridisiert. Das anschließende Waschen der Arrays erfolgte hierbei nicht wie bei den Affymetrix 250K Nsp Arrays mit selbst hergestellten Lösungen, sondern mit im Kit enthaltenen Waschlösungen und Puffern. Nach dem Waschen und Anfärben mit SAPE wurden die Arrays eingescannt.

Die Qualitätskontrolle erfolgt über die „Expression Console"- Software von Affymetrix. Der ausgegebene „pos vs neg AUC"-Wert (Area Under Curve) wird aus der Verteilung von wahr-positiven und falsch-positiven Kontrollen ermittelt (Abbildung 11), und sollte laut Herstellerangaben bei mindestens 0,8 liegen.

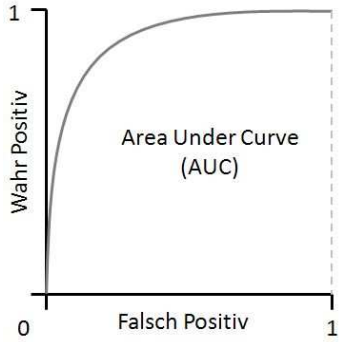


Abbildung 11: Darstellung des AUC-Wertes („Area Under Curve"). Dieser ergibt sich aus der Fläche unter der Kurve, die sich durch Auftragung von wahr-positive gegen falsch-positive Kontrollen ergibt.

Affymetrix GeneChip™ miRNA Arrays

Das Protokoll für Affymetrix GeneChip™ miRNA Arrays kommt, anders als die beiden oben genannten Arrays, ohne eine Amplifikation des Probenmaterials aus: Je 1 µg total RNA wird hierbei unter Verwendung des FlashTaq Biotin HSR RNA Labeling Kit (Genisphere, Hatfield, PA) mit Biotin versehen und nach den Vorgaben des Herstellers auf einen Affymetrix GeneChip™ miRNA Array hybridisiert (16-18h, 48 °C, 60 Upm). Nach dem Waschen und Färben der Arrays in der Wachstation werden die Arrays gescannt. Neben den in Tabelle 6 aufgelisteten PDAC-Proben wurden fünf Proben der kommerziell erworbenen total RNA auf miRNA-Arrays analysiert.

2.4 Datenanalyse

Normalisierung

Die im Scanner gemessene Fluoreszenz-Intensität hängt von der Menge des an ein Probeset gebundenen Probenmaterials ab und unterliegt, bedingt durch experimentelle und technische Varianz, von Array zu Array leichten Schwankungen. Um Microarray-Daten vergleichen zu können ist eine Normalisierung der Roh-Intensitäten daher essentiell. Bei einer Normalisierung werden nicht-probenspezifische Abweichungen durch den Einsatz statistischer Verfahren korrigiert. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren zur Normalisierung, die sich je nach Einsatzzweck unterschiedlich gut eignen. Für die in diesem Projekt generierten Daten wurden folgende Normalisierungs-Methoden angewendet:

Normalisierung gegen einen Satz von eigenen Referenzen

Im Fall der Affymetrix 250K Nsp Arrays wurden die Rohdaten gegen einen Satz von eigenen Referenzen normalisiert. Hierbei werden die Intensitäten der einzelnen Proben von der CNAG-Software (Version 2.0; http://www.genome.umin.jp) analysiert und automatisch 3-5 geeignete Referenzen gewählt, die zu den untersuchten Proben passen ("best-fit reference set"). Die Roh-Intensitäten der einzelnen Arrays werden anschließend anhand dieser Referenz-Proben entsprechend korrigiert. Als Referenzpool dienten in dieser Arbeit Daten von 12 im selben Labor bearbeiteten Proben von genomischer DNA aus Lymphozyten gesunder Spender. Eigene Daten bieten gegenüber frei verfügbaren Referenzdaten den Vorteil, dass Labor-spezifische Effekte minimiert werden und im Normalfall das Hintergrundrauschen der normalisierten Intensitäten geringer ist.

Diese Normalisierungs-Methode eignet sich gut für Proben mit real existierenden großen Unterschieden in der Intensität, wie beispielweise dem Fehlen einer Kopie eines Chromosoms, da diese nicht mit in die Berechnung einfließen, sondern der Normalwert für jedes Probeset anhand des Referenzsatzes errechnet wird.

RMA (Robust Multi-Array Analysis)

Bei der Normalisierung mittels RMA wird von der Annahme ausgegangen, dass die Verteilung aller Intensitäten in allen untersuchten Proben ähnlich ist. Als Referenzprobe wird aus den gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten ein Array ermittelt, dessen mediane Intensität der medianen Intensität aller untersuchten Fälle entspricht. Die Verteilung der Intensitäten über den Array werden als Grundlage genommen, an die die Werte der anderen Arrays angepasst werden. Diese Methode hat vor allem Vorteile bei Expressions-Daten und wurde in

der vorliegenden Arbeit für die Normalisierung der Affymetrix Exon 1.0 ST Arrays verwendet.

Quantils-Normalisierung

Bei der von der Arbeitsgruppe von Terry Speed entwickelten nicht-parametrischen Normalisierungsmethode (Bolstad et al. 2003) wird von der Annahme ausgegangen, dass die Verteilung aller Gene in allen untersuchten Proben ähnlich ist. Die Intensitätswerte für jeden Array werden nach Größe sortiert und für jedes Quantil der Median über alle Arrays berechnet. Durch diesen Wert werden die Intensitätswerte aller Proben eines Quantils ersetzt und alle Werte anschließend wieder in die Original-Reihenfolge zurück-sortiert.
In einer vergleichenden Arbeit zu Normalisierungs-Verfahren bei miRNA Microarrays konnte gezeigt werden, dass die Quantils-Normalisierung gegenüber anderen Verfahren wie VSN („Variance Stabilizing Normalization“) oder „Invariant Normalization“ die besten Ergebnisse erzielt (Pradervand et al. 2009). Aus diesem Grund wurde die Quantils-Normalisierung in dieser Arbeit für die Normalisierung von miRNA-Array-Intensitäten eingesetzt.

Affymetrix 250K Nsp Arrays – Kopienzahl-Analyse

Die Normalisierung der Daten von Affymetrix 250K Nsp Arrays erfolgte in der CNAG-Software (Version 2.0; http://www.genome.umin.jp). Hierbei kann die Normalisierung als gepaarte oder ungepaarte Analyse durchgeführt werden. Bei einer gepaarten Analyse wird neben Tumorprobe auch eine Probe des korrespondierenden Normalgewebes benötigt, wovon dann die Software Bereiche mit geringer Varianz und geringem Abstand zueinander ermittelt werden. Anhand dieser Regionen werden die beiden Fälle anschließend normalisiert. Eine gepaarte Analyse hat ihren Vorteil darin, dass selbst bei großen Aberrationen die Daten sehr wenig durch die Normalisierung beeinflusst werden, und dass durch das direkte Vergleichen beider Proben Aberrationen (z. B. CNVs) entfernt werden, die auch in der Normal-Probe vorkommen. Eine ungepaarte Analyse erfolgt wie oben beschrieben durch Normalisierung an einem Referenz-Datensatz. Da in dieser Arbeit keine korrespondierenden Normalgewebe des Pankreas verfügbar waren, wurden die Daten in einer ungepaarten Analyse normalisiert. Die normalisierten Rohintensitäten konnten entweder direkt in CNAG visualisiert, oder einzeln als .txt-Datei ausgegeben werden.
Für die Verwendung im R-Package DNAcopy wurden die Rohdaten der einzelnen Fälle entsprechend formatiert. Bei der anschließenden Analyse der Daten mithilfe dieser Software wurde durch statistische Verfahren eine Glättung der Daten („smoothing“) und anschließend

eine Segmentierung durchgeführt. Hierbei wird von der Software mithilfe geeigneter Algorithmen nach Segmenten gesucht, die ähnliche Intensitäten haben, und diese dann als ein zusammenhängendes Segment ausgegeben.
Die ausgegebene Liste von Segmenten wurde anschließend manuell so gefiltert, dass nur Segmente mit mehr als drei aufeinanderfolgenden SNPs und einer Abweichung von mehr als 0.15 bzw. -0.15 erhalten blieben. Abschließend wurden die Daten für jeden einzelnen Fall so formatiert, dass die Fälle in den Ideogram Browser (Müller et al. 2007) eingeladen werden konnten. Der Ideogram-Browser erlaubt die parallele und übersichtliche Darstellung von genomischen Veränderungen in einer Vielzahl von Fällen (Abbildung 12).

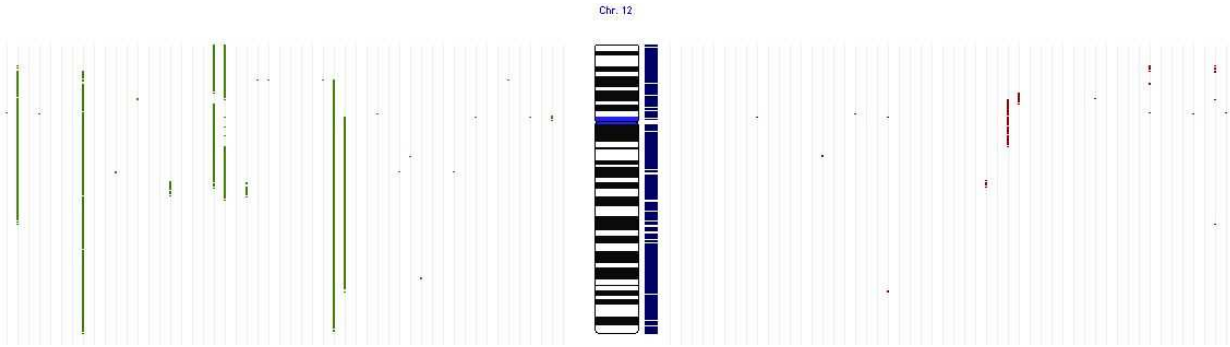


Abbildung 12: Parallele Darstellung von Verlusten (links, grün) und Zugewinnen (rechts, rot) auf Chromosom 12 bei 52 Pankreaskarzinom-Fällen in der Ideogram Browser-Software

Zusätzlich zur Analyse der Kopienzahl wurden alle vorhandenen Fälle visuell mit den Programmen CNAG und dChip untersucht, um rekurrent veränderte Regionen zu identifizieren. Da eine visuelle Identifikation von aberranten Regionen in vielen Fällen subjektiv erfolgt, wurden nur Regionen als rekurrent verändert angesehen, wenn die betreffende Region in mindestens 30% aller Fälle aberrant verändert war.

Affymetrix 250K Nsp Arrays – SNP-Analyse

Für die Berechnung von prognostischen SNPs wurden mittels der CNAG-Software die Genotypen (A, AB, oder B) der einzelnen Fälle ausgegeben. Diese Genotypen wurden mittels eines von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kestler aus der Abteilung Neuroinformatik der Universität Ulm entwickelten Algorithmus hinsichtlich der Überlebenszeit nach Diagnosestellung untersucht. Hierdurch konnten 81 SNPs identifiziert werden, bei denen eine signifikante Korrelation zwischen SNP-Status und Überleben der PDAC-Patienten vorlag.

Diese SNPs wurden anschließend mittels der Online-Applikation „is-rSNP“ auf Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (TF) untersucht. Diese Software identifiziert anhand der Sequenz um die betroffene Position (29 Basen upstream, bzw. downstream des SNP) Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die durch den Austausch des SNP-Nukleotids (z. B. T anstelle von C) aktiv oder inaktiv werden, und gibt anschließend alle gefundenen TF-Bindestellen aus. Derartige SNPs werden rSNP (regulatorischer Einzelnukleotid Polymorphismus) genannt.

Neben den Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wurde jeder SNPs durch Darstellung im UCSC Genome Browser auf seine genomische Position hin überprüft. Hier stand die Lage außer- oder innerhalb von Genen, bzw. in bekannten Kopienzahl-Variationen (CNV) im Fokus. Außerdem wurden annotierte und tatsächlich in den Proben gefundene Allel-Frequenzen (p(A) und p(B)) verglichen. Eine Zusammenstellung der detektierten SNPs mit Angabe aller untersuchten Parameter befindet sich im Anhang in Tabelle 26.

Zusätzlich zur Analyse mittels „is-rSNP“ wurden die SNPs mit der GRAIL-Software (Raychaudhuri et al. 2009) untersucht. GRAIL (Gene Relationships Among Implicated Loci) wurde entwickelt, um Krankheits-assoziierte Gene in gegebenen Regionen zu identifizieren. Hierbei wird von der Annahme ausgegangen, dass sich in jeder gegebenen Region ein für eine Krankheit relevantes Gen befindet. Die zu untersuchenden Regionen („Disease regions“) werden zum einen durch den gegebenen SNP, zum anderen durch die Rekombinations-Hotspots, die diesen SNP flankieren, definiert. Die in diesen Regionen gefundenen Gene werden durch sogenanntes „Text-Mining“ in der Literaturdatenbank PubMed charakterisiert und auf Ähnlichkeiten zu anderen in den SNP-Regionen gefundenen Genen hin untersucht. Diese Methode bietet gegenüber festen Datenbanken den Vorteil, dass zum einen ein viel breiteres Spektrum von potentiellen Zusammenhängen erfasst wird, zum anderen keine aufwändige Pflege von Datenbanken mit Krankheits-Assoziationen nötig ist. In einem Testlauf bei verschiedenen anderen Krankheiten konnten von Raychaudhuri und Kollegen so wichtige Krankheits-assoziierte Gene detektiert werden.

Affymetrix 250K Nsp Arrays – LOH-Analyse

Durch eine weitere bioinformatische Analyse, die von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kestler aus der Abteilung Neuroinformatik der Universität Ulm durchgeführt wurde, konnten eine Vielzahl von SNPs identifiziert werden, die im Falle eines LOH eine signifikante Korrelation mit dem Überleben der PDAC-Patienten aufwiesen.

Da durch die Analyse über 37.000 signifikante einzelne SNPs identifiziert werden konnten, wurden diese in Regionen zusammengefasst Die Einteilung der SNPs in Regionen erfolgte manuell unter Zuhilfenahme der Annotationstabelle für Affymetrix 250K NSP Arrays (Release 30, hg 18). Die Bedingung für eine prognostische LOH-Region war hierbei eine Mindestanzahl von zwei SNPs mit einer Signifikanz von $p < 0,01$.

Da die Proben für die Berechnung in Gruppen eingeteilt wurden, kann es vorkommen, dass eine prognostische LOH-Region z. B. nur in 1 von 49 Fällen auftritt. Um solche Effekte zu verhindern wurde pro Gruppe eine Mindestanzahl von vier Fällen angesetzt. Die Ermittlung der in den Regionen gelegenen Gene erfolgte anschließend mittels der „Table Browser"-Funktion des UCSC Genome Browsers. Hierbei werden die in einer gegebenen Region gelegenen Gene und bisher nicht charakterisierten Transkripte abgefragt und ausgegeben.

Um mögliche Zusammenhänge der hierbei idenfizierten Gene mit Krankheiten aufdecken zu können, wurde eine „Gene Set Enrichment"-Analyse (GSEA) durchgeführt. Hierbei werden die gegeneben Gene mit Gen-Sets verglichen, die im Verlauf von anderen Studien generiert wurden (z. B. Gene, die in Brustkrebs differentiell exprimiert sind). Durch statistische Verfahren kann eine signifikante Anreicherung der gegebenen Gene in verschiedenen Gen-Sets überprüft werden, und so Hinweise auf potentiell in Verbindung mit Krankheiten stehenden Genen liefern.

Affymetrix Exon 1.0 ST Arrays

Die Auswertung der Exon Array Daten erfolgte in den nicht-kommerziellen Softwarepaketen oneChannelGUI und easyExon. In beiden Fällen wird von der Software zuerst eine RMA-Normalisierung und eine Transformation der Intensitäten in log2-Werte durchgeführt. Anschließend werden Probesets herausgefiltert, die im Bereich des Hintergrundrauschens liegen und somit statistisch als nicht exprimiert angesehen werden (DABG, „detection above background"). Für die Bestimmung des Hintergrundrauschens befindet sich auf den Arrays

spezielle „background-probes“, über die sich sehr exakt die jeweilige Intensität des Rauschens (auch im Hinblick auf unterschiedlichen GC-Gehalt) bestimmen lässt. In beiden Software-Paketen wurde danach eine statistische Detektion von Probesets durchgeführt, die sich durch eine abweichende Expression innerhalb eines Transkripts zwischen zwei Gruppen auszeichnen (MiDAS, „Microarray detection of alternative splicing“). In oneChannelGUI wurde neben der Detektion durch MiDAS zusätzlich eine Filterung nach dem sogenannten Splice-Index durchgeführt (SI > 0,5). Dieser ist ein deutlicher Indikator für das Abweichen einzelner Probesets eines Transkriptes zwischen zwei Gruppen. Die Berechnung des Splice-Index ist im Folgenden dargestellt:

$$Gen - Level\ Normalisierte\ Intensität\ (NI) = \frac{Intensität\ eines\ Probeset}{Expressionslevel\ des\ Transkriptes}$$

$$Splice\ Index = log2\ \frac{Gruppe\ 1\ NI}{Gruppe\ 2\ NI}$$

In easyExon wurde neben der Detektion durch MiDAS auch der PAC-Algorithmus für die Detektion von alternativen Transkriptvarianten eingesetzt (PAC < 0,5). Bei PAC („Pattern based correlation“) wird anhand der Intensitäten aller Exons ein Erwartungswert für jedes einzelne Exon errechnet. Ist die tatsächlich vorhanden Intensität außerhalb dieses Erwartungswertes, wird das betreffende Exon als potentiell verändert angegeben.
Um im Vergleich zu vorherigen Untersuchungen eine verbesserte Quote von wahr-positiven alternativ gespleißten Transkripten zu erreichen wurden die Ergebnisse von oneChannelGUI und easyExon verglichen und die Schnittmenge für weitere experimentelle Validierungen verwendet. Ein in dieser Arbeit als alternativ gespleißt detektiertes Gen ist in Abbildung 13 dargestellt. Eine Auflistung der TOP 100 von oneChannelGUI und easyExon als differentiell gespleißt detektierten Gene befindet sich im Anhang in den Tabellen 30 und 31.

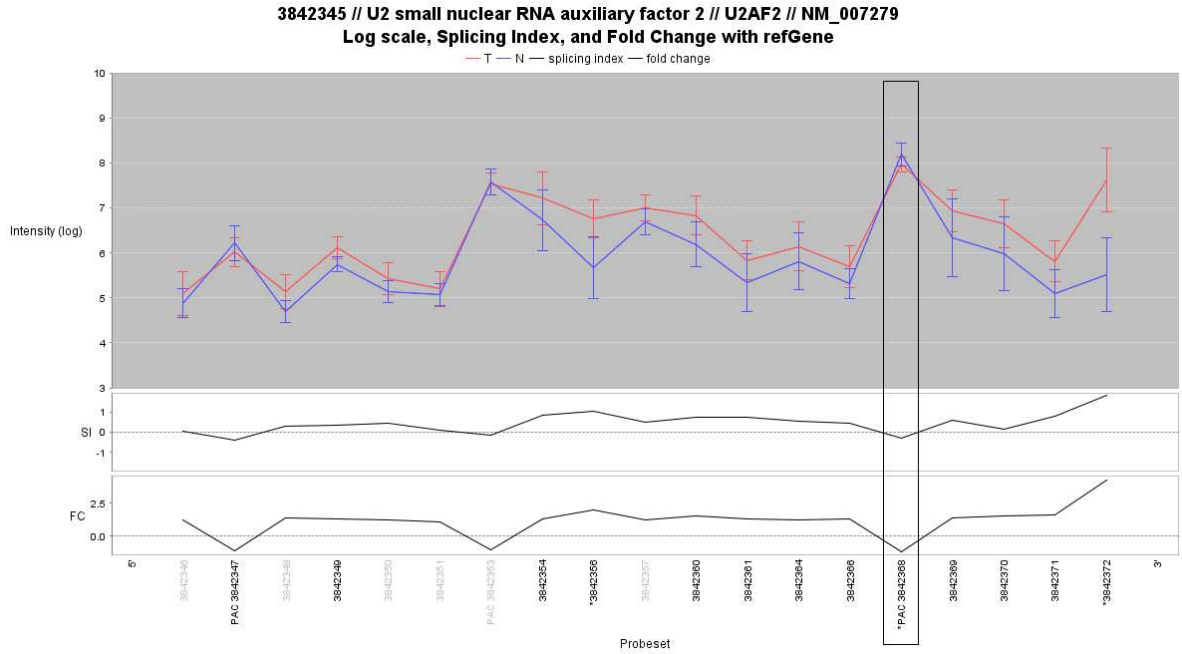


Abbildung 13: Analyse von differentiellem Spleißen des Transkriptes U2AF2 in der easyExon-Software. Das markierte Probeset wurde sowohl durch den MiDAS- als auch den PAC-Algorithmus als differentiell gespleißt detektiert.

Neben der Analyse von differentiellem Spleißen wurde in oneChannelGUI nach RMA-Normalisierung und DABG-Filterung die differentielle Gen-Expression analysiert. Hierbei wurden differentiell exprimierte Gene zwischen Tumor-Proben (n = 15) und Proben von Normalgewebe des Pankreas (n = 6), sowie zwischen Patienten mit kurzem (n = 5) und langem (n = 5) Überleben ermittelt (FC > 1,5; $p < 0,05$).

GoMiner-Analyse betroffener Signalwege

Auf Basis der als differentiell gespleißt detektierten Gene wurde eine Analyse der betroffenen Signalwege durchgeführt. Dabei wurde eine Liste der als verändert detektierten Gene durch die GoMiner-Software analysiert. Diese greift auf die „Gene Ontology“-Datenbank zu, die Gene nach Funktion, Lokalisation und Zellbestandteil klassifiziert und diese in weitere Untergruppen unterteilt. Die Software simuliert eine Zufallsverteilung einer gleichen Anzahl von Genen und vergleicht diese anschließend mit der realen Verteilung der eingegebenen Gene. Hierdurch können überdurchschnittlich oft betroffene Kategorien detektiert werden.
Die ausgegebene Liste der Genfunktion wurde manuell nach Anzahl der Gene pro Kategorie (> 10; < 500), und nach Signifikanz ($p < 0,05$) gefiltert. Die Filterung nach Genen pro Kategorie ist nötig, da die „Gene Ontology“-Datenbank als Baumstruktur aufgebaut ist, die sich immer weiter verzweigt. Gene aus sehr kleinen Gruppen sind ebenfalls in den darüber

liegenden Ebenen zu finden, die Gruppen sind jedoch aufgrund der kleinen Größe statistisch gesehen problematisch bei der Berechnung eines p-Wertes und zudem nur bedingt aussagekräftig. Gruppen mit sehr vielen Genen beschreiben nur sehr allgemeine Funktionen, wie zum Beispiel “biological regulation“ oder „cellular metabolic process“, und sind daher nicht zur genaueren Charakterisierung geeignet. Ein Beispiel für das Ergebnis einer GO-Analyse ist in Abbildung 14 dargestellt. Eine gekürzte Tabelle der bei dieser Analyse detektierten Signalwege ($p < 0,001$) befindet sich in Anhang in Tabelle 32.

A)	B)	C)	D)	E)
GO ID	Total	Change	P-Value	Term
8305	30	11	<0.0001	integrin complex
5925	41	16	<0.0001	focal adhesion
5924	46	16	<0.0001	cell-substrate adherens junction
30055	50	16	<0.0001	cell-matrix junction
5178	62	19	<0.0001	integrin binding
42098	66	18	<0.0001	T cell proliferation
18108	77	22	<0.0001	peptidyl-tyrosine phosphorylation
18212	79	23	<0.0001	peptidyl-tyrosine modification
43123	84	21	<0.0001	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade

Abbildung 14: GoMiner-Ausgabetabelle der Genfunktion. A) Identifikationsnummer für eine GeneOntology-Kategorie, B) Anzahl aller Gene in dieser Kategorie, C) Anzahl der veränderten Gene, D) Signifikanz, E) Kategorie

Affymetrix miRNA Arrays

Die Normalisierung und Ausgabe der Rohintensitäten von Affymetrix miRNA Arrays erfolgte in dem von Affymetrix entwickelten „miRNAQCTool“. Hierbei wurde zuerst durch nicht-genomischer „Background“-Probes die Intensität des Hintergrundrauschens ermittelt. Anhand dieses Wertes wurden anschließend miRNAs ermittelt und entfernt, die nicht exprimiert waren (DABG; $p < 0,05$). Anschließend erfolgte eine Hintergrundkorrektur, bei der die Intensitätswerte von GC-reichen Regionen korrigiert wurden. Um Werte verschiedener Arrays vergleichen zu können, wurde abschließend eine Quantils-Normalisierung der verbliebenen Intensitätswerte durchgeführt.

Die Analyse der Expression von miRNAs zwischen Tumor- ($n = 31$) und Normalgewebe-Proben ($n = 5$) erfolgte in der Software „BRB Array Tools“ ($FC > 1,5$; $p < 0,05$). Die anschließend durchgeführte Kaplan-Meier-Analyse der Expression von miRNAs hinsichtlich der Überlebenszeit bei PDAC Patienten erfolgte ebenfalls in den „BRB Array Tools“ ($FC > 1,5$; $p < 0,05$).

2.5 Validierung der Ergebnisse

Um die durch Berechnungen am Computer gewonnen Ergebnisse zu verifizieren wurde eine Validierung an ausgewählten Fällen durchgeführt. Die Validierung erfolgte dabei durch qRT-PCR bzw. PCR.

Validierung der von genomischen Aberrationen aus Affymetrix 250K Daten

Die Validierung von genomischen Aberrationen erfolgte über eine quantitative realtime-PCR (qRT-PCR). Diese läuft wie eine normale PCR in zyklischen Temperaturschritten ab, wobei DNA durch Gen-spezifische Primer gezielt amplifiziert wird. In Gegensatz zu einer PCR befindet sich allerdings ein Fluoreszenz-Farbstoff (SYBR Green I) im Reaktionsansatz, der sich in die neu gebildete doppelsträngige DNA einlagert. Durch den dabei entstehenden DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex wird Licht mit einer Wellenlänge von 494 nm absorbiert und bei einer Wellenlänge von 521 nm emittiert. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenz im Reaktionsansatz gemessen, was einen direkten Rückschuss auf die Menge an amplifiziertem Produkt ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür der „SYBR Green PCR Master Mix“ von Invitrogen eingesetzt, der auf dem Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green I basiert. Die für diese Analyse verwendeten Primer wurden so entworfen, dass ein 200-500 bp langes Fragment in den betroffenen Regionen amplifizieren wurde, und so, im direkten Vergleich mit anderen untersuchten Proben, ein Rückschluss auf die Kopienzahl des untersuchten DNA-Abschnittes möglich war. Alle Primer wurden, bedingt durch die Vorgabe des verwendeten Kits, für eine Tm von 60 °C entworfen. Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte mittels eines „GeneAmp® PCR System 9700“ Cyclers von Applied Biosystems. Für jede gemessene Probe wurde der Ansatz in Triplikaten durchgeführt, um technische Varianz zu minimieren. Anschließend wurden die ΔT-Werte (Wert, bei dem eine festgelegtere Fluoreszenz-Intensität überschritten wird) ausgeben. Zur Quantifizierung einzelner Proben wurde die Differenz des ΔT-Wertes von Referenz und Probe (jeweils Durchschnittswert der Triplikate) gebildet und diese als Potenz für die Zahl 2 verwendet ($2^{\text{Differenz}}$). Der daraus gebildete Kehrwert entspricht dem Mengenverhältnis von Referenz zu Probe.

$$fold\ change = 1/(2^{\Delta T\ \text{Referenz} - \Delta T\ \text{Probe}})$$

Validierung von detektierten Transkript-Varianten

Die Validierung von durch *in silico* Analysen der Exon-Array-Daten gefundenen alternativen Transkript-Varianten erfolgte durch PCR. Dabei wurden die Primerpaare so gewählt, dass diese an die Sequenz der beiden benachbarten Exons binden und so ein PCR-Produkt erzeugen, welches das zu untersuchende Exon einschließt. Ein Schema dieser Methode ist in Abbildung 15 dargestellt. In Ausnahmefällen, beispielsweise bei ungünstigen Sequenzen einzelner Exons, wurden die Primer in weiter entfernte Exons gelegt. Durch die Vorhersagbarkeit möglicher Fragment-Längen ist nach Analyse der Fragmente auf einem Agarosegel eine Zuordnung einzelner PCR-Produkte durch Abgleich mit einer *in silico* PCR (NCBI PrimerBlast) möglich.

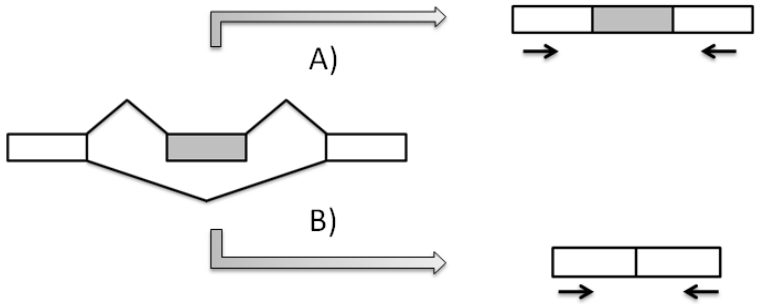


Abbildung 15: Schema der Validierung von Transkript-Varianten durch PCR. Die flankierenden Primer erzeugen dabei je nach Vorhandensein (A) oder Fehlen (B) des zu untersuchenden Exons unterschiedlich lange DNA-Fragmente.

Die zum Erstellen von Primern benötigten Sequenzen wurden, nach Abgleich der Sequenz von potentiell betroffenen Probesets mit der NetAffx-Datenbank, aus der fastDB Datenbank bezogen. Hierbei stehen in der Regel Sequenzen von verschiedenen Transkript-Varianten eines Gens zur Verfügung, von denen immer die ausgewählt wurde, die das zu untersuchende Exon und dessen benachbarte Exons in voller Länge repräsentierte.

Die Erstellung der Primer erfolgte mittels der Online-Applikation „NCBI PrimerBlast“. Diese basiert auf der verbreiteten Software „Primer3“ und prüft nach dem Erstellen der Primer zusätzlich die Eignung zum spezifischen Amplifizieren von genomischen und transkriptomischen Sequenzen. Hierbei werden sowohl Primer-Dimere, als auch Ähnlichkeiten zu Sequenzabschnitten anderer Gene oder Transkripte berücksichtigt. Neben dem Auffinden einer für einen Primer geeigneten Sequenz wird von dieser Online-Applikation der voraussichtliche Tm nach SantaLucia (SantaLucia 1998) berechnet.

Die erstellten Primer wurden über Biomers.net (Ulm) in lyophilisierter Form bezogen (Reinigung: Kartusche; Scale: XS) und vor Verwendung mit H_2O auf 100 pmol/µl eingestellt. Alle Primer wurden in End-Konzentrationen von je 0,5 µM eingesetzt.

RNA von insgesamt 12 der 21 untersuchten Fälle (Tabelle 29; 9 PDAC-, 3 Nichttumor-Proben) wurden mithilfe des „SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix"-Kits (Invitrogen) und den im Kit enthaltenen Random-Primern nach dem Protokoll des Herstellers in cDNA umgeschrieben und jeweils 50 ng als Matrize für die PCR eingesetzt. Für die PCR wurde die Phusion™ Polymerase (Finnzymes) verwendet, die sich durch eine hohe Sensitivität und Synthesegeschwindigkeit (15-30 s/kb) auszeichnet. Das verwendete PCR-Programm, das je nach Eigenschaften der Primer in Annealing-Temperatur und Zyklenzahl modifiziert wurde, ist in Tabelle 14 beschrieben.

Tabelle 14: PCR Programm für die Validierung von alternativen Transkript-Varianten

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	
Denaturierung	98 °C	10 sec	⎫
Annealing	50-66 °C	30 sec	⎬ 25-35 Zyklen
Elongation	72 °C	30 sec	⎭
Abschließende Elongation	72 °C	420 sec	
Kühlen	4 °C	∞	

Alle für die Validierung von vorhergesagten Transkript-Varianten verwendeten Primer mit Angabe von Sequenz und Position sind in Tabelle 15 aufgelistet. Als Positivkontrolle wurden Primer für das Transkript des Gens RPLP0 verwendet, da für dieses gezeigt wurde, dass es zwischen Tumor- und Nicht-Tumorfällen des Pankreas nicht unterschiedlich exprimiert wird (Gress et al. 1996).

Für alle 12 in cDNA umgeschriebene PDAC-Proben wurden jeweils mit einem Primerpaar parallel PCRs durchgeführt. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte wie oben beschrieben durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und auf einem Transiluminator sichtbar gemacht.

Tabelle 15: Für die Validierung von alternativen Transkript-Varianten verwendete Oligonukleotide.

Gen	Primer Forward (5'->3')	Primer Reverse (3'->5')	Position fw*	Position rev*	Bestätigt
ADAM19	CCAAGCCGGCCAATTCCCCC	GAGGAAGCCCAAGCCCGGTG	Ex 21	Ex 23	Ja
BCAR1	TGAGGATGACGAACTTGCTG	AACCCCACTGACAAGACCAG	Ex 8	Ex 6	Ja
CASP8	CTGGGCACGTGAGGTTGGGC	AGCAGGCTCTTGTTGATTTGGGCA	Ex 2	Ex 9	Ja
CDK10	AGTCGATCTGGTGGATCTCG	TCCCAGTAAAGCCAATGACC	Ex 10	Ex 8	Nein
FYN	GCAAGGTCCCCGTATGAGACGA	AGTTTGTGATCGTTGGCGGAAA	Ex 6	Ex 4	Nein
GSTK1	GCTGTGGATGCGCGTCTGGT	CAGGATGCTCTGCGGCTCGG	Ex 4	Ex 5	Ja
IL10RB	GCACTCGAGTAGCTGGGATT	CTCCTTTCCATTGTCGGATG	Ex 7	Ex 7	Nein
KRTCAP3	CTGCAGGGCCCAACTCCACG	GGCACTAGCTCTGGTGAACCTGC	Ex 5	Ex 4	Nein
LEF1	GCATGTCCAGACATCCTCCAGC	AGTACACTCAGCAACGACATTCGC	Ex 5	Ex 8	Ja
MAF	GCTTCCAAAATGTGGCGTAT	CTGGAGTCGGAGAAGAACCA	Ex 2	Ex 1	Nein
MAP4K1	ACGCCTCTGTCCGTGTTCGC	CCACCGCTTCGGTCATGGGG	Ex 26	Ex 28	Nein
MCM5	AGCGCGACAAGATGGTGGGC	GGGGACCCTGGGACAGCCAA	Ex 12	Ex 9	Ja
NCOA3	ATACCCTTGATGGAGCTCAAAG	GCAGAGAGCTGCTAAGTCATCA	Ex 22	Ex 19	Nein
NRD1	TTTCCACCAAACAGTGCAAG	CAAACTTTGGCCATTTAACG	Ex 14	Ex 11	Nein
PIK3IP1	TGGAGTTCATCCGCACCCGC	TGCCGAAACCCGGACGAGGA	Ex 5	Ex 3	Nein
PIP4K2A	TCCGTAACCTGCGGGAGAGGT	ACACAGACAAACGGTGGCTGAAT	Ex 3	Ex 5	Ja
PTPRT	GGTGCTGGATGGAGACCCGC	GGCGGACGAAGCCCAGAAGG	Ex 20	Ex 24	Ja
RAB11FIP1	CGGACCTGGAACTCCTTCTT	GCTCCGCTGGTAGAGTTGAA	Ex 6	Ex 4	Nein
RACGAP1	GCCTTGTCGTCCTAGGTTAGTGGC	TCTGGCTGTGACCGCACAGTAAA	Ex 19	Ex 14	Nein
RELT	TGAGACACGGCAGCCTGGGA	GGTGTGGAGATGGTGGCGGTG	Ex 7	Ex 10	Nein
RHOC	CGCCCTCTCTTCCTGCAGCC	GACAGCCCCTCCGACGCTTG	Ex 2	Ex 6	Ja
SMOX	CAGCAGAGCACCGTGGGTGG	TCGGCGAATCTTGCGCTCGG	Ex 9	Ex 7	Nein
SYNJ2	CCTTCACCTGGGACTGCCCG	ACTTCGGCACAGCTGGTGGG	Ex 16	Ex 14	Nein
TNFSF10	TGCGGCCCAGAGCCTTTTCA	AGTACTCCAAAAGTGGCATTGCTTGT	Ex 5	Ex 2	Nein
TNS4	ACCAGTATTTAGATGTGTCCATCACGA	GCCCCCATGGTTTGGGCTCC	Ex 5	Ex 3	Ja
TP53BP1	TGGTCCGAGAAGGTGGGCGG	AGACTGAAGAGCCAATTGTAGAGTGT	Ex 21	Ex 20	Ja
TRIM37	GGGCTAAGATGGTTATCTGGTG	TTTGGACTTACTCGCAAATGAA	Ex 16	Ex 14	Nein
U2AF2	TGAGGCACAGGACCTCAGTCGG	AGTGCCACGGGGCTCTCCAA	Ex 11	Ex 9	Ja
USH1C	TCCAGGTTAGAGAAGTCGACGCCA	GGCAGTATGTGGATCAGTTTGTGTCGG	Ex 10	Ex 7	Nein
RPLP9	AGATCCGCATGTCCCTTCG	CCTTGCGCATCATGGTGTT	Interne Kontrolle		

*Die Position der Primer in den Exons bezieht sich auf Angaben der „fast DB" Datenbank

Validierung miRNA-Expression

Die Validierung von miRNA-Expressionsdaten erfolgte mittels qRT-PCR unter Verwendung des mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit (Ambion). Hierbei werden einzelne miRNAs mittels spezifischer Primer in copy-miRNA umgeschrieben. Diese wird im Anschluss auf einer 96-well Platte in einer qRT-PCR (SYBR Green, Invitrogen) amplifiziert und die durch Einlagerung von SYBR Green entstehende Fluoreszenz im 7500 Fast Real-Time PCR System gemessen. Als Normalisierungskontrolle dienten spezielle Primer des „mirVana™ qRT-PCR Primer Set for Normalization (5S)" (Ambion).

Die Expression von vier miRNAs (miR-10a, miR-34a, miR-152, miR-203) wurde jeweils in den Proben Clontech 8062507A, PDAC-03 und PDAC-11 gemessen. Für jedes Experiment wurden Triplikate durchgeführt, um Fehler durch experimentelle und technische Varianz zu minimieren (Abbildung 16).

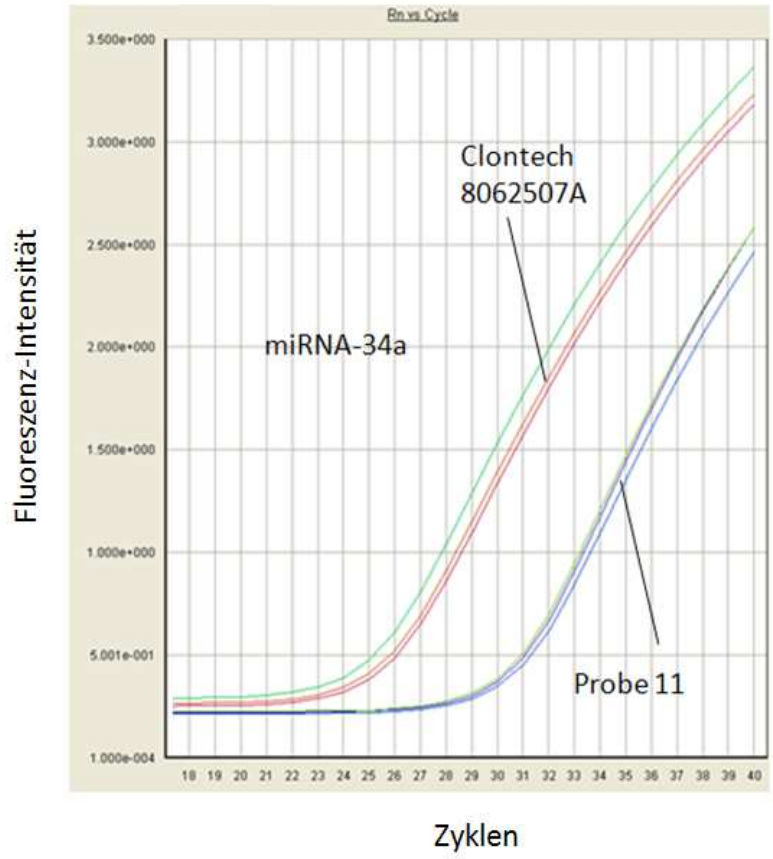


Abbildung 16: Validierung der Expression von miRNA-34a. Die Fluoreszenz-Intensität ist hierbei gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Die Triplikate der Clontech-Probe erreichen einige Zyklen früher als die Tumor-Probe Nr. 11 ein vergleichbares Niveau. miRNA-34a ist somit in größerer Menge in der Clontech-Probe enthalten. Die Abbildung wurde mit der „Sequence Detection Software“ von Applied Biosystems erstellt.

Die Auswertung der gewonnenen Rohdaten erfolgte über die „Sequence Detection Software“ (Applied Biosystems). Hierbei wird für jede Probe die Zyklenzahl ermittelt, bei der die Gesamtintensität der Fluoreszenz einen festgelegten Wert überschreitet. Durch die verwendenden Normalisierungsprimer (“mirVana™ qRT-PCR Primer Set for Normalization (5S)”) können alle Proben anschließend auf ein vergleichbares Niveau gebracht werden, da hierbei ein Stück der 5S-RNA amplifiziert wird, die in allen Proben in ähnlicher Menge vorliegt. Falls die Anzahl der Zyklen, bei der der festgelegte Intensitäts-Schwellwert

überschritten wird, bei einer Probe beispielsweise durch geringere RNA-Konzentration im qRT-PCR-Ansatz abweichend ist, können alle Werte dieser Probe um den entsprechenden Zyklenwert korrigiert werden. Nach der Normalisierung sind die Werte vergleichbar und können durch die Software als relative Veränderung in der Expression ausgegeben werden. Die Berechnung erfolgt hierbei wie bei den Affymetrix 250K Nsp Arrays beschrieben.

2.6 Verwendete Datenbanken und Software

Zur Analyse der durch Microarray-Experimente gewonnenen Roh-Daten, sowie für Validierung und Bewertung der Ergebnisse wurden verschiedene Programme, Web-basierte Anwendungen und Datenbanken eingesetzt. Eine komplette Auflistung aller verwendeten Software-Pakete und Web-Seiten ist in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: In der vorliegenden Arbeit eingesetzte Software-Pakete und Datenbanken

Software / Website	Version	Anwendung	Web-Adresse
Aceview (Thierry-Mieg und Thierry-Mieg 2006)	Stand: Juni 2011	Datenbank für Transkript-Varianten	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/
BRB Array Tools (Simon et al.)	4.1.0 – Beta_3	Auswerten von Array-Daten	http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html
CNAG (Nannya et al. 2005, Yamamoto et al. 2007)	3.0	Visualisierung von Kopienzahl-Daten	http://www.genome.umin.jp/
dChip (Li und Wong 2001, Lin et al. 2004)	Aug 2009	Ausgeben von Rohintensitäten	http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/
DNACopy (Venkatraman und Olshen 2004)	1.22.1	Bestimmung von Kopienzahlen	http://www.bioconductor.org/packages/2.3/bioc/html/DNAcopy.html
easyExon (Chang et al. 2008)	1.0.4	Detektion von alternativem Spleißen	http://microarray.ym.edu.tw:8080/tools/module/easyexon/index.jsp?mode=home
Expression Console (Affymetrix)	1.1	Qualitätsbestimmung von Exon Arrays	http://www.affymetrix.com
fast DB (de la Grange et al. 2007)	Stand: Juni 2011	Datenbank für Transkript-Varianten	http://www.fast-db.com/fastdb2/frame.html
GeneCards	Stand: Juni 2011	Gen-Datenbank	http://www.genecards.org/
Genotyping Console (Affymetrix)	4.0	Genotypisierung von 250K Arrays	http://www.affymetrix.com
GoMiner (Zeeberg et al. 2003)	Build: 267	Stoffwechselweg-Analysen	http://discover.nci.nih.gov/GoMiner/index.jsp
GRAIL (Raychaudhuri et al. 2009)	Stand: Juni 2011	Analyse krankheitsrelevanter SNPs	http://www.broadinstitute.org/mpg/grail/grail.php
GSEA (Subramanian et al. 2005)	2.0	Gene Set Enrichment Analyse	http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp
Ideogram Browser (Müller et al. 2007)	0.20.3	Visualisierung von Aberrationen	http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/HKestler/ideo/
miRBase (Griffiths-Jones et al. 2007)	Version 17	miRNA-Datenbank	http://www.mirbase.org/
miRNAQCTool (Affymetrix)	1.0.33.0	Normalisierung von miRNA-Daten	http://www.affymetrix.com/partners_programs/programs/developer/tools/devnettools.affx
NCBI Primerblast	Stand: Juni 2011	Erstellen von Primern	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
NetAffx™ (Affymetrix)	Stand: Juni 2011	Affymetrix Datenbank	http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx#1_2
oneChannelGUI (Sanges et al. 2007)	1.4.5	Detektion von alternativem Spleißen	http://www.bioinformatica.unito.it/oneChannelGUI/
R	2.11.1	Programmieroberfläche	http://www.r-project.org/
Sequence Detection Software	1.4	Erstellen/Auswerten von qRT-PCR-Daten	http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home.html
SNPinfo Web Server (Xu und Taylor 2009)	Stand: Juni 2011	Funktionelle Untersuchung von SNPs	http://snpinfo.niehs.nih.gov/snpfunc.htm
SpliceCenter (Ryan et al. 2008)	Stand: Juni 2011	Datenbank für Transkript-Varianten	http://www.tigerteamconsulting.com/SpliceCenter/ArrayCheck.jsp
UCSC GenomeBrowser (Kent et al. 2002)	Mar. 2006 (hg18)	Bestimmung der Position von Genen	http://genome.ucsc.edu/

3 ERGEBNISSE

3.1 Kopienzahl-Analyse

Veränderungen der Kopienzahl von chromosomalen Abschnitten sind in den meisten Fällen Folge einer inkorrekten Aufteilung der Chromosomen während der Zellteilung. Diese können, wenn sie im Bereich eines Gens auftreten, zum einen Auswirkungen auf dessen Expression haben, zum anderen die Auswirkung von Mutationen im verbliebenen bzw. duplizierten Gen verstärken. In dieser Arbeit sollten daher rekurrent auftretende Aberrationen im Pankreaskarzinom identifiziert, sowie im Hinblick auf eine potentiell prognostische Relevanz untersucht werden.

Eine erste visuelle Inspektion der Kopienzahl-Daten aller untersuchten Patientenproben in der CNAG-Software zeigte in nur 8 der 69 Fälle (11,6%) starke genomische Veränderungen wie Mono- oder Trisomien. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der absoluten Anzahl dieser großen Aberrationen und dem Überleben von PDAC-Patienten festgestellt werden. Der überwiegende Teil der untersuchten Proben zeichnete sich hingegen nur durch geringe genomische Veränderungen aus. Eine Analyse der Kopienzahl auf Grundlage der in CNAG normalisierten Roh-Intensitäten mit der Software DNAcopy ergab median nur etwa 10,5 aberrante Regionen pro untersuchtem Fall. Zwischen den nach Überlebenszeit gebildeten Gruppen (0-4, 5-12, 13-24 und >24 Monate) trat kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der absoluten Anzahl an genomischen Verlusten oder Zugewinnen auf.

Die in DNAcopy detektierten aberranten Bereiche wurden in der Ideogram-Browser Software nach Überlebensdauer sortiert dargestellt. Hierbei zeigen sich vor allem auf den Chromosomen 3, 7 und 8 Unterschiede im Hinblick auf das Überleben der PDAC-Patienten, wobei auch hier keine rekurrent veränderten Regionen beobachtet werden können, sondern große genomische Zugewinne und Verluste ausschließlich auf einige wenige Patientenproben limitiert sind (Abbildung 17).

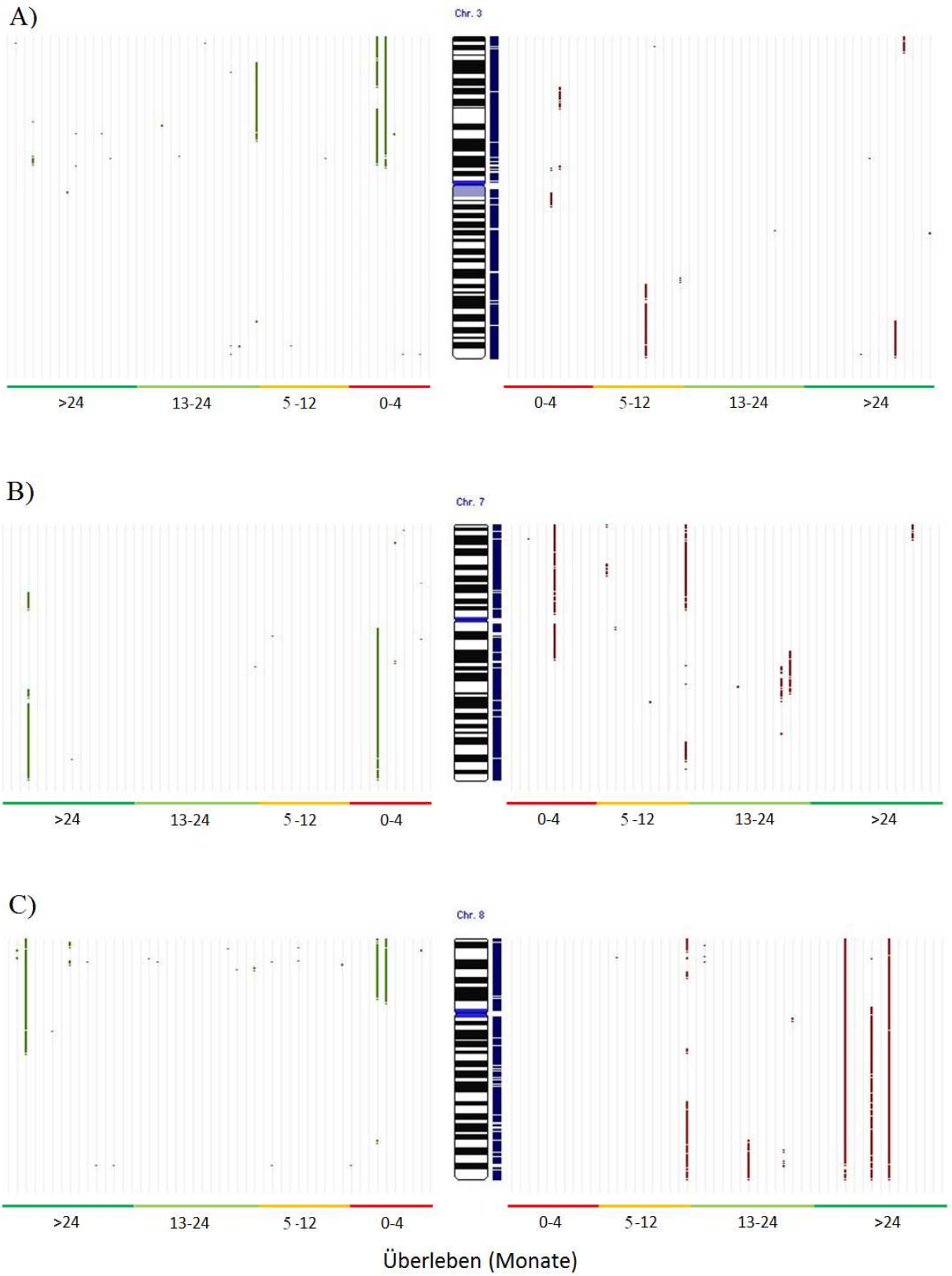


Abbildung 17: Ideogram-Browser Darstellung der durch DNAcopy detektierten Kopienzahl-Veränderungen auf Chromosom 3 [A)], 7 [B)] und 8 [C)]. Die Fälle sind nach Überlebenszeit in Gruppen sortiert: 0-4 Monate (n = 10), 5-12 Monate (n = 11), 13-24 Monate (n = 14) und > 24 Monate (n = 15). Verluste sind in grün auf der linken Seite, Zugewinne in rot auf der rechten Seite dargestellt.

Da durch die Verwendung von DNAcopy nur wenige aberrante Bereiche identifiziert werden konnten, wurde eine visuelle Inspektion der Kopienzahl-Daten in den Software-Paketen CNAG und dChip durchgeführt. Beide Programme ermöglichen die gleichzeitige Darstellung einer großen Anzahl an Fällen. Durch diese Untersuchungen konnten 21 Regionen mit rekurrent auftretender Veränderung der Kopienzahl identifiziert werden. Die in den aberranten Regionen gelegenen Gene wurden durch Abfrage der identifizierten genomischen Positionen im UCSC Genome Browser ermittelt. Ein Beispiel für die durchgeführte visuelle Analyse ist in Abbildung 18 dargestellt.

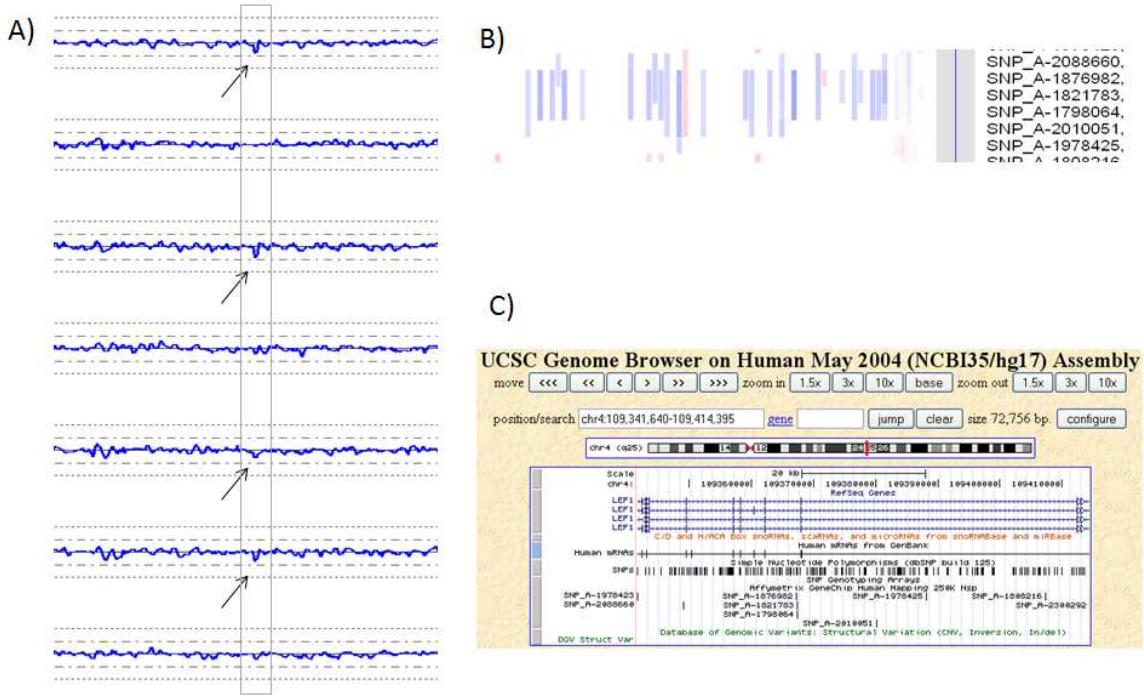


Abbildung 18: Darstellung eines Profil-Ausschnittes von sieben Pankreaskarzinom-Proben in CNAG (A), und 69 Pankreaskarzinom-Proben in der dChip-Software (B). Eine identifizierte aberrante Region ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Abfrage der entsprechenden Region im UCSC Genome Browser bestätigt, dass sich in dieser Region ein Teil des Gens LEF1 befindet (C).

Alle durch visuelle Inspektion der normalisierten Array-Daten gefundenen rekurrenten Veränderungen (>30%) sind in Tabelle 17 aufgelistet. Bis auf das Gen MRGRPX1 erstreckten sich die Veränderungen nicht in voller Länge über die entsprechenden Gene, sondern betreffen diese nur teilweise. Eine Reihe von rekurrenten Aberrationen ist in Regionen von bekannten Copy Number Variations (CNVs) gelegen. Diese Veränderungen in der Kopienzahl einzelner Regionen kommen auch in Teilen der gesunden Bevölkerung vor und müssen deswegen nicht zwangsläufig ein durch das PDAC verursachtes Phänomen sein.

Tabelle 17: Durch visuelle Inspektion der SNP-Daten gefundene rekurrent veränderte Regionen im Pankreaskarzinom. (↑) = Überexpression, (↓) = erniedrigte Expression in Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe des Pankreas (FC > 1,5; p < 0,05), (▲) = Überexpression, (▼) = erniedrigte Expression in Patienten mit geringer Überlebensdauer verglichen mit Patienten mit langer Überlebensdauer (FC > 1,5; p < 0,05).

Chr.	Genomische Position (hg18)	Zytobande	Anteil (%)	Veränderung	Betroffenes Gen	CNV
18	Chr18:4,969,610-4,969,980	p11.31	65,7	Verlust	---	
14	Chr14:97,701,509-97,702,009	q32.2	53,7	Zugewinn	(EST)*	
1	Chr1:56,563,123-56,563,623	p32.2	50,7	Verlust	---	
3	Chr3:35,750,233-35,760,503	p22.3	50,7	Verlust	ARPP-21 / miR-128-2	
4	Chr4:23,605,343-23,605,843	p15.2	49,3	Verlust	---	
16	Chr16:34,460,196-34,460,696	p11.1	49,3	Verlust/Zugewinn	LOC283914	
12	Chr12:58,459,599-58,460,150	q14.1	44,8	Verlust	SLC16A7	
12	Chr12:16,164,325-16,164,825	p12.3	41,8	Verlust	---	Ja
3	Chr3:114,944,563-114,945,063	q13.2	40,3	Zugewinn	NAT13 (▲)	
4	Chr4:109,228,895-09,229,395	q25	40,3	Verlust	LEF1 (↑)	
11	Chr11:40,372,794-40,373,294	p12	40,3	Zugewinn	LRRC4C	
17	Chr17:41,602,524-41,603,024	q21.31	40,3	Verlust	KIAA1267	Ja
18	Chr18:40,690,742-40,691,442	q12.3	40,3	Verlust	SETBP1	
3	Chr3:60,752,610-60,752,972	p14.4	37,3	Verlust	FHIT	
17	Chr17:31,479,745-31,480,245	q12.1	37,3	Verlust/Zugewinn	(EST)*	Ja
3	Chr3:196,945,971-196,946,471	q29	35,8	Verlust/Zugewinn	MUC20	Ja
11	Chr11:18,906,783-18,918,283	p15.1	35,8	Verlust/Zugewinn	MRGPRX1	Ja
16	Chr16:83,649,984-83,650,249	q24.13	35,8	Zugewinn	KIAA0513	
17	Chr17:45,644,527-45,645,027	q21.33	32,8	Zugewinn	(EST)*	
11	Chr11:58,661,871-58,662,371	q12.1	32,8	Verlust	(EST)*	Ja
8	Chr8:11,047,278-11,047,778	p23.1	31,3	Verlust	XKR6	Ja

*Mit (EST) sind „Expressed Sequence Tags“ bezeichnet. Diese durch cDNA-Analysen identifizierten Sequenzen liefern Hinweise auf das Vorhandensein eines exprimierten Transkriptes.

Eine im Anschluss an die visuelle Auswertung der Daten durchgeführte Analyse der Aberrationen hinsichtlich des Überlebens der PDAC-Patienten ergab nur in Fall von **XKR6** einen Zusammenhang zwischen dem Verlust eines Teilstücks des Gens XKR6 und der Überlebensdauer. Der Verlust konnte in keinem der Patienten aus Gruppe 1 (n = 10; 0-4 Monate) beobachtet werden, in Gruppe 4 (n = 15; >24 Monate) trat die Deletion jedoch in 13 der 15 untersuchten Proben auf.

3.2 SNP-Analyse

Durch Berechnungen, die in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kestler aus der Abteilung Neuro-Informatik der Universität Ulm durchgeführt wurden, konnten 81 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) identifiziert werden, die eine signifikante positive oder negative Korrelation des Allelstatus mit der Überlebenszeit von PDAC-Patienten aufweisen. Exemplarisch hierfür sind die Kaplan-Meier-Kurven der beiden SNPs SNP_A-1869513 und SNP_A-2013704 in Abbildung 19 dargestellt.

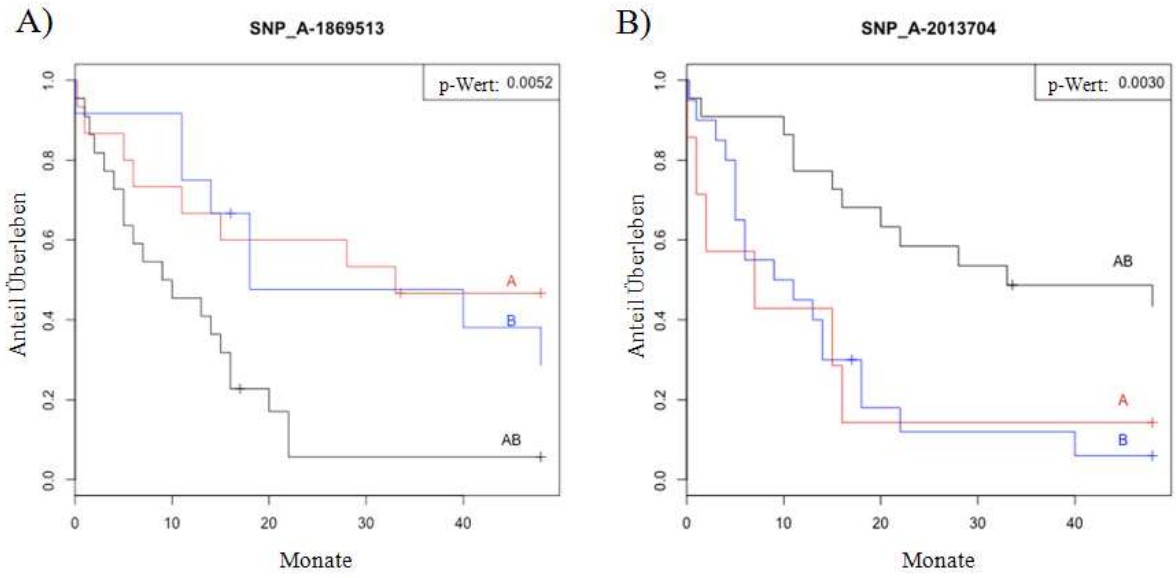


Abbildung 19: Exemplarische Darstellung zweier Kaplan-Meier-Kurven von SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismen), die in dieser Arbeit als prognostisch signifikant identifiziert wurden. Im Fall von A) korreliert ein heterozygoter Zustand des SNP_A-1869513 signifikant mit einem kürzeren Überleben, bei B) kann ein längeres Überleben in Patienten beobachtet werden, die über einen heterozygoten SNP_A2013704 verfügen.

Die 81 in dieser Analyse identifizierten SNPs wurden mittels des UCSC Genome Browsers und den Softwarepaketen GRAIL und is-rSNP genauer untersucht. Von diesen 81 SNPs liegen 40 innerhalb eines Transkriptes (in den meisten Fällen intronisch) und 25 in einer Region einer bekannten Kopienzahl-Variation (CNV). Mittels der is-rSNP Software wurden 42 SNP als regulatorische SNPs (rSNP) identifiziert. Diese liegen innerhalb der Bindestelle eines Transkriptionsfaktors (TF), die durch eine polymorphe Base aktiv oder inaktiv ist, was entsprechende Auswirkungen auf die Expression eines durch den Transkriptionsfaktor regulierten Gens hat. Die in dieser Arbeit detektierten Gene und TF-Bindestellen, die durch einen als prognostisch identifizierten SNP betroffen sind, sind in Tabelle 18 aufgelistet.

SNPs, die kein Gen oder keine TF-Bindestelle betreffen, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht aufgeführt, sind aber in der Gesamt-Tabelle im Anhang (Tabelle 26) enthalten.

Tabelle 18: Zusammenfassung der mittels UCSC Genome Browser und is-rSNP gefundenen Gene und Transkriptionsfaktor-Bindestellen. (↑) = Überexpression, (↓) = erniedrigte Expression in Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe des Pankreas (FC > 1,5; p < 0,05), (▲) = Überexpression, (▼) = erniedrigte Expression in Patienten mit geringer Überlebensdauer verglichen mit Patienten mit langer Überlebensdauer (FC > 1,5; p < 0,05).

Affymetrix SNP ID	Chr	Position (hg19)	Gen	Betroffene TF-Bindestellen
SNP_A-2179242	1	2723552		ESR1, Myc, MYC::MAX, NR2F1, USF1
SNP_A-1799171	1	46975773	DMBX1	
SNP_A-1925224	1	159460574		Gfi, NFYA
SNP_A-2040339	1	162245622	NOS1AP	ELK4, GABPA
SNP_A-2174874	1	180934047	AK056657	ESR1, ESR2, NR3A2, PBX1, PPARG
SNP_A-1982115	1	209241880		IRF1
SNP_A-1991273	1	245223967	EFCAB2	ELK1, ELK4, FEV, GABPA
SNP_A-2077196	2	82921097		Nkx3-2
SNP_A-2244914	2	103089078	SLC9A4	
SNP_A-2006795	2	155689683	KCNJ3 (▼)	
SNP_A-2104040	2	181062797		HNF4A, IRF1, IRF2, TBP
SNP_A-4208690	2	218294420	DIRC3	BRCA1
SNP_A-1895758	3	59482405		FOXA1, Foxa2
SNP_A-2103422	3	63663240	AK126350	NR1H2::RXRA
SNP_A-2064101	3	132651876	AK096400	
SNP_A-1821649	5	83530814	EDIL3(↑)(▼)	MZF1_1-4, MZF1_5-13
SNP_A-1985538	6	27261324		Nkx3-2
SNP_A-2182370	6	67475333		REST, znf143
SNP_A-1943057	7	16395343	ISPD	TP53
SNP_A-4212377	7	50726144	GRB10	
SNP_A-1912990	7	83109037	SEMA3E (▼)	Hand1::Tcfe2a
SNP_A-2101410	7	94794785	PPP1R9A	
SNP_A-2192835	8	13170751	DLC1 (↑)	PPARG, Zfx
SNP_A-2202546	8	61123647	CA8	
SNP_A-1887894	8	64207363		Esrrb, MZF1_1-4, Stat3
SNP_A-2126556	8	137360227		NFE2L2, RORA_2

Affymetrix SNP ID	Chr	Position (hg19)	Gen	Betroffene TF-Bindestellen
SNP_A-2062564	8	140055955		TEAD1, ZNF354C
SNP_A-2014049	9	9866363	PTPRD	
SNP_A-1903385	9	14616371	ZDHHC21(▼)	HOXA5
SNP_A-1918525	9	77241242	RORB	
SNP_A-2275779	9	95475352	BICD2	EWSR1-FLI1
SNP_A-1923407	10	499573	DIP2C	
SNP_A-2000940	10	55137245		NR4A2, PPARG, RORA_1, RORA_2
SNP_A-2244245	10	61548802	CCDC6	Myb
SNP_A-1936416	10	119619382		Sox2
SNP_A-2045452	11	2633715	KCNQ1	
SNP_A-1817014	11	10003622	SFB2	
SNP_A-1961652	11	50140456		AP1
SNP_A-2013704	11	92584875	FAT3	
SNP_A-1936462	12	27496606	ARNTL2 (↑)	
SNP_A-1849338	12	48881492	C12orf54	NR2F1
SNP_A-2061304	12	54933057	NCKAP1L (↑)	
SNP_A-2198730	12	60086206	SLC16A7	Ar
SNP_A-1881241	12	128554956		MIZF, RXRA::VDR
SNP_A-4231892	13	34198941	STARD13	CEBPA, Esrrb, INSM1
SNP_A-2254149	13	42546074	AK092199	Sox17
SNP_A-1822423	13	75793457		Nkx3-2
SNP_A-2221833	14	58386924		Pax6
SNP_A-2275983	15	32245584		ESR1, SP1
SNP_A-2241497	15	45018735	TRIM69	NR3C1
SNP_A-2161360	15	47683095	SEMA6D (↓)	
SNP_A-1807492	15	86486290		TP53
SNP_A-2277746	16	25454785		NHLH1
SNP_A-2066488	16	62017413	CDH8	
SNP_A-2251501	16	84417003	ATP2C2 (↑)(▼)	RORA_2
SNP_A-2213653	16	86105916		HOXA5
SNP_A-2088037	19	43063494	AK311181	CREB1, PPARG
SNP_A-4241225	20	50463070	AK096285	ESR1
SNP_A-2016188	21	22125690	C21orf131	Foxd3, FOXI1, Foxq1, znf143

Durch die GRAIL-Software wurden außerdem Gene identifiziert, die in Zusammenhang mit den untersuchten SNPs stehen. Hierbei wurde für jeden SNP eine Region definiert, die durch

flankierende Rekombinations-Hotspots begrenzt wurde. Potentiell mit Krankheiten in Verbindung stehende Gene, die in diesen Regionen gelegen waren, wurden dann anhand von Ähnlichkeiten in einer „Text Mining“ Analyse in der PubMed-Datenbank identifiziert. Diese Methode hat vor allem bei Genen Vorteile, bei denen die genaue Funktion unbekannt ist, oder die in Datenbanken bisher schlecht charakterisiert sind (Raychaudhuri et al. 2009). Die Ergebnisse der GRAIL-Analyse sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Durch Verwendung der GRAIL-Software identifizierte potentiell tumorrelevante Gene mit Angabe der in dieser Arbeit durch die Verwendung von Affymetrix Exon Arrays gemessenen Expression. (↑) = Überexpression, (↓) = erniedrigte Expression in Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe des Pankreas (FC > 1,5; p < 0,05), (▲) = Überexpression, (▼) = erniedrigte Expression in Patienten mit geringer Überlebensdauer verglichen mit Patienten mit langer Überlebensdauer (FC > 1,5; p < 0,05).

Gen	p-Wert	Durch GRAIL identifizierte ähnliche Gene (Rangfolge)
SLIT3 (↑)	0.003	NCAM2(7), SEMA3E(42), CDH8(147), FAM19A5(302), RORB(312), FAT3(319), HES5(340), STK38L(451), KIAA0564(505), TBRG4(548)
FAT3	0.015	CDH8(31), NCAM2(91), PTPRT(137), KIAA0564(245), SLIT3(440), SEMA3E(450), RORB(477), KIAA1614(541)
NAV3	0.016	NCAM2(43), KIAA1604(82), ATP9A(104), DOCK2(135), STK38L(152), KIAA1614(395), TBRG4(424), RORB(465), KIAA0564(523), HIST1H2AI(617)
RAMP3	0.019	ADM(5), CALCR(8), RORB(165), SFRS6(272), ADCY1(348), IL18R1(515), PTPRJ(590)
SEMA3E (▼)	0.020	NCAM2(32), SLIT3(75), CDH8(96), RORB(243), FAT3(300), HES5(484), FAM19A5(491), OR10J5(518)
NCAM2	0.024	SLIT3(60), RORB(127), STK38L(178), SEMA3E(185), BICD2(225), HES5(337), CDH8(361), KIAA0564(478), TBC1D4(545)
ADCY1	0.030	NCAM2(80), PDE1B(98), GRM5(123), PPP1R9A(131), CDH8(243), IER5(292), RORB(357), B2M(536), STK38L(606)
CALCR (↑)(▼)	0.035	RAMP3(6), ADM(61), SFRS6(82), RORB(137), OGN(213), PTPRJ(590)
GRM5	0.040	ADCY1(75), PPP1R9A(77), IER5(105), NCAM2(177), RORB(385), FOLH1(425), CHRNA7(444)
PRSS16	0.041	MR1(9), B2M(19), YTHDF3(129), KIAA0564(497)

Detektion von miRNA-Bindestellen

Die durch einen prognostischen SNP betroffenen genomischen Regionen wurden zur weiteren Analyse mittels der „SNPinfo Web Server“ Online-Applikation auf mögliche miRNA-Bindestellen untersucht. Im Fall von SNP_A-2275779 (Gen: BICD2, Bindestelle für miR-125a und miR-125b) und SNP_A-2244245 (Gen: CCDC6, Bindestelle für miR-455-3p) konnten diese für die Genregulation wichtigen Sequenzabschnitte innerhalb einer Exon-Sequenz detektiert werden. Damit hat die Ausprägungsform dieser beiden SNPs Einfluss auf die Bindungsstärke der betreffenden miRNA an die betroffene Bindestelle und kann somit die Translation der Gene BICD2 und CCDC6 beeinflussen.

3.3 LOH-Analyse

Eine zusätzlich zur SNP-Analyse durchgeführte Untersuchung hinsichtlich des Überlebens von PDAC Patienten wurde in Bezug auf homozygote Areale („Loss of Heterozygosity“, LOH) durchgeführt. Hierbei wurden durch Algorithmen, die von der Arbeitsgruppevon PD Dr. Kestler aus der Abteilung Neuro-Informatik der Universität Ulm entwickelt wurden, 37.628 SNPs detektiert, bei denen im Fall eines LOH eine signifikante Korrelation mit dem Überleben der Patienten auftrat ($p < 0,05$). Diese in LOH-Regionen gelegenen SNPs entstammen insgesamt 435 Regionen ($p < 0,01$; SNP $n > 2$). Um eine Reduktion der großen Menge an Regionen zu erreichen, wurden diese anschließend nach Patienten pro Gruppe ($n \geq 4$) gefiltert. Die daraus resultierenden LOH-Regionen ($n = 138$), die im Mittel eine Größe von 471 kb erreichen, sind in Tabelle 20 dargestellt. Eine nach Signifikanz ($p < 0,01$) gefilterte Liste alle 435 detektierten LOH-Regionen befindet sich im Anhang in Tabelle 27.

Tabelle 20: Durch die Analyse von SNP-Status und Überlebenszeit von PDAC-Patienten identifizierte prognostische LOH-Regionen. (↑) = Überexpression, (↓) = erniedrigte Expression in Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe des Pankreas (FC > 1,5; $p < 0,05$), (▲) = Überexpression, (▼) = erniedrigte Expression in Patienten mit geringer Überlebensdauer verglichen mit Patienten mit langer Überlebensdauer (FC > 1,5; $p < 0,05$).

Chr	Zytobande	Start	Stopp	Größe (kb)	Gene	miRNA
1	p31.1	71542954	72186115	643	NEGR1	---
1	q21.1	144964403	145241823	277	KIAA1693, NBPF1, PRKAB2 , CR610404, PDIA3P, FMO5 (▼) , CHD1L (↑) , BC036212	---
1	q25.2	178493251	178829362	336	LHX4 , AK096250, ACBD6 , BC036830	---
1	q31.1	187102823	187819159	716	---	---

Chr	Zytobande	Start	Stopp	Größe (kb)	Gene	miRNA
1	q31.1	188568155	189070492	502	FAM5C , CR936711	---
1	q31.3	195962416	196773681	811	C1orf218, DENND1B , C1orf53, LHX9 , NEK7 (↑) , AL080111, ATP6V1G3	---
2	p24.3	16807399	17170134	363	---	---
2	p24.2	17980717	18312930	332	---	---
2	p22.3	35055306	35679916	625	---	---
2	p16.3	49122308	49170652	48	FSHR	---
2	p16.2	52818343	53206134	388	---	---
2	p12	83404583	83969496	565	---	---
2	q12.1	102466651	102543727	77	SLC9A4	---
2	q14.1	116453178	116645481	192	---	---
2	q22.2	142832259	143391296	559	KYNU (↑)	---
2	q24.1	157226944	158813630	1587	GALNT5 (↑) , ERMN, CYTIP, ACVR1 (↑), UPP2 , CCDC148	---
2	q24.3	164423883	164815544	392	---	---
2	q31.1	176583689	177691833	1108	EVX2, HOXD13 (▲) , HOXD12 , HOXD11 , HOXD10 , HOXD9 , AX747372, HOXD8 , BC034000, BC047605, HOXD4 , HOXD3 , BC047481, HOXD1 , MTX2 , CR618071, LOC375295, CR598849	miR-10b, miR-1246
2	q32.3	193516105	194884458	1368	---	---
2	q33.3	206494076	207358659	865	INO80D , BC047484, AX747742, NDUFS1 (▼) , EEF1B2 , SNORD51, SNORA41, GPR1 , AX748049, BC028329, ZDBF2, ADAM23 , LOC200726, DYTN, MDH1B	---
2	q33.3	207832838	209026579	1194	FASTKD2 , CREB1 (↑) , FAM119A , CCNYL1 , FZD5 (↓)(▼), AF462444, PLEKHM3, CRYGD , CRYGC , CRYGB , CRYGA , C2orf80, IDH1 (↑) , PIP5K3, PTH2R	miR-1302-4
2	q34	210768295	211126163	358	ACADL (↓) , BC130595, MYL1 , LANCL1 (▼) , CPS1	---
2	q34	212588716	213552195	963	ERBB4	miR-548f-2
2	q34	214752480	215601087	849	SPAG16 , VWC2L, BARD1 , ABCA12	---
2	q36.1	223775131	223823920	49	---	---
2	q36.1	224270769	224953845	683	AP1S3 , WDFY1 (↑) , MRPL44 , SERPINE2 (↑) , FAM124B	---
3	p14.1	67066723	67073419	7	---	---
3	q11.2	97770237	98508607	738	EPHA6	---
3	q12.1	100588881	101570024	981	COL8A1 , C3orf26 , FILIP1L , AF090939, TMEM30C, TBC1D23 , DKFZp667G062, NIT2 , TOMM70A	---
3	q13.31	117891785	117928301	37	BC112981, BC104180	---
3	q21.2	127132735	127541452	409	LOC200810, ROPN1B , SLC41A3 , ALDH1L1 (↓) , DKFZp434O2417, BC039521, AK097508	---
3	q22.2	135961212	136064194	103	EphB1	---
3	q23	140425733	140810917	385	MRPS22 , GK002, COPB2 , RBP2 , RBP1 (↓) , NMNAT3 , FKSG76	---
3	q24	146024762	147062155	1037	---	---
3	q26.1	168757781	169085611	328	WDR49 , PDCD10 (↑) , SERPINI1 (↓)	---
3	q26.33	181565619	181907703	342	TTC14 , CCDC39, DKFZp434A128	---
3	q26.33	184096377	184736138	640	ATP11B (▼) , KIAA0956, DCUN1D1 (▼) , DKFZp686B20267, MCCC1 (↓) , MCC-B, LAMP3 , MCF2L2 , B3GNT5 (↑) , BC013229, BC040935, KIAA0861, AK057000, KLHL6 (↑)	---
4	p13	44528549	44961257	433	---	---

Chr	Zytobande	Start	Stopp	Größe (kb)	Gene	miRNA
4	q12	53128445	54178905	1050	AK021861, USP46 , D28589, CR611723, SNORA26, LP9056, RASL11B , SCFD2 , BC042091, AK055055, FIP1L1, PDGFRA (↑) , DKFZp586K0717, LNX1 (↓) , UNQ574	---
4	q13.1	63129593	63229043	99	---	---
4	q31.3	153405576	153757121	352	FBXW7 , DKFZp434I0714	---
5	p13.3	29501352	31089541	1588	---	---
5	p13.1	41080373	41483944	404	HEATR7B2 , C6, PLCXD3	---
5	q11.2	52289413	52699792	410	AK097288, ITGA2 (↑) , MOCS2 , AK097893	---
5	q11.2	55859861	56393904	534	MAP3K1, C5orf35, C5orf35, MIER3	---
5	q12.1	59770613	61091141	1321	PDE4D (▼) , PART1 , DEPDC1B (↑) , ELOVL7, ERCC8 , NDUFAF2 , DKFZp686E2158, C5orf43 (▼), ZSWIM6, BC032910, FLJ37543, BC043229, BC043516, BC043261, BC039381	---
5	q23.1	116708696	116910275	202	BC045192	---
5	q23.1	117087225	117144342	57	---	---
5	q23.3	128389795	128452593	63	SLC27A6	---
5	q31.1	130390366	131703763	1313	HINT1 (↑) , LYRM7 , CDC42SE2 , RAPGEF6 , FNIP1, ACSL6 , KIAA0837, IL3 , CSF2 , P4HA2 , BC030525, PDLIM4 , SLC22A4 , OCTN1, BC043424	---
5	q31.1	134452111	137472899	3021	AK026965, BC045187, H2AFY (↑) , AX747819, C5orf20 , TIFAB, NEUROG1 , CXCL14 (↑) , LOC153328 , IL9 , FBL3B, FBXL21 , LECT2 , TGFBI (↑) , DAMS, SMAD5 , BC092501, trp7, TRPC7 , SPOCK1 , KLHL3 , KIAA1129, HNRNPA0 , AK311328, NPY6R , MYOT , PKD2L2 , FAM13B , AK310493, BRD8 , WNT8A	miR-886 (↑), miR-874
5	q33.2	154670414	154750972	81	---	---
5	q33.2	154948814	155052244	103	---	---
5	q34	164351321	164789868	439	---	---
5	q35.1	170499296	170748847	250	DKFZp666P032, RANBP17 , AX746723, TLX3 , NPM1 (▲)	---
6	p25.2	3131048	3410832	280	CR612203, BC027024, TUBB2B , DKFZp566F223, AK096219, PSMG4, AL389983, SLC22A23 , DKFZp434F011, AX746991, AK096549	---
6	p24.3	8753010	9019224	266	---	---
6	p22.3	22614552	22705604	91	HDGFL1	---
6	p22.1	29566220	29690504	124	AK097713, UBD (↑) , GABBR1 , SNORD32B, OR2H2	---
6	p22.1	29853740	30301492	448	HCG4 , LOC554223 , HLA-G, HLA-G3, HLA-G2.2, HLA-A, HLA-H, HLA-A*0226, HCG2P7, AK097625, HCG4P6, BC035647, HCG9 , AK126001, CR611202, AF238323, C6orf12, ZNRD1 , PPP1R11 (↑) , RNF39 , TRIM31 (↑) , DQ580846, TRIM40 , TRIM10 , TRIM15 , TRIM26	---
6	p12.2	51791333	52087688	296	PKHD1 (↓)	---
6	q14.1	77539033	77694652	156	---	---
6	q14.3	85301899	85391817	90	---	---
6	q22.1	115333820	116112228	778	---	---
6	q22.31	123446403	123940204	494	TRDN , AL832096	---
6	q23.2	132825558	133045037	219	STX7 (↑) , TAAR9 , TAAR8 , TAAR6 , TAAR5 , TAAR2 , TAAR1 , VNN1 (↑)	---

Chr	Zytobande	Start	Stopp	Größe (kb)	Gene	miRNA
6	q23.3	138174209	138878665	704	AK124173, TNFAIP3 (↑) , PERP (↑) , KIAA1244, PBOV1 , HEBP2 , NHSL1, AX747703	---
6	q24.1	142309717	142927644	618	AK097143, NMBR , VTA1 , GPR126 (↑) , DREG, AK055933, BC125150	---
6	q26	162768919	163253575	485	PARK2 , PACRG	---
6	q27	164980085	165474393	494	AK090788	---
7	p21.2	14817764	14881543	64	DGKB	---
7	p21.1	15450601	16023596	573	TMEM195 , MEOX2 , BX538274	---
7	p14.3	32365499	32526778	161	LSM5 , AVL9	---
7	p14.1	38936691	39263867	327	AK023033, POU6F2 , AK097702	---
7	p13	45992706	46540548	548	---	---
7	q11.21	63960987	65557633	1597	AK097702, ZNF273 , ZNF117, AK097499, BC071617, BX649060, AM413008, BC044608, INTS4 , AK057766, DQ596928, ZNF92 , LOC441242 , BC111554, CCT6P1, SNORA22, DQ580039, VKORC1L1 (↑) , DQ594001, GUSB, ASL , CRCP , RCP9, TPST1 , LOC285908	---
7	q21.11	82806406	83070275	264	SEMA3E	---
7	q21.13	89569916	89985172	415	DPY19L2P4 , STEAP1 (↑) , STEAP2 (↑) , C7orf63 , GTPBP10, CLDN12 (↑)(▲) , PFTK1 (▲)	---
7	q31.31	120089523	120424032	335	KCND2 , TSPAN12 (▼) , ING3 , C7orf58 (↑)	---
8	q12.1	57953734	57985421	32	---	---
8	q23.1	106793887	107487948	694	ZFPM2 (↑) , CR602836, OXR1 (↑)	---
8	q23.3	114765406	115055589	290	---	---
8	q23.3	117178354	117404529	226	---	---
8	q24.12	119961670	120638107	676	TNFRSF11B (↑) , COLEC10 , MAL2 (↑) , NOV	---
8	q24.23	137918448	138167112	249	---	---
9	p23	10025658	10118645	93	PTPRD	---
9	p21.1	31436639	31861335	425	---	---
9	p21.1	32103319	33200959	1098	IRP1, ACO1 (↓)(▼) , AX747756, DDX58 (↑) , RIG-I, TOPORS , CR604036, NDUFB6 , TAF1L , AX747113, TMEM215 , APTX , DNAJA1 (↑) , SMU1 , B4GALT1	---
9	q21.31	81142463	81360270	218	CHCHD9	---
9	q31.1	101724864	102067676	343	STX17 , DKFZp762D1813, ERP44 , KIAA0573, INVS	---
10	p15.3	148946	1160496	1012	ZMYND11 , AK093390, DIP2C , KIAA0934, C10orf108, LARP5, BC127786, GTPBP4 , CRFG, IDI2 , C10orf110 , IDI1 , BC046483, WDR37 , KIAA0982, AX748285, AK055803	---
10	p15.1	4061978	4215127	153	---	---
10	p14	9483504	10289933	806	BC032914	---
10	p12.33	19184471	19483329	299	---	---
10	p12.32	20148234	20227503	79	PLXDC2 (↑)	---
10	p12.31	21712282	22060671	348	C10orf114, C10orf140 , AK055656, MLLT10 , AF10/CALM, AF10, CALM/AF10, DKFZp779J0967	miR-1915
10	p11.22	33432271	33467609	35	---	---
10	q11.22	49890618	50620982	730	C10orf72 (↑), AK093055, C10orf73, BC033360, C10orf128, C10orf71, DRGX, ERCC6 , PGBD3, CHAT , SLC18A3 , C10orf53 , OGDHL	---

Chr	Zytobande	Start	Stopp	Größe (kb)	Gene	miRNA
10	q21.1	58618091	59003077	385	---	---
10	q21.1	59650658	59831646	181	IPMK , CISD1 (↑) , ZCD1, UBE2D1 (↑) , TFAM (▼)	---
10	q21.1	59987781	60011404	24	BICC1	---
10	q22.2	76607581	76877984	270	VDAC2 , COMTD1 , UNQ766, AK023445, ZNF503 , BC029963	---
10	q22.2	77040325	77715269	675	C10orf11	---
10	q23.1	86536593	87001287	465	AK097624	---
10	q23.33	97330608	98138547	808	ALDH18A1 (▼) , TCTN3 , DKFZp564D116, ENTPD1 (↑) , AK091396 , PleA 1, AK096469, CC2D2B , BC028619, CCNJ , ZNF518A, KIAA0335, BLNK , SLP65, BASH, DNTT , OPALIN , HTMP10, TLL2	---
10	q24.32	104698302	105380011	682	CNNM2 , NT5C2 (↑) , BC040734, hCG_2024410, INA , PCGF6 , hMBLR, TAF5 , USMG5 , PDCD11 , CALHM2 , FAM26B, CALHM1 , CALHM3 , NEURL , SH3PXD2A (↑)	miR-1307
10	q25.3	117515187	117656755	142	ATRNL1	---
10	q26.11	121595918	121809910	214	C10orf119 (↑) , AK001928, SEC23IP (↑)(▼)	---
10	q26.13	127269561	127798714	529	C10orf122, BC048981, AK094354, C10orf137 , EDRF1, RP11-383C5.6, MMP21 , UROS (↑) , BCCIP , DHX32 , FANK1 , CR611911, ADAM12 (↑)	---
11	p15.4	8372604	8708216	336	STK33 , KIAA0298, BC068088, RPL27A , SNORA3, SNORA45, ST5	---
11	p14.2	26305459	26341558	36	ANO3	---
11	q12.1	57699904	57725262	25	OR9Q1 , OR9Q2 , PLAC1L	---
11	q12.1	59563222	59645277	82	MS4A3, MS4A2 (↑)	---
11	q14.2	87597469	87815416	218	CTSC (↑) , BC038205	---
11	q21	92995557	93537561	542	KIAA1731, SCARNA9, TAF1D , AK128061, SNORA25, SNORA32, SNORD6, SNORA1 , SNORA8, SNORD5, SNORA18, SNORA40, C11orf54 , MED17 (↑) , HEPHL1, AF086184, PANX1 (↑)	miR-1304
12	q21.2	76289799	76333719	44	---	---
12	q23.3	106228244	106281133	53	BTBD11	---
14	q12	27175888	27326993	151	BC148262, BX538073	---
14	q23.2	63899770	64640139	740	MTHFD1 (▼) , ZBTB25 , AKAP5 , ZBTB1 (↑) , HSPA2 , C14orf50 (▼) , PLEKHG3, SPTB , CHURC1 (↑) , GPX2 (↑) , RAB15 , FNTB , BC052775, MAX (↑)	---
15	q14	32274208	32330347	56	C15orf29, TMEM85, SLC12A6 (↑)	---
15	q15.1	40548728	40751718	203	ZFP106 (↑), SNAP23 (↑) , LRRC57 , CEP27, DKFZp686O248	---
16	q23.1	74355880	74542562	187	---	---
16	q23.1	76160009	76400711	241	NUDT7, VAT1L	---
16	q23.2	78526600	78915159	389	---	---
17	q11.2	24433864	25002820	569	MYO18A , CRYBA1 , NUFIP2 (▼) , TAOK1 (↑) , AL110163, LOC116236, TP53I13 , GIT1 , ANKRD13B , CORO6 , SSH2 (↑)	---

Chr	Zytobande	Start	Stopp	Größe (kb)	Gene	miRNA
17	q21.32	43038124	44402113	1364	NPEPPS (↑) , KPNB1 (↑)(▼) , TBKBP1 , TBX21 , OSBPL7 , MRPL10 , LRRC46 , SCRN2 , Ses2, SP6 , BC031827, AX746787, SP2 , BC038442, PNPO (▼) , ATAD4 (↓) , CDK5RAP3 (▲), COPZ2 (↑) , NFE2L1 (↑) , FLJ00380, CBX1 (↑) , SNX11 , SKAP1 (↑) , HOXB1 , HOXB2 (↑) , HOXB3 (↑) , HOXB4 , CS548255, HOXB5 , HOXB6 , LOC404266 , HOXB7 , HOXB8 , HOXB9 , PRAC , PRAC2, HOXB13 (▼) , TTLL6 , DKFZp434A0435, CALCOCO2 (↑)(▼) , ATP5G1 , UBE2Z (↑) , SNF8, GIP	miR-152 (↑), miR-1203, miR-10a (↑), miR-196a-1
17	q22	54542511	55565566	1023	BC017255, FAM33A, PRR11 (↑) , C17orf71 (↑) , GDPD1 , YPEL2 , DHX40 , DKFZp667A191, CLTC (↑)(▼) , DKFZp434A1535, PTRH2 (↑) , TMEM49 (↑)(▼) , DJ087819, TUBD1 , RPS6KB1 , RNFT1 , AK097658, DHX40P, DQ574804, DQ593188, DQ575686, DQ580080, HEATR6 , AF086204	miR-454, miR-301a, miR-21 (↑)
17	q24.3	65310483	65489965	179	---	---
18	q12.1	26090227	26205825	116	---	miR-302f
18	q12.2	32936968	33156123	219	KIAA1328 , BRUNOL4 , AX747133	---
18	q12.2	34825074	35009755	185	---	---
18	q12.3	37759004	38401669	643	PIK3C3 (↑) , LOC284260	---
18	q12.3	39812216	40717438	905	BC051727, SETBP1	---
18	q21.2	48658755	49193696	535	DCC	---
20	p11.21	22496142	22786648	291	FOXA2 , AK055550	---
21	q21.1	19018794	19272082	253	BC028044, BC051441	---
21	q21.2	24254905	24465879	211	---	---
21	q22.12	36104818	36822288	717	RUNX1 (↑) , C21orf18, SETD4 , CBR1 (↑) , hCBR1, CR594732, BC047014, CBR3 (↑) , AB004851, DOPEY2 (↑) , MORC3 (↑), BC058002, CHAF1B , CLDN14	---

Die Verteilung der in Tabelle 20 gelisteten LOH-Regionen über das humane Genom ist in Abbildung 20 dargestellt. Die Anteile der LOH-Regionen an der Gesamt-Größe des jeweiligen Chromosoms sind in Tabelle 21 aufgetragen. Hier kann eine leichte Anreicherung (> 5%) von prognostischen LOH-Regionen auf den Chromosomen 2, 5 und 10 beobachtet werden.

Tabelle 21: Anteil der durch prognostische LOHs (Loss of Heterozygosity) betroffenen Regionen an der Gesamtgröße der einzelnen autosomalen Chromosomen. Längen sind in kb angegeben.

Chromosom	Größe gesamt	Größe LOH	Anteil (%)	Chromosom	Größe gesamt	Größe LOH	Anteil (%)
1	247000	3287	1.3	12	132000	97	0.1
2	243000	12564	5.2	13	114000	0	0.0
3	199000	5007	2.5	14	106000	740	0.7
4	191000	1934	1.0	15	100000	259	0.3
5	181000	9784	5.4	16	88800	816	0.9
6	171000	5544	3.2	17	78800	3135	4.0
7	158000	4283	2.7	18	76100	2602	3.4
8	146000	2167	1.5	19	63800	0	0.0
9	140000	2176	1.6	20	62400	291	0.5
10	135000	7837	5.8	21	34000	1182	3.5
11	134000	1239	0.9	22	49700	0	0.0

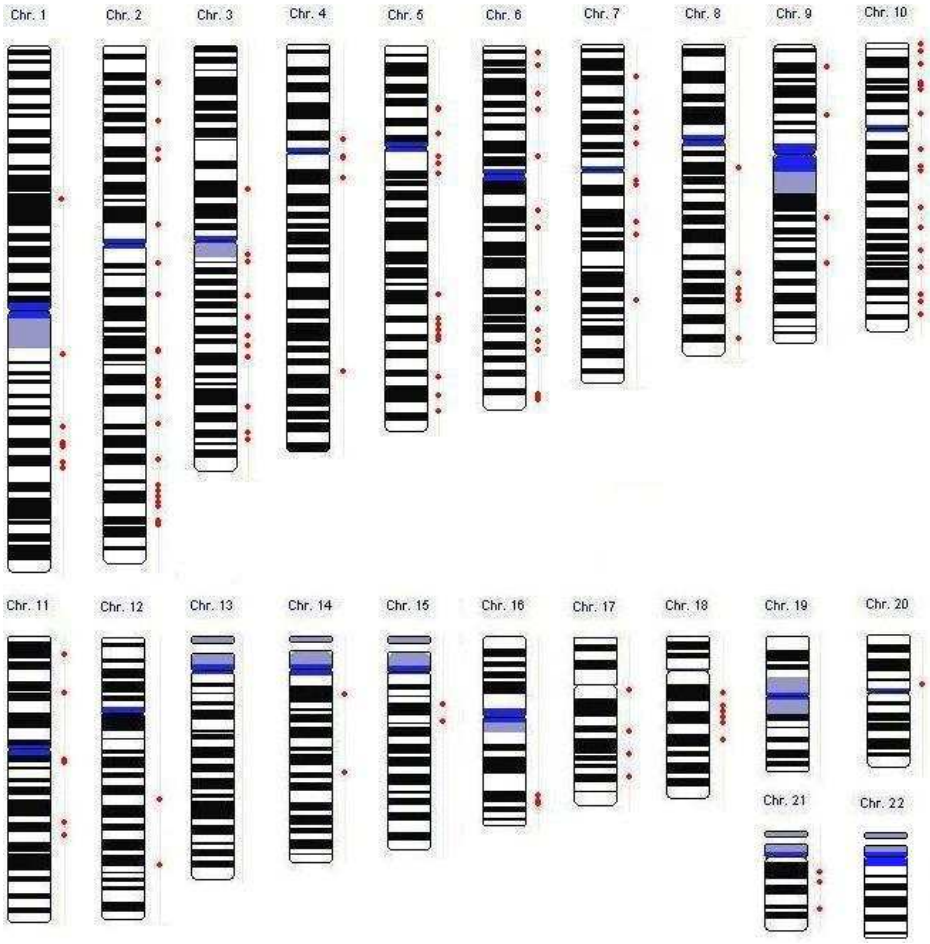


Abbildung 20: Darstellung der Verteilung von prognostischen LOH-Regionen (Loss of Heterozygosity) über das (autosomale) Genom. Identifizierte Regionen sind als rote Punkte neben den entsprechenden Zytobanden markiert.

Die in den prognostischen LOH-Regionen gelegenen Gene wurden mithilfe des UCSC Genome Browsers ermittelt und in einer GoMiner-Analyse auf eine Anreicherung von Genen in bestimmten Signalwegen hin untersucht. Da keine Anreicherung in tumorrelevanten Signalwegen beobachtet werden konnte, wurde zusätzlich eine „Gene Set Enrichment"-Analyse (GESA) durchgeführt. Bei dieser Analyse wird nach Anreicherung gegebener Gene in bereits publizierten Sets von Genen (z. B. bei Untersuchungen an Tumorzellen) gesucht. Eine Auflistung der durch die GSE-Analyse detektierten Gen-Sets mit einer signifikanten Anreicherung (n = 11) ist in Tabelle 22 zu finden.

Tabelle 22: Durch die „Gene Set Enrichment"-Analyse gefundene Anreicherung in bekannten Gen-Sets, mit Angabe der Signifikanz, der False Discovery Rate (FDR) und einer Beschreibung des Gen-Sets

Name des Gen-Sets	p-Wert	FDR	Gen-Set Beschreibung
POD1_KO_DN	>0.001	>0.001	In Nierenkörperchen hochregulierte Gene bei TCF21 (Tumorsuppressor) knockout-Mäusen
HOX_GENES	>0.001	>0.001	Gene aus der Familie der HOX-Gene (Transkriptionsfaktoren bei der Morphogenese)
STEMCELL_EMBRYONIC_UP	>0.001	0.001	In murinen Stammzellen hochregulierte Gene
ALZHEIMERS_DISEASE_UP	>0.001	0.004	Im Hirn von Alzheimer-Patienten als hochreguliert detektierte Gene
BYSTRYKH_HSC_TRANS_GLOCUS	0.004	0.006	In hematopoeitische Stammzellen exprimierte Gene
ALZHEIMERS_DISEASE_DN	0.006	0.007	Im Hirn von Alzheimer-Patienten als herunterreguliert detektierte Gene
STEMCELL_HEMATOPOIETIC_UP	0.000	0.008	In murinen hematopoetischen Stammzellen hochregulierte Gene
FLECHNER_KIDNEY_TRANSPLANT_WELL_UP	0.073	0.116	Differentiell exprimierte Gene in Leberzellen nach Transplantation
STEMCELL_NEURAL_UP	0.089	0.106	In murinen neuralen Stammzellen hochregulierte Gene
RCC_NL_UP	0.127	0.169	Im Nierenkarzinom hochregulierte Gene
BRCA_ER_NEG	0.251	0.271	Im Östrogen-negativen Brust-Tumoren differentiell exprimierte Gene
LEE_TCELLS2_UP	0.318	0.315	In reifen SP4, CB4, und AB4-Zellen angereicherte Gene

3.4 Differentielle Expression

Anhand der Intensitätsdaten der Affymetrix Exon Arrays wurden mithilfe der oneChannelGUI-Software die Expression zwischen PDAC- und Normalgewebe-Proben des Pankreas berechnet. Insgesamt wurden 3652 Gene als differentiell exprimiert (FC > 1,5; $p < 0,05$) detektiert. Alle um mindestens den Faktor 5 differentiell exprimierten Gene (n = 219) sind im Anhang in Tabelle 27 aufgelistet.

Für die Berechnung der differentiellen Expression in Abhängigkeit vom Überleben der PDAC-Patienten wurden zwei Gruppen gebildet. Die Gruppe der Patienten mit kurzer Überlebenszeit (n = 5) zeichnete sich durch ein durchschnittliches Überleben von 6,6 Monaten aus, bei der Gruppe der lange überlebenden Patienten (n = 5) betrug die durchschnittliche Überlebenszeit 28,8 Monate. Da vier der fünf Patienten mit langer Überlebenszeit nach 24 Monaten aus der Überwachung ausschieden, liegt die tatsächliche Überlebenszeit vermutlich deutlich höher. Insgesamt wurden durch die oneChannelGUI-Software 826 Gene als differentiell zwischen beiden Gruppen exprimiert identifiziert (FC > 1,5; $p < 0,05$). Alle hier detektierten Gene mit einer veränderten Expression um mindestens den Faktor 2,5 (n = 74) sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Zwischen der Gruppe der kurz überlebenden Patienten und der Gruppe der lange überlebenden Patienten differentiell exprimierte Gene (FC > 2,5; $p < 0,05$)

Gen	Zytobande	Beschreibung	FC	1/FC	p-Wert
INS	11p15.5	insulin	37.13	0.03	0.0054
HLA-DRB1	6p21.3	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	15.53	0.06	0.0426
HLA-DRB5	6p21.3	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5	13.84	0.07	0.0172
PPY	17q21	pancreatic polypeptide	12.25	0.08	0.0447
SST	3q28	somatostatin	9.84	0.10	0.0196
KRT6A	12q12-q13	keratin 6A	7.42	0.13	0.0366
DND1	5q31.3	dead end homolog 1 (zebrafish)	5.93	0.17	0.0010
GOLGA8B	15q14	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8B	4.73	0.21	0.0066
GOLGA8A	15q11.2	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8A	3.45	0.29	0.0012
FAM83A	8q24.13	family with sequence similarity 83, member A	3.19	0.31	0.0488
PLAU	10q24	plasminogen activator, urokinase	3.12	0.32	0.0346
TFPI2	7q22	tissue factor pathway inhibitor 2	3.02	0.33	0.0351
KRT16	17q12-q21	keratin 16	3.02	0.33	0.0472
RARRES2	7q36.1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	2.53	0.40	0.0040
MAOB	Xp11.23	monoamine oxidase B	0.40	2.50	0.0297
GPR160	3q26.2-q27	G protein-coupled receptor 160	0.40	2.51	0.0116
SLC7A5	16q24.3	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	0.40	2.51	0.0220
SELI	2p23.3	selenoprotein I	0.40	2.53	0.0265
GUCY2C	12p12	guanylate cyclase 2C (heat stable enterotoxin receptor)	0.39	2.53	0.0289
FMO5	1q21.1	flavin containing monooxygenase 5	0.39	2.54	0.0214
SLC40A1	2q32	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	0.39	2.56	0.0267
KLHL23	2q31.1	kelch-like 23 (Drosophila)	0.39	2.57	0.0131
CLDN12	7q21	claudin 12	0.39	2.59	0.0179
GSR	8p21.1	glutathione reductase	0.39	2.60	0.0170

Gen	Zytobande	Beschreibung	FC	1/FC	p-Wert
GALNT7	4q31.1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (GalNAc-T7)	0.38	2.62	0.0144
TRIM2	4q31.3	tripartite motif-containing 2	0.37	2.69	0.0150
UBXN10	1p36.12	UBX domain protein 10	0.37	2.69	0.0448
FAT1	4q35	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)	0.37	2.69	0.0092
FXYD3	19q13.12	FXYD domain containing ion transport regulator 3	0.37	2.70	0.0150
AHCYL2	7q32.1	adenosylhomocysteinase-like 2	0.37	2.71	0.0196
MECOM	3q24-q28	MDS1 and EVI1 complex locus	0.37	2.71	0.0122
RNF43	17q22	ring finger protein 43	0.37	2.73	0.0179
BAMBI	10p12.3-p11.2	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis)	0.37	2.74	0.0462
C5orf32	5q31.3	chromosome 5 open reading frame 32	0.36	2.77	0.0022
KLHL23	2q31.1	kelch-like 23 (Drosophila)	0.36	2.77	0.0058
PLEKHB1	11q13.5-q14.1	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 1	0.36	2.78	0.0097
MANSC1	12p13.2	MANSC domain containing 1	0.36	2.79	0.0095
SLC44A4	6p21.3	solute carrier family 44, member 4	0.36	2.80	0.0132
SLC16A1	1p12	solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)	0.35	2.82	0.0356
SYT13	11p12-p11	synaptotagmin XIII	0.35	2.87	0.0014
AKAP1	17q21-q23	A kinase (PRKA) anchor protein 1	0.35	2.90	0.0025
GALNT4	12q21.3-q22	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 4 (GalNAc-T4)	0.34	2.93	0.0020
TFRC	3q29	transferrin receptor (p90, CD71)	0.34	2.96	0.0291
NPR3	5p14-p13	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)	0.34	2.96	0.0261
CPD	17q11.2	carboxypeptidase D	0.33	3.02	0.0006
MATN2	8q22	matrilin 2	0.33	3.02	0.0023
VIL1	2q35-q36	villin 1	0.33	3.05	0.0339
CCDC109A	10q22.1	coiled-coil domain containing 109A	0.33	3.08	0.0221
ATP8B1	18q21-q22|18q21.31	ATPase, class I, type 8B, member 1	0.32	3.14	0.0384
F5	1q23	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	0.32	3.14	0.0129
C5orf23	5p13.3	chromosome 5 open reading frame 23	0.32	3.17	0.0269
DPP4	2q24.3	dipeptidyl-peptidase 4	0.32	3.17	0.0170
KCNE3	11q13-q14	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	0.31	3.20	0.0110
FZD5	2q33-q34	frizzled homolog 5 (Drosophila)	0.31	3.24	0.0245
PLS1	3q23	plastin 1 (I isoform)	0.30	3.37	0.0031
LOC388152	15q25.2	hypothetical LOC388152	0.27	3.65	0.0148
VSIG1	Xq22.3	V-set and immunoglobulin domain containing 1	0.27	3.66	0.0339
PLAC8	4q21.22	placenta-specific 8	0.26	3.89	0.0193
SLC12A2	5q23.3	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2	0.25	3.95	0.0080
TSPAN8	12q14.1-q21.1	tetraspanin 8	0.25	4.02	0.0015
POF1B	Xq21.1-q21.2	premature ovarian failure, 1B	0.25	4.06	0.0069
CLRN3	10q26.2	clarin 3	0.24	4.20	0.0405
MS4A8B	11q12.2	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8B	0.23	4.35	0.0376

Gen	Zytobande	Beschreibung	FC	1/FC	p-Wert
CXADR	21q21.1	coxsackie virus and adenovirus receptor	0.23	4.41	0.0285
CYP3A5	7q21.1	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5	0.22	4.46	0.0013
TMEM45B	11q24.3	transmembrane protein 45B	0.22	4.46	0.0161
ANXA10	4q33	annexin A10	0.22	4.57	0.0450
SLC27A2	15q21.2	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	0.21	4.77	0.0324
LGR5	12q22-q23	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled eceptor 5	0.19	5.34	0.0046
TFF3	21q22.3	trefoil factor 3 (intestinal)	0.17	5.74	0.0176
CLDN18	3q22.3	claudin 18	0.17	5.98	0.0033
MUC17	7q22.1	mucin 17, cell surface associated	0.15	6.47	0.0072
DMBT1	10q26.13	deleted in malignant brain tumors 1	0.13	7.47	0.0278
MUC13	3q21.2	mucin 13, cell surface associated	0.11	8.79	0.0008

Eine Analyse der prognostischen Relevanz der Gen-Expression wurde in dChip durchgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl der zur Verfügung stehenden Fälle (n = 15) wurde die Signifikanz-Schwelle auf einen Wert von 0,001 abgesenkt. Hierbei konnten keine prognostisch signifikanten Gene identifiziert werden.

3.5 Alternative Transkript-Varianten

Die zur Analyse von alternativem Spleißen verwendete Programme detektierten 2303 (oneChannelGUI; MiDAS $p < 0,05$, $SI > 0,5$) bzw. 2174 Gene (easyExon; MiDAS $p < 0.05$, $PAC < 0,5$) als differentiell gespleißt zwischen Proben von PDAC und Normalgewebe des Pankreas. Von diesen Genen wurden 1451 in beiden Software-Paketen erkannt. Neben der Analyse alternativer Transkript-Varianten zwischen Tumor- und Normalgewebe des Pankreas wurden Untersuchungen zwischen Patienten mit langer bzw. kurzer Überlebenszeit durchgeführt und wie oben die Schnittmenge der Ergebnisse gebildet (OCG: 815 Gene; easyExon: 1055 Gene, Schnittmenge 337 Gene). Die aus diesen Schnittmengen aufgrund bekannter Isoformen und visueller Bestätigung ausgewählten 29 Gene wurden durch flankierende PCR, sowie Sequenzierung validiert und konnten in elf Fällen als differentiell gespleißt bestätigt werden. Die gefundenen Transkript-Varianten betreffen die Gene *ADAM19*, *BCAR1*, *CASP8*, *GSTK1*, *LEF1*, *MCM5*, *PIP4K2A*, *PTPRT*, *RHOC*, *TNS4*, *TP53BP1* und *U2AF*. Eine Darstellung erfolgreich validierter Gene ist in Abbildung 21 zu sehen. Die TOP 100 der von oneChannelGUI und easyExon diffentiell zwischen Tumor- und Normalgewebe-Proben des Pankreas als differentiell gespleißt detektierten Gene sind im Anhang in Tabelle 31 und 32 aufgelistet.

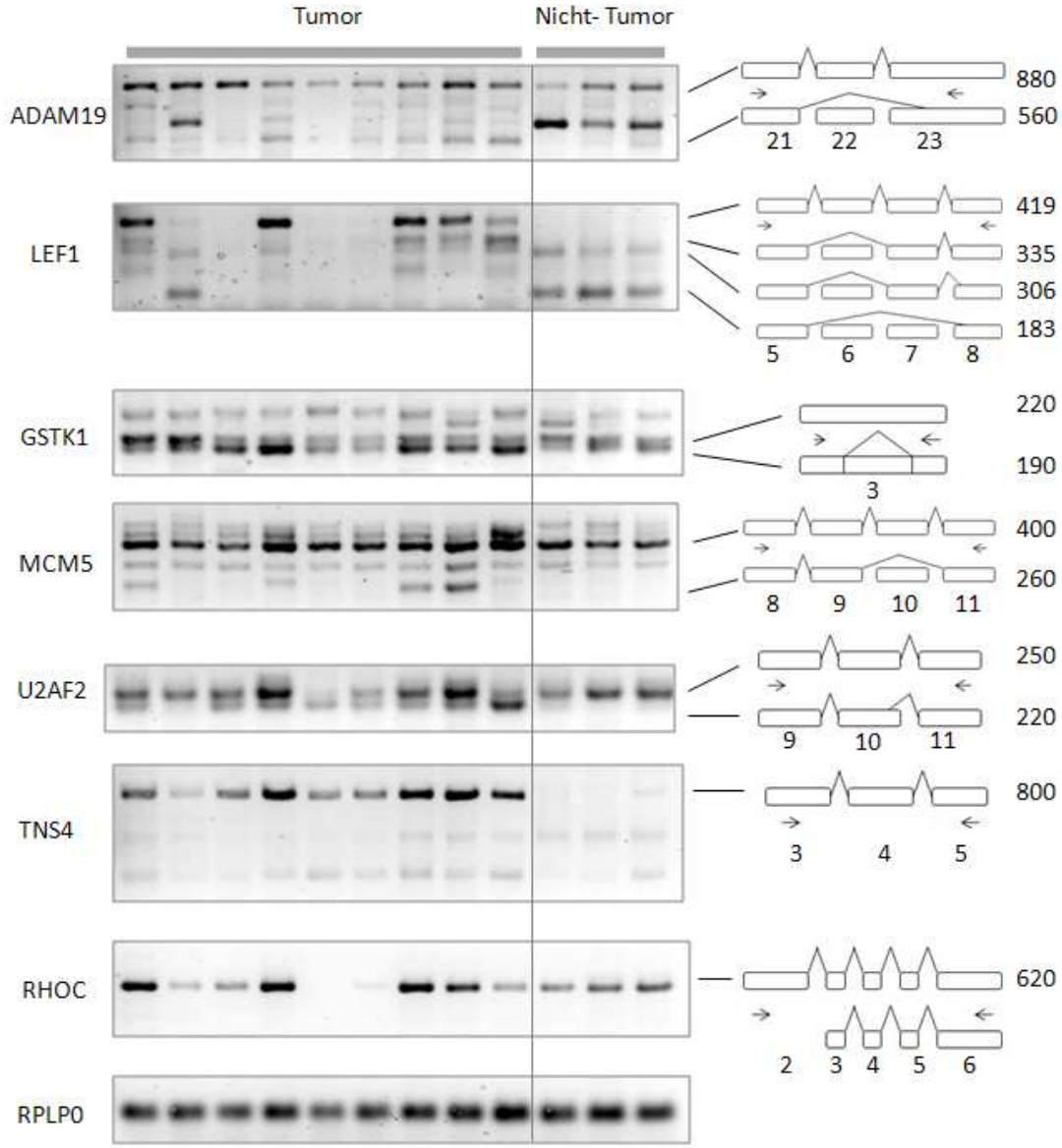


Abbildung 21: Gelbilder und Spleiß-Schemata von 7 der 12 nachgewiesenen Spleiß-Varianten. Auf der linken Seite sind die auf einem Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkte (von Tumor- und Nicht-Tumor-Proben) zu sehen, auf der rechten Seite die korrespondierenden Spleiß-Varianten mit Angabe der Position von Primer und Fragmentlänge. Als Kontrolle diente das Gen RPLP0, da nachgewiesen wurde, dass es in Proben von normalem Pankreas und Proben des duktalem Adenokarzinoms des Pankreas nicht unterschiedlich exprimiert wird.

Das im PDAC involvierte Gen ***LEF1*** wurde in verschiedenen Transkript-Varianten, die sich zwischen Tumor- und Nicht-Tumor-Proben unterscheiden, gefunden. Vier Transkripte mit Längen von etwa 420, 330, 310 und 180 bp konnten auf dem Agarosegel identifiziert werden. Die ersten beiden Varianten kamen ausschließlich in PDAC Proben vor, während die beiden andere nur in Proben aus gesundem Pankreasgewebe auftraten. Die beobachteten Fragment-Größen entsprechen den Größen für das gesamte erwartete Transkript (Exon 5 bis Exon 8;

419 bp), einem Transkript ohne Exon 6 (335 bp), einem Transkript ohne Exon 6 und einem initialen Teil von Exon 8 (308 bp), und einem Transkript ohne Exon 6, Exon 7, und einem initialen Teil von Exon 8. Das Fehlen eines 29 bp langen Stückes von Exon 8 in zwei Transkript-Varianten kommt durch eine alternative „Splice Site“ (Stelle, an der ein Transkript gespleißt werden kann) zustande, die durch die bekannte Transkript-Variante CR604746 bestätigt wird.
Es konnte bestätigt werden, dass eine Transkript-Variante der Metalloproteinase ***ADAM19*** ohne Exon 22 und einem initialen Teil von Exon 23 inTumor-Proben vorkommt. Diese Transkriptvariante konnte in fast allen Proben des PDAC, aber in keiner Probe von Normalgewebe des Pankreas gefunden werden.

Wie von oneChannelGUI und easyExon detektiert, konnte eine Isoform des Gens ***GSTK1*** bestätigt werden, bei der ein interner Teil von Exon 3 fehlte. Aufgrund der Lage des betreffenden Probesets innerhalb von Exon 3 kann die erwartete Größe für das alternative Transkript nicht exakt vorhergesagt werden. GSTK1 ist die einzige in dieser Arbeit bestätigte Spleiß-Variante, bei der Unterschiede hinsichtlich des Überlebens vorhergesagt wurden. In allen untersuchten Fällen sind zwei Banden zu sehen. Diese sind in Nicht-Tumor-Proben ausgeglichen verteilt, während in Tumor-Proben Unterschiede erkennbar sind. In Patienten mit kurzem Überleben (Abbildung 21, Spur 1-3) kann ein größerer Anteil des langen Transkriptes beobachtet werden, während in der Gruppe der lange überlebenden Patienten (Abbildung 21, Spur 7-9) mehr von dem kürzeren Transkript erkennbar ist.

Auch für das Gen **U2AF2** konnte ein vorhergesagtes Spleiß-Ereignis nachgewiesen werden: Neben einer erwarteten Bande mit etwa 250 bp, die das normale Transkript repräsentiert, konnte eine um ca. 20 bp kürzere Bande gefunden werden. Diese repräsentiert ein Transkript, bei dem das 3’Ende von Exon 10 durch Spleißen verkürzt ist. In der NCBI-Datenbank ist diese Variante unter der Nummer NM_001012478 gelistet. Bei dieser Variante kommt es durch das Fehlen der Nukleotid-Sequenz aber nicht zu einer Verschiebung des Leserasters. Der entsprechende Sequenzabschnitt ist in Abbildung 22 dargestellt.

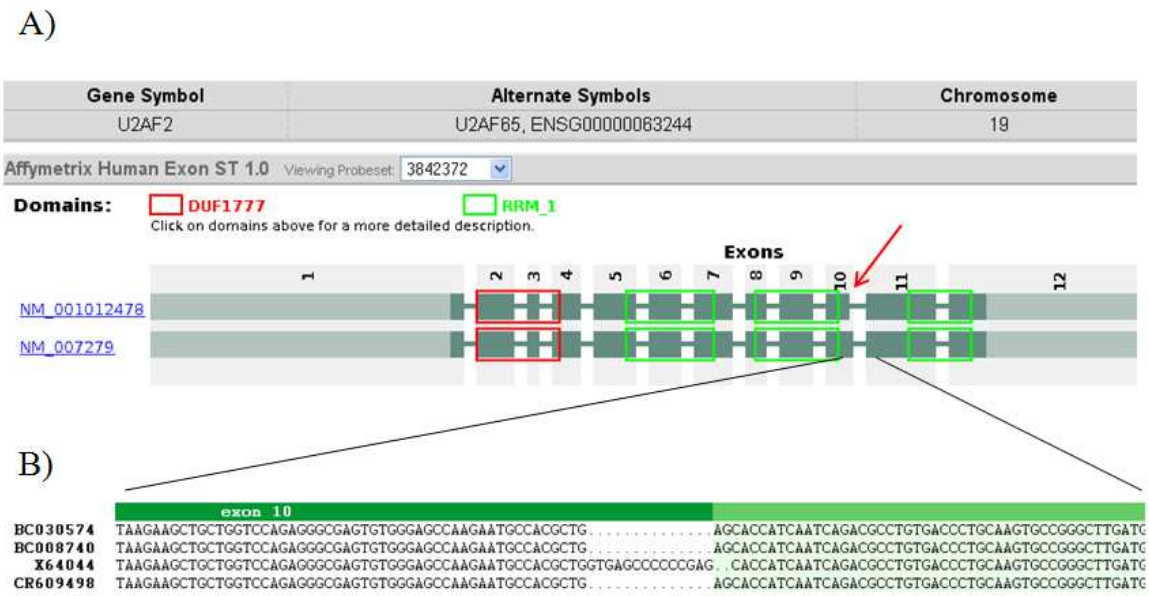


Abbildung 22: Darstellung des in dieser Arbeit validierten Spleiß-Ereignisses im Gen U2AF2. A) Darstellung der Exon-Abfolge in „Splice Center“; B) Darstellung der entsprechenden Nukleotid-Sequenz in der fastDB-Datenbank. Das differentiell gespleißte Exon ist mit einem roten Pfeil markiert.

In fünf von neun untersuchten PDAC-Proben konnte eine zusätzliche alternative Transkript-Form von ***MCM5*** gefunden werden, bei der wie vorhergesagt Exon 10 nicht enthalten war. Verschiedene andere PCR-Fragmente deuten auf die Existenz mehrerer zusätzlicher, nicht Tumor-spezifischer Transkript-Varianten zwischen Exon 9 und Exon 12 hin.

In Nicht-Tumor-Proben wurde ein alternatives Transkript von ***TNS4*** ohne Exon 4 vorhergesagt. Da das betreffende Exon nur in der zweiten Hälfte mit Probesets aus dem verwendeten „core“-Datensatz abgedeckt ist, konnte die Länge des zu erwartenden PCR-Produktes nicht exakt bestimmt werden. In Tumor-Proben ist eine Bande zu sehen, die in Höhe des zu erwarteten kompletten Transkriptes mit Exon 4 verläuft, während in Nicht-Tumor-Proben an dieser Stelle keine bzw. nur sehr schwache Banden zu sehen sind

Die einzige Ausnahme von der Validierung durch flankierende Primerpaare ist ***RHOC***. Da alle bisher bekannten Transkript-Varianten mit Exon 2 beginnen und dieses Exon zugleich als alternativ gespleißt vorhergesagt war, wurde einer der Primer so gelegt, dass dieser innerhalb des potentiell betroffenen Exons bindet. Das Ergebnis auf dem Gel kann demzufolge nur zwei Zustände aufweisen: Entweder ein Produkt mit der erwarteten Länge (d.h. Exon 2 ist enthalten), oder kein Produkt (d.h. Exon 2 fehlt). Wie vorhergesagt wurde in zwei Tumor-

Fällen das Fehlen eines PCR-Produktes und somit ein Transkript ohne Exon 2 nachgewiesen. Bei weiteren Tumor-Fällen konnte nur eine schwache Bande des zu erwarteten Produktes nachgewiesen werden.

Analyse betroffener Signalwege

Eine Analyse der durch oneChannelGUI und easyExon übereinstimmend als alternativ gepleißt vorhergesagten Gene ergab eine Anreicherung in 546 GeneOntology (GO) Kategorien. Es wurden signifikante Anreicherungen in verschiedenen für das Pankreaskarzinom wichtigen Kategorien, wie etwa Zell-Adhäsion oder Kinase-Aktivität, gefunden. Beispielsweise wurden in der Kategorie Zell-Adhäsion Anreicherungen in folgenden Kategorien detektiert: “adherens junctions” (GO:0005912; 21 differentiell gespleißte (DS) Gene), “cell-cell adhesion” (GO:0016337; 43 DS Gene), “cell-matrix adhesion” (GO:0007160; 21 DS Gene), “cell-matrix junctions” (GO:0030055; 16 DS Gene), “extracellular matrix” (GO:0031012; 61 DS Gene), “focal adhesion” (GO:0005925; 16 DS Gene) und “focal adhesion formation” (GO:0048041; 7 DS Gene). In die Kategorie Kinase-Aktivität fallen unter Anderen “regulation of MAPK acticity” (GO:0043405; 19 DS Gene), “protein kinase cascade” (GO:0007243; 74 DS Gene), “transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway” (GO:0007178; 19 DS Gene), “I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade” (GO:0007249; 28 DS Gene) und “activation of JNK activity” (GO:0007257; 6 DS Gene). Außerdem konnte in weiteren Kategorien, wie zum Beispiel “angiogenesis” (GO:0001525; 35 DS Gene) oder “anti-apoptosis” (GO:0006916; 29 DS Gene), signifikante Anreicherungen beobachtet werden. Eine nach einem p-Wert von 0,001 gefilterte Liste der bei der GO-Analyse detektierten Signalwege befindet sich im Anhang in Tabelle 33.

3.6 Expression von miRNAs

Durch Array-Analysen wurden 127 differentiell regulierte miRNAs detektiert, die sich zwischen Normalgewebe und Tumorproben des Pankreas unterscheiden (FC > 1,5; p < 0,05). Der Übersichtlichkeit halber sind im Folgenden (Tabelle 24) nur miRNAs aufgeführt, die mindestens eine Veränderung um den Faktor 3 aufweisen. Eine komplette Liste aller 127 differentiell regulierten miRNAs befindet sich im Anhang in Tabelle 29.

Tabelle 24: Zwischen Tumor- und Normalgewebe des Pankreas differentiell regulierte miRNAs (FC > 3) mit Angabe der „False Discovery Rate“ (FDR, eine statistisch ermittelte Größe für die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Ergebnissen).

miRNA	Intensität PDAC	Intensität Normal	p-Wert	FDR	FC	1/FC
hsa-miR-31	30.4900	4.3748	0.001	0.027	6.97	0.14
hsa-miR-21	29.6456	5.1821	0.000	0.018	5.72	0.17
hsa-miR-155	21.6783	4.2433	0.000	0.018	5.11	0.20
hsa-miR-34b	13.0146	2.7301	0.000	0.002	4.77	0.21
hsa-miR-520c-5p	3.9622	0.8496	0.025	0.164	4.66	0.21
hsa-miR-210	18.3884	4.0024	0.011	0.097	4.59	0.22
hsa-miR-34c-5p	2.4321	0.5531	0.024	0.162	4.40	0.23
hsa-miR-146a	14.6243	3.4154	0.000	0.018	4.28	0.23
hsa-miR-185	42.9712	10.1296	0.000	0.014	4.24	0.24
hsa-miR-199a-3p	50.9282	12.7199	0.006	0.066	4.00	0.25
hsa-miR-199b-3p	51.5929	13.6990	0.007	0.078	3.77	0.27
hsa-miR-100	33.9247	9.0290	0.006	0.070	3.76	0.27
hsa-miR-10a	11.2302	3.2280	0.000	0.018	3.48	0.29
hsa-miR-18a	9.5622	2.8010	0.002	0.039	3.41	0.29
hsa-miR-143	85.7622	25.5369	0.011	0.097	3.36	0.30
hsa-miR-708	10.9120	3.2908	0.002	0.039	3.32	0.30
hsa-miR-214	64.4873	20.6510	0.002	0.039	3.12	0.32
hsa-miR-103	126.3684	40.9443	0.000	0.018	3.09	0.32
hsa-miR-106b	30.0063	9.7712	0.002	0.039	3.07	0.33
hsa-miR-923*	72.9672	244.2097	0.000	0.005	0.30	3.35
hsa-miR-217	7.1567	49.6581	0.021	0.142	0.14	6.94
hsa-miR-216b	4.7457	34.3310	0.002	0.044	0.14	7.23
hsa-miR-216a	5.0788	46.4113	0.003	0.045	0.11	9.14

* Bei miR-923 handelt es sich neueren Angaben der miRBase-Datenbank zufolge um ein Fragment der 28S rRNA. Aus diesem Grund wurde miR-923 im weiteren Verlauf nicht berücksichtigt.

Eine Kaplan-Meier-Analyse der miRNA-Expressionsdaten hinsichtlich Überlebenszeit von PDAC-Patienten zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen Expressionsstatus und Überlebenszeit bei 49 miRNAs ($p < 0,05$). Bei einer Gesamtanzahl von 847 durch den Array erfassten humanen miRNAs entspricht das einem Anteil von etwa 6%. Eine Literaturrecherche in PubMed nach dem Namen der miRNA im Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom (Suchwörter „pancreatic cancer“ bzw. „PDAC“), Tumoren (Suchwörter „tumor“ bzw. „cancer“) und Prognose (Suchwörter „survival“ bzw. „prognosis“) ergab einen Zusammenhang in n = 4 (PDAC), n = 22 (Tumor) und n = 7 (Prognose) Fällen. Eine Übersicht über identifizierte prognostische miRNAs sowie deren in der Literatur beschriebenen Verbindungen zum Pankreaskarzinom, anderen Tumoren und Prognose ist in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Durch Kaplan-Meier-Analysen identifizierte miRNAs mit Korrelation zwischen Expressionsstatus und Überlebenszeit. In den Spalten „PDAC“, „Tumoren“, und „Überleben“ sind entsprechende, in der Fachliteratur beschriebene Zusammenhänge vermerkt.

miRNA	p-Wert	Auswirkung einer Erhöhung der Expression auf das Überleben	PDAC	Tumoren	Überleben
hsa-miR-619	0.0006	Negativ			
hsa-miR-513a-5p	0.0008	Negativ			
hsa-miR-488	0.0009	Negativ			
hsa-miR-1255b	0.0011	Negativ			
hsa-miR-431-star	0.002	Negativ			
hsa-miR-520c-3p	0.0032	Negativ		Ja	
hsa-miR-668	0.0057	Negativ			
hsa-miR-720	0.0058	Negativ			
hsa-miR-193b	0.0058	Negativ		Ja	Ja
hsa-miR-362-5p	0.0063	Positiv		Ja	
hsa-miR-193b-star	0.0072	Negativ			
hsa-miR-183-star	0.0098	Negativ			
hsa-miR-520e	0.0115	Negativ		Ja	
hsa-let-7f-2-star	0.0117	Negativ			
hsa-miR-29b	0.0118	Positiv	Ja	Ja	Ja
hsa-miR-22-star	0.012	Negativ			
hsa-miR-431	0.0134	Negativ			
hsa-miR-502-3p	0.014	Positiv		Ja	
hsa-miR-455-3p	0.0145	Positiv			
hsa-miR-652	0.0145	Positiv		Ja	
hsa-miR-1274b	0.0153	Negativ			
hsa-miR-296-3p	0.0159	Negativ		Ja	Ja
hsa-miR-433	0.0161	Negativ		Ja	Ja
hsa-miR-1225-5p	0.0163	Negativ		Ja	
hsa-miR-301b	0.0169	Negativ		Ja	
hsa-miR-760	0.0172	Negativ			
hsa-miR-557	0.019	Negativ			
hsa-miR-127-3p	0.0213	Negativ		Ja	
hsa-miR-564	0.0215	Positiv			
hsa-miR-1268	0.022	Negativ			

miRNA	p-Wert	Auswirkung einer Erhöhung der Expression auf das Überleben	PDAC	Tumoren	Überleben
hsa-miR-370	0.0253	Negativ		Ja	
hsa-miR-485-3p	0.0261	Negativ		Ja	
hsa-miR-625	0.0265	Positiv			
hsa-miR-29b-1-star	0.0268	Positiv		Ja	
hsa-miR-548e	0.0275	Positiv			
hsa-miR-1256	0.0287	Positiv			
hsa-miR-526a	0.0291	Positiv			
hsa-miR-938	0.0295	Negativ			
hsa-miR-378	0.0299	Positiv		Ja	
hsa-miR-34a	0.0306	Positiv	Ja	Ja	Ja
hsa-miR-22	0.0325	Negativ		Ja	Ja
hsa-miR-142-5p	0.0357	Negativ		Ja	Ja
hsa-miR-654-3p	0.0362	Negativ			
hsa-miR-1826	0.0372	Negativ			
hsa-miR-500-star	0.0445	Positiv			
hsa-miR-518d-5p	0.0451	Positiv			
hsa-miR-1229	0.0481	Negativ		Ja	
hsa-miR-190	0.0482	Positiv	Ja	Ja	
hsa-miR-302f	0.0486	Positiv		Ja	

Exemplarisch für die Ergebnisse der miRNA-Analyse sind die Kaplan-Meier-Kurven für sechs verschiedene miRNAs in Abbildung 23 dargestellt.

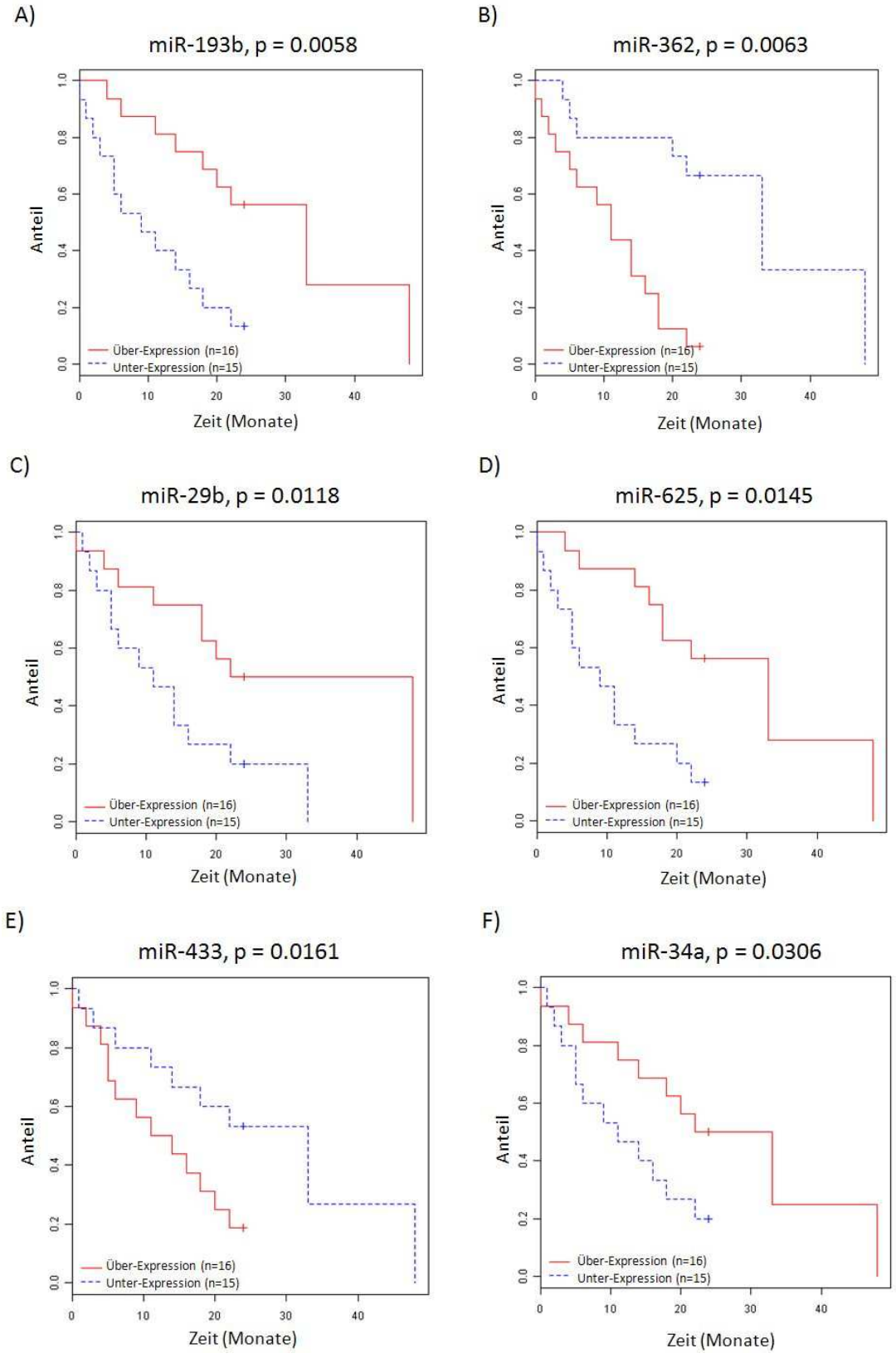


Abbildung 23: Exemplarisch ausgewählte Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Expression von sechs verschiedenen, signifikant mit der Überlebenszeit von Pankreaskarzinom-Patienten in Verbindung stehenden miRNAs: A) miR-193b; B) miR-362; C) miR-29b; D) miR-625; E) miR-433; F) miR-34a.

4 DISKUSSION

In der hier vorliegenden Arbeit wurde anhand verschiedener Microarray-basierter Analysen nach Veränderungen im Genom und Transkriptom von Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas gesucht. Diese Untersuchungen wurden zum einen im Hinblick auf Unterschiede zwischen Proben von Tumor- und Normalgewebe des Pankreas, zum anderen mit Fokus auf potentiellen prognostischen Marker durchgeführt. Dabei wurden tumorrelevante SNPs, LOHs und miRNAs identifiziert, differentielle Gen-Expression untersucht, sowie zwischen PDAC und Normalgewebe des Pankreas unterschiedlich gespleißte Transkript-Formen nachgewiesen.

4.1 Patientenproben

Die Auswahl der Patientenproben spiegelt mit einem medianen Alter von 68 (♂) bzw. 61.5 (♀) Jahren und einer Geschlechterverteilung von 57% (♂) zu 43% (♀) das Auftreten des Pankreaskarzinoms in der Bevölkerung in etwa wieder. Mit einem medianen Überleben von 15,5 Monaten unterscheiden sich die verwendeten Patientenproben jedoch deutlich von den in der Fachliteratur publizierten Werten von nur etwa 6 Monaten Überleben nach Diagnosestellung (Mössner 2010). Ursache hierfür ist die selektive Auswahl der verwendeten Patientenproben, da aufgrund der geplanten Verwendung der Proben für die Analyse prognostischer Marker sowohl kurze, als auch lange Überlebenszeiträume möglichst gleichmäßig abgedeckt werden sollten.

Im Gegensatz zu einigen zuvor publizierten Microarray-Analysen zum Pankreaskarzinom wurde in dieser Arbeit auf Probenmaterial verzichtet, das durch Mikrodissektion gewonnen wurde. Mikrodissektion von einzelnen Tumorzellen ermöglicht zwar einen höheren Prozentsatz an Tumorzellen in einer Probe, auf DNA-Material basierende Microarray-Daten, die aus diesem Probenmaterial gewonnen wurden, zeichnen sich jedoch nach eigenen Erfahrungen durch ein starkes Rauschen aus und können deswegen nur bedingt miteinander verglichen werden. Die schlechtere Qualität von mikrodisseziertem DNA-Material beruht vermutlich auf einer langen Probenvorbereitung, den verwendeten Polymeren bzw. Membranen (Espina et al. 2006), und der aufgrund der insgesamt geringen Ausbeute nötigen Amplifikation des Proben-Materials. Um trotz des Verzichts auf Mikrodissektion hohe Anteile an Tumorzellen zu gewährleisten, war eine histologische Beurteilung der PDAC-Proben deshalb von großer Bedeutung.

4.2 Kopienzahl-Veränderungen im Pankreaskarzinom

Humane Zellen besitzen einen diploiden Chromosomensatz, der aus 46 einzelnen Chromosomen besteht. Aufgrund dieses diploiden Zustandes befinden sich in jeder Zelle im Normalfall zwei Kopien desselben Gens, wobei je eine Kopie von der Mutter und eine Kopie vom Vater stammt. Durch Fehler bei Meiose oder Mitose, bzw. durch DNA-Doppelstrangbrüche können Karyotypen entstehen, die eine aberrante Kopienzahl einer Region aufweisen. Durch homologe Rekombination können diese Aberrationen wieder ausgeglichen werden, wobei durch die Verdoppelung der verbleibenden Kopie eines Gens allerdings auch Mutationen dupliziert werden (Pastwa und Błasiak 2003). Falls chromosomale Verluste nicht Kopienzahl-neutral ausgeglichen werden können, kommt es durch „nicht-homologes End-Joining“ zur Ligation der DNA-Stränge, ohne den verloren gegangenen Abschnitt wiederherzustellen (Moore und Haber 1996). Eine weitere Möglichkeit ist „single strand annealing“, bei der die beschädigten DNA-Stränge anhand der Überlagerung von repetetiven Sequenzen zusammengefügt werden, wobei hier der Bereich zwischen den repetetiven Sequenzabschnitten entfernt wird (Pastwa und Błasiak 2003). Dies führt zu dauerhaft veränderter Kopienzahl in einer Region. Aberrante Kopienzahl beeinflusst auch die Expression der in dieser Region gelegene Gene, falls zum Beispiel die zweite Kopie eines Gens durch epigenetische Modifikationen wie z. B. Methylierung inaktiviert (Lupski und Stankiewicz 2005), oder durch Mutation verändert ist. In einer vor kurzem veröffentlichten Studie des „1000 Genomes Project“ wurde durch Genom-Sequenzierung gezeigt, dass in gesunden Menschen im Durchschnitt etwa 250-300 loss-of-function Mutationen, und etwa 50-100 Varianten, die in Zusammenhang mit hereditären Krankheiten stehen, zu finden sind (The 1000 Genomes Project Consortium 2010). Ein monoallelischer Verlust, bei gleichzeitigem Auftreten eines defekten oder funktionell veränderten Gens auf dem homologen Chromosom, kann so die maligne Transformation von Zellen einleiten. Der Verlust von Genen ist Ursache einer Reihe von Erkrankungen, wie der Neurofibromatose Typ 1 (De Luca et al. 2007) oder Tumoren und Leukämien (Kumar 2008).

Die 69 hier mittels Affymetrix 250K Nsp Arrays untersuchten Proben des PDAC zeichnen sich, verglichen mit anderen Tumorarten oder Tumor-Zelllinien, in den meisten Fällen durch ein Profil ohne größere genomische Aberrationen aus. Im Median wurden durch die Software DNAcopy 10,5 aberrante Regionen pro untersuchtem Fall identifiziert, wobei jedoch nur wenige rekurrent auftretende Regionen detektiert wurden.

Eine Ursache für diese geringe Anzahl an detektierten genomischen Veränderungen ist, dass in Proben des Pankreaskarzinoms aufgrund des relativ geringeren Tumorzell-Anteils teilweise nur geringe Unterschiede auftreten, die für den verwendeten Algorithmus schwer zu detektieren sind. Bei Proben mit einem sehr hohen Tumorzell-Anteil, wie es beispielsweise bei gut differenzierten Tumoren oder Leukämien möglich ist, liefert eine Detektion von aberranten Regionen durch Algorithmen wie DNAcopy dagegen in der Regel gute Ergebnisse.
Als ein weiterer Grund für die geringe Anzahl der genomischen Veränderungen kann die nicht-repräsentative Auswahl an Tumorproben angesehen werden. Proben von Tumormaterial konnten nur bei Patienten entnommen werden, bei denen eine operative Entfernung des Karzinoms durchgeführt wurde, da diese aussichtsreich für eine kurative Behandlung erschien. Dies war in Fällen mit aggressiv wachsendem Tumor und bereits gebildeten Metastasen nur selten möglich. Bei diesen sehr aggressiv wachsenden Tumoren ist eine größere Anzahl von aberranten Bereichen durchaus denkbar.

Eine visuell durchgeführte Inspektion der genomischen Profile zeigte eine verbesserte Detektions-Rate gegenüber der verwendeten Software, beruht aber im Gegensatz zu Detektions-Algorithmen auf subjektiver Wahrnehmung und wurde deswegen auf Regionen beschränkt, die in mindestens 30% aller untersuchten Fälle auftraten. Durch diese manuelle Inspektion der in CNAG und dChip dargestellten Daten konnten 21 rekurrent auftretende Regionen identifiziert werden, die in mehr als 30% aller Fälle enthalten waren. Hiervon betrafen 15 Veränderungen bekannte Gene, in 8 Fällen wurden bisher uncharakterisierte Transkripte gefunden. Neben diesen wurde außerdem miR-128-2 in einer monoallelischen Deletion gefunden. Neun Regionen lagen in Bereichen bekannter Kopienzahl-Polymorphismen und sind somit trotz des häufigen Auftretens nicht zwangsläufig spezifisch für das PDAC, da CNVs auch in gesunden Personen auftreten können.

Die im Pankreaskarzinom durch Software-Analysen und manuelle Inspektion untersuchten Proben weisen, verglichen mit PDAC-Zell-Linien oder anderen Tumorarten, eine geringe Ausdehnung und Anzahl von Aberrationen auf. Hierbei bietet die Untersuchung mit den verwendeten Affymetrix 250K Arrays gegenüber älteren Array-Typen wie der Matrix-CGH deutliche Vorteile aufgrund der besseren Abdeckung des Genoms mit Probesets. Das geringe Ausmaß der gefundenen genomischen Veränderungen deutet darauf hin, dass im Pankreaskarzinom die meisten tumorrelevanten Vorgänge nicht in direktem Zusammenhang

mit der Kopienzahl stehen, sondern eher in den Bereichen differentielle Expression, LOH, oder Mutation zu finden sind. Gerade die Wichtigkeit von Mutationen im PDAC wird auch dadurch untermauert, dass fast alle für das Pankreaskarzinom beschriebenen Gene durch eine Mutation verändert sind (siehe Kapitel 1.5).

Mit etwa 65% aller PDAC-Proben ist der monoallelische Verlust auf Chromosom 18 (4.969.610-4.969.980 bp) die am häufigsten verbreitete Aberration in den hier untersuchten PDAC-Proben. Nach Angaben des UCSC Genome Browsers (March 2006, [NCBI36/hg18]) befindet sich kein vorhergesagtes oder bestätigtes Gen in diesem Bereich. Denkbar wäre, dass derartige Bereiche entweder bisher unentdeckte Transkripte enthalten, regulatorische Funktionen ausführen, oder im Zuge der fortschreitenden genomischen Instabilität entstanden sind.

Zu den in den untersuchten PDAC-Proben am häufigsten in rekurrent veränderten Regionen gelegenen Genen zählen unter anderem SLC16A7, LEF1, ARPP-21, FHIT, XKR6, NAT13 und MRGPRX1. Hierbei muss beachtet werden, dass sich die beobachteten Aberrationen in den meisten Fällen nicht über das gesamte Gen erstrecken. Lediglich das Gen MRGPRX1 ist komplett in einer amplifizierten Region enthalten, was aber auch an der geringen Länge des Gens von nur etwa 1,2 kb liegt.

Mit **SLC16A7** (MCT2) zählt ein Gen aus der Gruppe der Monocarboxylat-Transporter zu den am häufigsten deletierten Genen im Pankreaskarzinom. In fast der Hälfte aller untersuchten Fälle (45%) konnte diese mindestens 552 bp lange Deletion detektiert werden. Interessanterweise liegt die aberrante Region im Bereich des letzten Exons, sowie der 3'UTR, in der sich auch Bindestellen für die miRNAs miR-141 sowie miR-200a befinden. In Patienten, die diese Deletion tragen, wären Transkripte von SLC16A7 somit unabhängig von der Regulation durch die beiden oben genannten miRNAs.
SLC16A7 ist in gesunden Geweben normalerweise nur schwach exprimiert, in Tumor-Zelllinien ist jedoch eine stärkere Expression zu beobachten (Lin et al. 1998). Das Genprodukt von SLC16A7 übernimmt hierbei die Funktion eines Pyruvat- und Lactat-Transporters. Die verstärkte Expression von SLC16A7 könnte unter anderem eine Folge der Deletion im 3'UTR sein, die in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben wird. In Tumoren führt diese erhöhte Expression zu einem erhöhten Abtransport von Pyruvat und Lactat, die bei der Glykolyse in Tumorzellen in großer Menge anfallen (Kennedy und Dewhirst 2010).

Bereits 1930 wurde von Otto Warburg („Warburg-Hypothese“) nachgewiesen, dass in Tumorzellen trotz Anwesenheit von Sauerstoff Energie hauptsächlich durch Glykolyse gewonnen wird und so große Mengen an Lactat entstehen.
Interessanterweise steht auch einer der am häufigsten eingesetzten Tumormarker im Pankreaskarzinom (Joergensen et al. 2010) in Verbindung mit Pyruvat: die als PDAC-Tumormarker eingesetzte Isoform 2 der Pyruvat-Kinase (Tu-M2-PK). Diese steuert je nach Form (Tetramer bzw. Dimer) die Umsetzung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat und Lactat, bzw. blockiert diese, so dass kein Lactat entsteht, sondern Pyrvat als Substrat in Stoffwechselwegen zum Aufbau von Nukleinsäuren, Peptiden und Aminosäuren verwendet wird. In Tumorzellen kommt überwiegend die dimerere Form vor, so dass weniger Pyruvat und Lactat in der Zelle anfällt. Dem hier detektierten Transportergen SLC16A7 kommt somit vermutlich eine unterstützende Aufgabe beim Abtransport von Lactat zu.

Neben dem hier detektierten monoallelischen Verlust eines Teils von SLC16A7 wurde mit SNP_A-2198730 ein prognostischer SNP identifiziert, der intronisch im SLC16A7-Transkript liegt. Aufgrund der intronischen Lage ist kein direkter Zusammenhang mit funktionellen Veränderungen im SLC16A7-Gen offensichtlich, denkbar wären aber Veränderungen im Spleiß-Verhalten oder der Formung eines alternativen Startpunktes für die Transkription des Gens. Tatsächlich befindet sich weniger als vier Kilobasen entfernt der Startpunkt eines neuen alternativen SLC16A7-Transkriptes, dessen Expression unter Umständen mit dem SNP-Status von SNP_A-219873 in Zusammenhang steht. Da das Transkript des Gens SLC16A7 auf den hier verwendeten Affymetrix Exon Arrays nicht durch Probesets aus dem untersuchten „Core“-Datensatz abgeckt ist, liegen keine eigenen Daten zur Expression oder zu exprimierten Transkript-Varianten vor.

Das Gen **LEF1**, das in etwa 40% aller untersuchten PDAC-Proben von einer Deletion betroffen ist, wurde bereits in mehreren Studien zum Pankreaskarzinom beschrieben. Neben einer in Tumorproben stark erhöhten Expression, die auch anhand eigener Daten (Faktor 4,6) bestätigt werden konnte, wurden für LEF1 vor kurzem alternative Transkript-Varianten identifiziert (Jesse et al. 2010). Auch diese konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Kapitel 3.4). In einer Studie zum Auftreten von colorektalen Lebermetastasen wurde eine erhöhte Expression von LEF1 außerdem als prognostischer Marker für das Auftreten diese Metastasen identifiziert (Lin et al. 2011). Funktionell übernimmt das Genprodukt von

LEF1 eine Rolle im Wnt-Signalweg, wo es zusammen mit β–Catenin die Aktivierung von Proliferations-fördernden Genen, wie z. B. CyclinD1 und c-Myc, bewirkt.
Die hier identifizierte rekurrent auftretende monoallelische Deletion im Bereich des LEF1-Gens betrifft einen kurzen, mindestens 500 bp langen Sequenzabschnitt zwischen Exon 4 und 5, wobei sich die Deletion nahe Exon 4 befindet und dieses möglicherweise direkt betrifft. Dies könnte zu einer alternativen Transkript-Variante, und somit zu einer veränderten Funktion gebildeten Proteins führen. Denkbar wäre beispielsweise eine dauerhafte Aktivität von LEF1 im wnt-Signalweg, was zur ständigen Expression von Proliferations-assoziierten Genen führen würde.

Das rekurrent durch eine Deletion auf Chromosom 3 betroffene Gen **FHIT** fungiert in einigen Tumoren als Tumor-Suppressor (Bianchi et al. 2007). In Speiseröhren-, Magen-, und Darmkarzinomen wurden außerdem alternative Transkript-Varianten dieses Gens nachgewiesen (Zanesi et al. 2005). Die hier detektierte Deletion befindet sich in einem intronischen Bereich und steht nicht in unmittelbarer Nähe zu bekannten Exons von FHIT. Möglicherweise ist der rekurrente Verlust dieser genomischen Region aber auch auf die Lage in dem als „common fragile site FRA3B“ bezeichneten Chromosomenabschnitt zurückzuführen. Ein rekurrenter Verlust dieses Teilstückes könnte somit Anzeichen einer beginnenden genomischen Instabilität sein.

Die microRNA **miR-128-2** wurde ebenso wie das Gen ARPP-21 in etwa der Hälfte aller untersuchten Proben als monoallelisch deletiert nachgewiesen. Durch mehrere Studien wurde eine Wachstums-inhibierende Funktion dieser miRNA in Tumorzellen gezeigt, bei der das Tumorwachstum durch Anstieg der Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (Venkataraman et al. 2010), Induktion der zellulärer Seneszenz und Inhibierung der Selbst-Erneuerung von Progenitor-Zellen (Yu et al. 2010, Godlewski et al. 2008) verlangsamt wird. Keine, bzw. eine verringerte Expression dieser miRNA bewirkt in Tumorzellen den Verlust einer Kontrollmöglichkeit für das Zellwachstum. In den eigenen Daten zur Expression von miR-128-2 im Pankreaskarzinom konnte aber weder zwischen Tumor und Normalgewebe, noch zwischen Patienten mit kurzem und langem Überleben ein Unterschied in der Expression identifiziert werden. Da die 31 mittels Affymetrix miRNA-Arrays untersuchten PDAC-Proben diese Deletion in nur 16 von 30 (53%) Fällen (ein Fall ohne korrespondierenden SNP-Array) gefunden werden konnte, wäre eine Veränderung der miRNA-Expression zwischen allen Tumor- und Normal-Fällen allerdings auch nur bei großen Expressions-Unterschieden

detektierbar. Eine deshalb durchgeführte Untersuchung der differentiellen Expression (Daten nicht gezeigt) zwischen Fällen mit einem genomischen Verlust in der entsprechenden Region und Fällen ohne Kopienzahl-Veränderung zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Expression von miR-128 ($FC > 1,5$; $p < 0,05$).

Das einzige im Zusammenhang mit dem Überleben von Patienten mit PDAC gefundene Gen, das in einer aberranten Region gelegen ist, ist **XKR6**. Hierbei konnte eine starke Anhäufung einer monoallelischen Deletion von XKR6 in Proben von Patienten mit langem Überleben identifiziert werden. Ob dieser protektive Effekt mit XKR6 selbst, oder mit der in der Deletion gelegenen CNV-Region verbunden ist, kann nicht abschließend geklärt werden.
Die Genfunktion von XKR6 („XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 6“) ist bisher ungeklärt, sollte aber aufgrund des Zusammenhangs zwischen der partiellen Deletion von XKR6 und dem positiven Einfluss auf das Überleben von PDAC-Patienten weiter untersucht werden.

Neben diesen, bereits in Verbindung mit Tumoren beschriebenen Genen wurden mit **ARPP-21**, **MRGPRX1** und **NAT13** weitere Gene gefunden, die bisher zwar nicht in Zusammenhang mit Tumoren beschrieben wurden, jedoch ebenfalls potentiell von Bedeutung für das Pankreaskarzinom sind. MRGPRX, das als einziges Gen in einer amplifizierten Region liegt, fungiert als membrangebundener Rezeptor, ist aber bisher nur wenig untersucht. Möglicherweise ist die Amplifikation des entsprechenden Bereiches aber auch auf einen beschriebenen CNV in der entsprechenden Region zurückzuführen, und somit nicht unbedingt relevant für onkogene Veränderungen im PDAC.

Rekurrent auftretende Regionen, die kein postuliertes oder bekanntes Gen enthalten sind vermutlich im Zuge der zunehmenden Instabilität des Tumor-Genoms entstanden. Dabei treten in den untersuchten Pankreaskarzinom-Proben bevorzugt eine Reihe von kleinen aberranten Regionen auf, wobei von der absoluten Anzahl mehr Verluste als Zugewinne detektiert werden konnten. Ob diese Veränderungen eher zufällig durch fortschreitende genomischen Instabilität entstanden sind, oder einen wichtigen Beitrag zur Entstehung von Tumoren leisten, wird durch zukünftige Studien (Sequenzierung von PDAC-Genomen und Transkriptomen, Verbesserte Algorithmen zur Detektion tumorrelevanter Regionen, etc.) zu klären sein.

4.3 Prognostische SNPs

SNPs sind genetische Variationen von einzelnen Basen, die im Normalfall keine negativen Auswirkungen für einen Organismus haben und über das gesamte Genom verteilt sind. Zwei zufällig ausgewählte Menschen unterscheiden sich in der Ausprägung von durchschnittlich 3 Mio SNPs, bei einer Gesamtanzahl von aktuell über 12 Mio bekannten SNPs im humanen Genom. Aufgrund der Redundanz des genetischen Codes müssen aber selbst SNPs in kodierenden Bereichen nicht zwangsläufig zu einem Aminosäure-Austausch führen. In kodierenden Sequenz-Abschnitten von Genen gelegene SNPs können, neben Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz, auch zur Expression von alternativ gespleißten Transkript-Varianten führen, wie es beispielsweise für den Polymorphismus A870G im Gen CCND1 (CyclinD1) belegt ist (Fu et al. 2004).

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 81 SNPs identifiziert, bei denen das Überleben von Patienten mit Pankreaskarzinom siginifikant mit dem SNP-Status korreliert. Durch Analyse dieser SNPs mittels der is-rSNP-Software konnten in etwa der Hälfte aller identifizierten SNPs Motive für Transkriptionsfaktor-Bindestellen gefunden werden. Da viele dieser Stellen einen großen Abstand zu benachbarten Genen aufweisen, kann derzeit keine präzise Aussage über mögliche Auswirkungen dieser SNPs auf Vorgänge im Pankreaskarzinom getroffen werden. Eine mögliche Erklärung könnte aber die Formung neuer „Open Reading Frames“ (ORF, Offenes Leseraster) sein, durch die bei entsprechendem SNP-Status Transkripte gebildet werden können. Weitere Möglichkeiten zur Einflussnahme dieser SNPs auf zelluläre Vorgänge könnte die sogenannte „Long Range Regulation“ (Miele und Dekker 2008) sein, die bisher nur wenig erforscht ist. Hierbei wird davon ausgegangen, dass sich regulatorische Elemente oft weit entfernt (u.a. sogar auf unterschiedlichen Chromosomen) von den regulierten Genen befinden können.

Durch die Untersuchung der SNPs mithilfe der GRAIL-Software sollten Gene identifiziert werden, die in Verbindung mit onkogenen Veränderungen im Pankreaskarzinom stehen. Hierfür wurde von der Software für jeden SNP eine Region definiert, die durch flankierende Rekombinationshotspots begrenzt war. Innerhalb dieser Regionen wurden durch die Software dann Gene in einer „Text Mining“-Analyse der PubMed-Literaturdatenbank charakterisiert und Ähnlichkeiten zwischen diesen Genen identifiziert. Die GRAIL-Software identifizierte in Test-Datensätzen bereits viele in Verbindung mit Krankheiten stehende Gene, bzw. Gene, die bisher nicht mit der Krankheit in Verbindung standen, aber von der Funktion plausibel

erschienen. Anhand der identifizierten prognostischen SNPs im Pankreaskarzinom wurden bei der GRAIL-Analyse zehn Gene identifiziert, von denen der Großteil eigenen Literatur-Recherchen zufolge in Verbindung mit Tumoren steht. Beispielsweise wurde für SLIT3 eine Funktion als Suppressor des Tumorwachstums im Brustkrebs nachgewiesen (Marlow et al. 2008) oder für RAMP3, NCAM2, ADYC1 eine stark veränderte Expression in Tumoren beschrieben (Brekhman et al. 2011, Takahashi et al. 2011, Li, Liang, et al. 2010).

Besonders hervorzuheben ist hierbei auch das Gen **SEMA3E**, das in einem Intron von einem als prognostisch relevant identifizierten SNP betroffen ist. Dieser SNP betrifft neben dem Intron auch eine Bindestelle für das Transkriptionsfaktor-Heterodimer Hand1::Tcfe2a, was eine Beteiligung an der Regulation von SEMA3E vermuten lässt. Tatsächlich wurde eine niedrigere Expression (Faktor 1,7) von SEMA3E in Patienten mit kurzem Überleben gefunden. Die potentielle Relevanz für das Pankreaskarzinom wird außerdem mit der Detektion des Gens durch die GRAIL-Software bestätigt.

SEMA3E (Semaphorin 3) interagiert mit dem Rezeptor Plexin D1, wobei die Expression von Plexin D1 direkt durch den Vaskulären Epidermalen Wachstumsfaktor (VEGF) kontrolliert wird (Kim et al. 2011). Die Interaktion von SEMA3E und Plexin D1 bewirkt eine negative Rückkopplung des VEGF-induzierten „Delta-like 4 (Dll4)-Notch“ Signalweges und damit eine verlangsamte Neubildung von Blutgefäßen. In Patienten, bei denen SEMA3E niedrig exprimiert wird, kommt es somit zu einer schnelleren Angiogenese. Dies führt zu einer besseren Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen und ermöglicht somit ein schnelleres Wachstum der Tumorzellen. Dies könnte unter anderem ein Grund für die schlechte Prognose dieser Patientengruppe sein. Neben einer besseren Nährstoffversorgung könnte auch der direkte Zugang der Tumorzellen zum Blutkreislauf eine wichtige Rolle bei der schnellen Ausbreitung von Metastasen spielen.

Die genauen Auswirkungen von SNPs in nichtkodierenden Bereichen sind noch nicht entgültig geklärt, es gibt aber Hinweise auf tumorrelevante Auswirkungen. Im Prostatakarzinom wurden beispielsweise viele Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren AR und FoxA1 gefunden, die in Nähe von Hochrisiko-SNPs gelegen waren (Lu, Zhang, et al. 2011). Interessanterweise liegt eine durch einen SNP betroffene Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AR im oben beschriebenen Gen SLC16A7, was dessen mögliche Bedeutung für das Pankreaskarzinom weiter unterstreicht.

Bei SNPs, die innerhalb regulatorischer Regionen wie Promotoren oder miRNA-Bindestellen liegen, ist ein Einfluss auf die Genregulation wahrscheinlich. Die Lage von prognostischen SNPs innerhalb von miRNA-Bindestellen wurde durch die Online-Applikation „SNPinfo Web Server“ überprüft. Hierbei wurden zwei Einzelnukleotid-Polymorphismen identifiziert: SNP_A-2244245, der sich im kodierenden Bereich des Gens CCDC6 in einer Bindestelle für miR-455_3P befindet, und SNP_A-2275779, der im kodierenden Bereich des Gens BICD2 in einer Bindestelle für miR-125a und miR-125b gelegen ist. Dies deutet auf eine Beteiligung der SNP an der Regulation der Gene CCDC6 und BICD2 durch miRNAs hin.

In der in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten Gen-Expression tauchen CCDC6 und DICD2 aufgrund der Filterung (FC > 1,5) nicht auf. Aus den Rohdaten kann jedoch mit einer um den Faktor 1,3 bzw. 1,4 erhöhten Expression eine Tendenz zu einer leicht erhöhten Expression in Tumor-Proben festgestellt werden. Die in miRNA-Bindestellen gelegenen SNPs könnten diesen Effekt unterstützen. Der regulatorische Effekt von miRNAs kann jedoch nicht durch Expressions-Analysen nachgewiesen werden, da hierbei nur die Menge des vorhandenen Transkriptes erfasst wird, die Menge an gebildetem Protein aber unberücksichtigt bleibt.

In der in dieser Arbeit ebenfalls durchgeführten Analyse zur prognostischen miRNA-Expression (siehe Kapitel 4.3) wurde miR-455_3p als prognostisch relevant identifiziert und untermauert somit die Bedeutung des gefundenen SNP_A-2244245 für das Pankreaskarzinom. Für das durch den SNP betroffene Gen CCDC6 konnte eine Beteiligung an der ATM-abhängigen Antwort auf DNA-Schäden im Schilddrüsenkrebs, wo es häufig zu Rearrangements von CCDC6 kommt, nachgewiesen werden (Merolla et al. 2007). ATM ist ein wichtiges Protein für die Überwachung und Erhaltung der genomischen Integrität und interagiert dabei mit dem im Pankreaskarzinom häufig mutiert vorliegenden Protein p53 (Derheimer und Kastan 2010).

Die zweite von einem SNP betroffene Bindestelle (miR-125a/miR-125b) befindet sich im Gen BICD2, wo der SNP-Status sowohl direkte Auswirkungen auf das gebildete Genprodukt, als auch die miRNA-abhängige Regulation des Gens haben kann. BICD2 kodiert für ein Adapter-Protein zwischen Motor-Proteinen und deren transportierten Vesikeln. Vor kurzem wurde aber auch eine Rolle von BICD2 bei der relativen Positionierung von Nukleus und Zentrosomen bei der Zellteilung nachgewiesen (Splinter et al. 2010). Mögliche Störungen der Gen-Expression bzw. der Gen-Funktion könnten so zu genomischen Veränderungen wie LOHs oder aberranter Kopienzahl führen. Interessanterweise wurden miR-125a-5p und miR-125b bereits in Kolorektal- bzw. Magenkarzinom als prognostischer Marker identifiziert

(Nishida, Yokobori, et al. 2011, Nishida, Mimori, et al. 2011). In den in Kapitel 3.5 beschriebenen Untersuchungen der miRNA-Expression tauchen die beiden genannten miRNAs aber weder in der differentiellen Expression zwischen Normal- und Tumorproben, noch in den detektierten prognostischen miRNAs auf.

4.4 Prognostische LOH-Regionen

Generell muss bei einem LOH, sofern kein Verlust in der entsprechenden genomischen Region erkennbar ist, davon ausgegangen werden, dass es sich um eine Uniparentale Disomie (UPD) handelt. Bei der Entstehung einer UPD wird ein verloren gegangener Genom-Abschnitt durch Duplikation des entsprechenden Abschnittes des homologen Chromosoms ersetzt, wobei auch genomische Veränderungen wie z. B. Mutationen dupliziert werden. Gene, die sich in prognostisch relevanten LOH-Regionen befinden, sollten deshalb immer vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass sie durch Mutationen funktionell defekt oder modifiziert sein könnten, oder durch Gen-Silencing (z. B. mittels Methylierung oder Histon-Modifikation) eine verminderte Expression aufweisen.

Durch statistische Analyse von SNP-Status und Überlebenszeit konnten für das Überleben von PDAC-Patienten signifikante LOHs identifiziert werden. Prinzipiell kann jeder einzelne dieser über 37.000 SNPs von Bedeutung sein, im Hinblick auf die Verringerung der Rate an falsch-positiven homozygoten SNPs wurde die weitere Analyse jedoch auf größere Regionen signifikanter LOHs beschränkt.

Durch LOH betroffene Gene

Bei den in LOH-Regionen gelegen Genen sticht vor allem das Gen **PTPRD** heraus, das neben der hier identifizierten LOH-Region auch durch einen prognostisch relevanten SNP betroffen ist (siehe Tabelle 18). In einer vor kurzem veröffentlichten Studie (Giefing et al. 2011) wurde PTPRD als potentieller Tumor-Suppressor identifiziert, dessen Bedeutung durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weiter untermauert wird. Veränderungen in der Sequenz dieses Genes könnten somit unmittelbar mit dem Überleben von Patienten mit PDAC zusammenzuhängen.

Ein weiteres, in einer prognostischen LOH-Region gelegenes Gen ist **SETBP1**. In dieser Arbeit wurde es sowohl in einer der rekurrent deletierten Regionen (40% aller untersuchten

Fälle), als auch bei der Untersuchung prognostischer LOH-Regionen gefunden. Die naheliegende Vermutung, dass die detektierte LOH-Region durch die Deletion verursacht wurde, wird dadurch wiederlegt, dass sich beide Regionen von der Länge her stark unterscheiden. Während die Deletion mit einer Größe von mindestens 0,7 kb und maximal 2 kb sehr klein ist, erstreckt sich die detektierte LOH-Region über eine Länge von 905 kb. Zu SETBP1 gibt es nur wenige Untersuchungen, wobei eine Überexpression in der AML als negativer Faktor für das Überleben der Patienten identifiziert wurde (Cristóbal et al. 2010). Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen geben allerdings keinen Anhaltspunkt für eine generell veränderte Expression bzw. prognostische Aussagekraft der Gen-Expression von SETBP1.

Neben SETBP1 ist auch das bereits in Kapitel 4.3 angesprochene Gen **SEMA3E** in einer prognostischen LOH-Region gelegen. Da eine niedrige Expression dieses Gens in dieser Arbeit als prognostisch relevant für kurzes ein Überleben von PDAC-Patienten identifiziert wurde, wäre denkbar, dass die Ursachen dieser niedrigen Expression in der hier identifizierten LOH-Region zu suchen sind.

Gene Set Enrichment Analyse

Eine GSE-Analyse, bei der die identifizierten Gene mit zuvor publizierten Gen-Sets abgeglichen wurden, ergab eine Anreicherung in 11 Sets von Genen. Vier dieser Gen-Sets stehen dabei in direktem Zusammenhang mit Stammzellen. Dies ist für das Pankreaskarzinom von Bedeutung, da die Genexpressions-Signatur von aggressiven Tumoren ähnlich der von Stammzellen ist (Ben-Porath et al. 2008). Zusätzlich spielen Tumor-Stammzellen in soliden Tumoren eine Rolle bei der Entstehung von Metastasen und dem Nichtansprechen auf chemotherapeutische Behandlungen (Hermann et al. 2010). Auch im Pankreaskarzinom wurden Tumorstammzellen nachgewiesen und werden als eine der Ursachen für die kurze Überlebenszeit von Patienten mit PDAC vermutet (Li et al. 2007). Gene, die in diesen Gruppen detektiert wurden, stehen somit im Verdacht, an der schlechten Prognose im Pankreaskarzinom beteiligt zu sein, und sollten daher durch Sequenzierung der entsprechenden LOH-Regionen genauer untersucht werden.

Auch drei andere Gen-Sets in denen eine Anreicherung von Genen aus prognostischen LOH-Regionen detektiert wurde sind eng mit Tumoren verbunden. Die Gruppe „POD1_KO_DN“ umfasst Gene, die in murinen Nierenkörperchen bei gleichzeitigem Knockout des Tumorsuppressor-Gens TCF21 (Smith et al. 2006) als überexprimiert identifiziert wurden.

Ebenfalls aus einer Untersuchung in Zusammenhang mit der Niere resultiert die zweite Gruppe „RCC_NL_UP“. Diese beinhaltet Gene, die im Nierenkarzinom überexprimiert sind. Die dritte tumorrelevante Gruppe ist „BRCA_ER_NEG“ und enthält Gene, die in Östrogen-negativem Brustkrebs differentiell exprimiert sind. Interessant hierbei ist, dass zwei dieser Gen-Sets aus Untersuchungen an Tumoren stammen, die wie das duktale Pankreaskarzinom ihren Ursprung in Epithel-Zellen haben.

Die GSEA-Identifizierung von Gen-Sets, die in Verbindung mit Tumoren oder tumorrelevanten Vorgängen stehen, unterstreicht die Bedeutung der hier identifizierten LOH-Regionen und der darin gelegenen Gene. Durch Exom- oder Genom-Sequenzierung sollten diese Regionen auf das Vorhandensein von funktionell relevanten Mutationen überprüft werden, um die Bedeutung der hier identifizierten Gene für das Pankreaskarzinom besser abschätzen zu können.

Durch LOH betroffene miRNAs

Neben den hier identifizierten Genen, die in prognostisch relevanten LOH-Regionen liegen, wurden insgesamt 17 miRNAs in diesen Regionen detektiert. Diese sind für die Analyse von onkogenen Vorgängen von großem Interesse, da eine Mutation die Bindefähigkeit der miRNA an deren Zielgene entscheidend beeinflussen kann. Neben der fehlenden Fähigkeit an Zielgene zu binden, kann es durch Mutationen auch dazu kommen, dass bisher unbeteiligte Gene als mögliche Binde-Partner in Frage kommen.

Zu den im Pankreaskarzinom interessantesten in prognostischen LOH-Regionen gelegenen miRNAs zählen miR-10a, miR-10b, miR-21, miR-152, miR-196a, miR-301a und miR-152. Zu diesen liegt eine Reihe von Studien vor, die deren Relevanz für das Pankreaskarzinom unterstreichen. Neben diesen wurden auch einige bisher wenig untersuchte Mikro-RNAs, wie z. B. miR-1304 gefunden, die sich bei näherer Untersuchung möglicherweise ebenfalls als relevant für das Pankreaskarzinom erweisen könnten. Da die Zielgene von miRNAs größtenteils nur vorhergesagt, jedoch nicht experimentell validiert sind, ist der genaue Einfluss jeder miRNA derzeit noch nicht absehbar.

In einer Studie zum Pankreaskarzinom (Weiss et al. 2009) wurde **miR-10a** als wichtiger Faktor bei der Steuerung der Metastasenbildung beschrieben. Interessanterweise reprimiert

miR-10a hierbei Transkripte der Gene HOXB1 und HOXB3, die in derselben LOH-Region wie miR-10a liegen (Chromosom 17, q21.32). In der gleichen Publikation wird die Inhibition der Expression von miR-10a als sinnvoller Therapieansatz bei metastasierenden Tumoren vorgeschlagen. Nach eigenen Expressionsdaten ist miR-10a in Tumorproben um den Faktor 3,5 höher exprimiert als in Proben von Normalgewebe des Pankreas.
Eine miRNA aus der gleichen Familie, **miR-10b**, wurde ebenfalls bereits als wichtiger Faktor im Pankreaskarzinom beschrieben. Nach einer vor kurzem veröffentlichten Studie ist sie an Metastasierung, Invasion und Migration im Pankreaskarzinom beteiligt (Setoyama et al. 2011). In einer anderen Studie (Preis et al. 2011) wird eine Korrelation zwischen der Expression von miR-10b und dem Ansprechen auf Behandlung von PDAC-Patienten, bzw. deren Überleben, beschrieben. Eine niedrige Expression stand hierbei in direktem Zusammenhang mit besserem Ansprechen auf die Behandlung, der Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen operativen Tumorentfernung, späterem Auftreten von Metastasen und einer insgesamt verlängerten Überlebenszeit. Nach den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zu prognostischen miRNAs (siehe Kapitel 4.5) konnte miR-10b jedoch nicht als prognostisch relevant bestätigt werden.

Ebenfalls bereits als klinischer Marker identifiziert wurde **miR-21** (Hwang et al. 2010). Hierbei wurde eine erniedrigte Expression von miR-21 in Verbindung mit einem positiven Behandlungsverlauf und einer guten Prognose für Patienten mit PDAC gebracht. In den vorliegenden Daten zu Expression von miRNAs zwischen Tumor- und Normalgewebe des Pankreas konnte eine 5,7-fache Erhöhung in der Expression von miR-21 in Tumor-Proben beobachtet werden. Denkbar wäre, dass in der entsprechenden LOH-Region regulatorische Elemente für miR-21 durch Mutationen oder epigenetische Modifikationen so verändert sind, dass hierdurch eine erhöhte Expression bewirkt wird. Eine prognostische Relevanz konnte in dieser Arbeit für miR-21 allerdings nicht detektiert werden.

Weitere bereits im Pankreaskarzinom beschriebene Mikro-RNAs sind **miR-196a-1** und **miR-301a**. Patienten mit einer erhöhten Expression von miR-196a-1 zeigten hierbei ein kürzeres Überleben (Kong et al. 2011). Für miR-301a konnte im Pankreaskarzinom ein positiver Effekt auf die Expression des Transkriptionsfaktors NF-κB nachgewiesen werden, der durch Repression der Gen-Expression von Nkrf (NF-κB-repressing factor) zustande kommt (Lu, Li, et al. 2011). NF-κB ist in vielen Tumorzellen ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der unter anderem in den Bereichen Proliferation und Apoptose von Bedeutung ist. Eine prognostische

Aussagekraft konnte jedoch für keine der beiden miRNAs in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

Neben diesen in Verbindung mit dem Pankreaskarzinom stehenden Mikro-RNAs ist auch **miR-152** von klinischer Relevanz in Tumoren. Daten einer vor kurzem publizierten Studie (Chen, Song, et al. 2010) deuten auf eine Involvierung von miR-152 in die Tumorgenese in gastrointestinalen Tumoren hin, wobei sie hierbei auch einen potentiellen Biomarker für diese Tumoren darstellt. In der oben genannten Studie wurde in Tumorproben eine niedrigere Expression als in Normalgewebe-Proben gefunden. Im Gegensatz hierzu wurde in den untersuchten PDAC-Proben eine um den Faktor 2,1 erhöhte Expression von miR-152 gegenüber Proben von pankreatischem Normalgewebe gefunden, was darauf hindeutet, dass eine erniedrigte Expression keine Voraussetzung onkogener Veränderungen ist.

Im Hinblick auf miRNAs stellen die beiden LOH-Regionen auf Chromosom 17 bei den genomischen Positionen 43.038.124 - 44.402.113 (miR-152, miR-1203, miR-10a, miR-196a-1) und 54.542.511-55.565.566 (miR-454, miR-301a, miR-21) den deutlichsten Zusammenhang zwischen potentiell mutierten miRNAs und dem Pankreaskarzinom dar. Diese Regionen sollten durch Genom-Sequenzierung genauer untersucht werden, um möglicherweise durch Mutation veränderte miRNA-Sequenzen zu identifizieren. Dies wäre auch für die Identifikation von alternativen miRNA-Zielgenen eine wichtige Grundlage.

4.5 Differentielle Genexpression

Durch die Verwendung von Affymetrix Exon Arrays konnten prognostisch relevante, differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Hierbei muss allerdings im Hinblick auf die Ergebnisse beachtet werden, dass es sich, aufgrund der eigentlich geplanten Verwendung der Arrays für die Detektion von differentiellem Spleißen, mit einer Fallzahl von 5 Proben pro Gruppe nur um eine relativ kleine Analyse handelt. Aufgrund dieser Sachlage ist in Tabelle 22 die Expression erst ab einer 2,5-fachen Veränderung angegeben, und nicht wie sonst üblich ab 1,5-fach.

Bei der Analyse von Expressions-Veränderungen muss außerdem beachtet werden, dass hierbei nur die vorliegende Menge an Transkripten detektiert werden kann, nicht jedoch die Menge und Funktionsfähigkeit des bei der Translation synthesisierten Proteins.

Veränderungen im Transkript, bzw. Inhibition der Translation durch miRNAs, kann nicht durch Expressions-Analysen nachgewiesen werden.

Auffällig bei der Betrachtung der differentiell exprimierten Gene ist, dass in der Gruppe der kurz überlebenden Patienten mit INS (Insulin), SST (Somatostatin) und PPY (Pankreatisches Polypeptid) drei Gene als stark exprimiert auftreten, die normalerweise nicht in den duktalen Zellen, sondern den Inselzellen der Pankreas exprimiert werden. Die naheliegende Vermutung eines erhöhten Anteils an Inselzellen in den Proben der kurz überlebenden Patienten wird allerdings dadurch wiederlegt, dass die Inselzellen nur etwa 2% der Masse des Pankreas bilden, und davon beispielsweise die Somatostatin produzierenden δ-Zellen nur 3-10% ausmachen. Für eine Herkunft der Proben aus Epithelzellen spricht die hohe Expression von Keratin (KRT6A und KRT16), das in der pathologischen Diagnostik für die Herkunftsbestimmung von Metastasen epithelialen Ursprungs Verwendung findet.

Eine weitere Auffälligkeit ist die niedrigere Expression einer Reihe von Transport-Proteinen (SLC7A5, SLC16A1, SLC12A2, SLC27A2, SLC40A1, SLC44A4) in Proben von Patienten mit kurzem Überleben. Da Transporter aus der SLC-Familie am Transport von hydrophilen Wirkstoffen beteiligt sind, könnte eine niedrige Expression zu einer Abschwächung der Wirkung von Medikation, und somit zu einem Nicht-Ansprechen auf Behandlungen führen.

Mit der niedrigen Expression von DMBT1 befindet sich unter den am stärksten differentiell exprimierten Genen außerdem ein Gen, das möglicherweise als Tumor-Suppressor fungiert. Im Prostata-Karzinom ist ein Verlust der Expression von DMBT1 mit Invasion und der Bildung von Metastasen verbunden (Du et al. 2011). Besonders die Bildung von Metastasen ist im Pankreaskarzinom ein großes Problem und könnte unter anderem auf Faktoren wie DMBT1 zurückzuführen sein. In den hier untersuchten Proben zeigt DMBT1 eine niedrige Expression in Patienten, die eine kurze Überlebenszeit aufweisen, was eine mögliche Funktion von DMBT1 als Tumor-Suppressor weiter untermauert.

Ebenso wie DMBT1 sind die Gene MUC17 und MUC13 in Patienten mit kurzem Überleben niedrig exprimiert. Mucine weisen in vielen Tumoren epithelialen Ursprungs eine veränderte Expression auf und wirken an der Entstehung von Tumoren mit (Kufe 2009). Mucin-Gene kodieren für den strukturgebenden Bestandteil von Schleim, der der protektiven Auskleidung von Schleimhäuten der inneren Organe dient. Hierbei bewirken Mucine unter anderem Schutz

gegen enzymatischen Abbau und Säuren. Insbesondere MUC1 und MUC4 sind in Tumoren häufig hoch exprimiert und dienen oft als Tumormarker (Singh et al. 2007). MUC13 wurde in einer vor kurzem veröffentlichten Studie als möglicher Tumormarker für Tumoren aus Epithelzellen vorgeschlagen (Maher et al. 2011), was durch die Detektion als prognostisch relevantes Gen in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt wird.
Ebenfalls als prognostischer Marker wurde MUC17 identifiziert (Hirono et al. 2010). Hierbei wurde das Auftreten von Lymphknotenmetastasen im Pankreaskarzinom in Zusammenhang mit einer hohen Expression von MUC17 gefunden. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen war hierbei allerdings eine hohe Expression von MUC17 mit einer schlechten Prognose verbunden.

In den Expressionsdaten, die aus Platzgründen nicht in dieser Arbeit gezeigt werden konnten, befinden sich ebenfalls einige für das PDAC relevante Gene. Beispielsweise ist in Tumorproben das für das Protein p53 kodierende Gen TP53 um den Faktor 1,9 erhöht exprimiert. Beim Vergleich von Patienten mit kurzem und langem Überleben konnten für TP53 ebenfalls Expressions-Unterschiede festgestellt werden. Hierbei konnte in Patienten mit kurzem Überleben eine um den Faktor 1,5 erhöhte Expression von TP53 beobachtet werden.
Im Fall des im PDAC häufig mutiert vorliegenden Gens KRAS wurde in Tumorproben eine um den Faktor 1,7 erhöhte Expression detektiert, die jedoch im Hinblick auf eine prognostische Funktion keine Rolle zu spielen scheint. Da KRAS in vielen PDAC-Fälle durch eine Mutation dauerhaft aktiv ist, könnte eine leicht erhöhte Expression denn Effekt von KRAS noch unterstützen, bzw. auch in Fällen mit nicht-mutiertem KRAS eine verstärkte Induktion des MAPK-Signalweges bewirken.
Auch für das Gen CCND1, das für das Protein CyclinD1 kodiert, konnt in Tumor-Proben eine um den Faktor 2,2 erhöhte Expression festgestellt werden, wobei jedoch keine prognostische Relevanz der Gen-Expression detektiert werden konnte.

Andere, in Kapitel 1.5 für das PDAC beschriebene Gene, waren weder in den hier durchgeführten Analysen differentiell zwischen Tumor- und Normalgewebe-Proben exprimiert, noch mit einer prognostischen Funktion assoziiert. Hierzu zählen unter anderem BRCA2, MYC, CDKN2A und SMAD4. Schlüssel-Gene im Pankreaskarzinom zeichnen sich somit eher selten durch differentielle Expression aus, sondern sind, wie in der Literatur beschrieben, größtenteils durch Mutationen betroffen.

Eine Kaplan-Meier-Analyse der differentiell exprimierten Gene blieb ohne Ergebnis. Der Grund hierfür liegt vermutlich in der zu geringen Fallzahl (n = 15) für eine Kaplan-Meier-Analyse, so dass der vorgegebene Siginifikanz-Wert von 0,001 bei keinem Gen erreicht wurde.

4.6 Untersuchung von alternativem Transkript-Varianten

Da in eukaryotischen Zellen Gene nicht als ein kontinuierlich kodierendes Transkript exprimiert werden, sondern in den transkribierten Sequenzabschnitten zusätzlich nicht-kodierende Bereiche, die Introns, enthalten sind, erfolgt in den meisten Fällen eine Prozessierung der mRNA. Die prä-mRNA, die neben Exons auch Introns enthält, wird dabei durch das Spliceosom von den nicht-kodierenden Bereichen befreit. Das Spliceosom setzt sich aus je einer snRNA (small nuclear RNA) und einer Reihe von Proteinen zusammen. Durch das Spliceosom können Übergänge zwischen Exons und Introns erkannt werden, wobei Introns im 5‘-Bereich stets mit den Basen GU beginnen und im 3‘-Bereich mit AG enden. Durch verschiedene Faktoren kann bewirkt werden, dass nicht nur Introns, sondern gezielt auch einzelne Exons aus dem Transkript entfernt werden. Vergleichende Sequenzanalysen zeigen hierbei große Zahl an Sequenz-Motiven, die an der Steuerung dieses Vorganges beteiligt sind (Barash et al. 2010).

Alternatives Spleißen wurde lange Zeit eher als entwicklungsbiologisches Phänomen angesehen, gewinnt aber auch in der Tumorforschung immer mehr an Bedeutung (Tazi et al. 2009). Durch die Möglichkeit, mittels Microarray-Analysen oder Transkriptom-Sequenzierung alternative Transkript-Varianten zu identifizieren, entsteht derzeit ein neues onkologisches Forschungsgebiet. Aufgrund des geringen Alters dieser Disziplin sind einige Probleme, wie zum Beispiel die verlässliche Detektion von alternativen Transkript-Varianten aus Exon-Array Daten, noch nicht hinreichend gelöst, so dass in dieser Arbeit ein verbesserter Ansatz zur Detektion dieser Varianten verfolgt wurde. Hierfür wurde die Schnittmenge von zwei für die Detektion von alternativem Spleißen geeigneten Software-Paketen (oneChannelGUI und easyExon) als Grundlage für die Validierung dieser Varianten genommen. Die Überlappung beider Ergebnisse ergab, obwohl beide Programme einen ähnlichen Algorithmus verwenden, eine Schnittmenge von nur etwa 60%, was einen deutlichen Hinweis auf die Schwierigkeit der Analyse von Exon-Array-Daten liefert.

Insgesamt lieferte die durchgeführte Analyse neben wichtigen methodischen Verbesserungen eine Reihe von tumorrelevanten Genen, die als alternativ gespleißt bestätigt werden konnten. Generell konnte beobachtet werden, dass in vielen Fällen nicht eine einzige Transkript-Variante vorliegt, sondern zwei oder mehr Varianten, die sich hinsichtlich der Expressionsstärke unterscheiden (z.B. Abbildung 21, U2AF2). Eine große Anzahl der als differentiell gespleißt identifizierten Gene stammt aus onkologisch wichtigen Bereichen wie Apoptose, Zell-Adhäsion, Metastasierung oder Zell-Wachstum.

Im Bereich Apoptose konnten die Gene **CASP8** und **TNS4** als differentiell gespleißt zwischen Tumor- und Nicht-Tumor-Proben nachgewiesen werden. Im Fall von CASP8 betrifft der Unterschied in den Transkripten Exon 7, das in Tumor-Proben enthalten war, in Nicht-Tumor-Proben jedoch fehlte. Eine entsprechende Transkript-Variante (NM_001228) mit Exon 7 konnte vor kurzem aus verschiedenen Tumoren, darunter Brustkrebs (Odefrey et al. 2010) und Kopf-Hals-Karzinomen (Li, Lu, et al. 2010), isoliert werden. Exon 7 befindet sich in der sogenannten „death effector domain“, die eine Rolle in der Regulation des programmierten Zelltodes spielt. Veränderungen in diesem Bereich könnten Auswirkungen auf das Überleben einer Zelle und somit auf die Ausbreitung maligne veränderter Zellen haben. Für das Gen Tensin-4 (TNS4) konnte eine Transkript-Variante bestätigt werden, bei der Exon 4 ausschließlich in Tumor-Fällen enthalten war. Dieses auch an der Fokal-Adhäsion beteiligte Gen ist in den Zell-Tod involviert und wird von der Caspase-3, einem zentralen apoptotischen Effektor-Protein, gespalten (Lo et al. 2005).

Andere Gene, wie zum Beispiel **TP53BP1** und **MCM5**, sind in die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden oder in die Regulation des Zell-Zyklus involviert. Von TP53BP1 (Tumor protein p53 binding protein 1) ist bekannt, dass dieses Protein die transkriptionelle Aktivierung von TP53 verstärkt und für die Akkumulation von p53 nötig ist (Wang et al. 2002). Dies führt zum Stopp des Zellzyklus und ermöglicht es der Zelle, Reparaturen am Genom durchzuführen. Falls dies nicht möglich ist, führt p53 durch weitere Akkumulation zur Induktion der Apoptose. Die detektierte Veränderung im Transkript befinden sich im 3‘ Bereich von Exon 20 und ist sowohl in Tumor- als auch in Nicht-Tumor-Proben zu finden, wobei in Tumor-Proben eine größere Menge der verkürzten Transkript-Variante zu beobachten ist. Die beobachtete Veränderung befindet sich außerhalb einer funktionellen Domäne, könnte jedoch aufgrund anderer Faktoren (z.B. Proteinfaltung) eine Rolle bei der Funktionsfähigkeit des Proteins spielen.

Eine weitere erfolgreich validierte Transkript-Variante ist ein Transkript des MCM5-Gens, das in Tumor-Proben (neben anderen, in beiden Gruppen identischen Transkript-Varianten) in einer Variante ohne Exon 10 vorkommt. Das betreffende Exon befindet sich in der MCM-Domäne, die für die Initiierung der chromosomaler DNA-Replikation notwendig ist. Vor kurzem wurde gezeigt, dass MCM5 vom Übergang der G0- in die G1/2-Phase des Zell-Zyklus hochreguliert vorliegt, und außerdem für Stat1-vermittelte transkriptionelle Aktivierung essentiell ist (Snyder et al. 2005). Eine Dysregulation von MCM Proteinen wurde außerdem als ein frühes Ereignis in der epithelialen Karzinogenese beschrieben (Freeman et al. 1999).

Weitere Gene, bei denen alternativ gespleißte Transkript-Varianten nachgewiesen wurden, können den Bereichen Proliferation und Metastasierung zugeordnet werden. Hierzu zählen Transkript-Varianten der Gene ADAM19, RHOC, BCAR1, PIP4K2A und PTPRT. Da sich das Pankreaskarzinom gerade durch eine aggressive Ausbreitung der Tumorzellen auszeichnet, sind alternative Transkript-Varianten aus diesem Bereich von besonderer Bedeutung.

Das in dieser Arbeit als alternativ gespleißt nachgewiesene Transkript des Gens **ADAM19** gehört zur Familie der ADAM-Gene („A disintegrin and metalloproteinase“). Diese sind nahe verwandt mit den Matrixmetalloproteasen (MMPs), die im Pankreaskarzinom häufig überexprimiert sind (Matsuyama et al. 2002) und bei der Bildung von Metastasen eine wichtige Rolle spielen (Kessenbrock et al. 2010).

In Untersuchungen zu Tumoren von Hirn und Niere wurde die Expression und Aktivität von ADAM19 bereits in Verbindung mit Tumor-Invasivität gebracht (Wildeboer et al. 2006). Der in dieser Arbeit nachgewiesenen Transkript-Variante von ADAM19 fehlt Exon 22 sowie ein 5‘ gelegener Teil von Exon 23 in Tumorproben. Da sich der betroffene Bereich innerhalb der PAT1-Domäne befindet, die für die korrekte Chromosomenzuordnung während der Zellteilung nötig ist, könnten Veränderungen der Domäne zu chromosomaler Instabilität beitragen. Die Einzige bisher beschriebene alternative Transkript-Variante von ADAM19 („Meltrin beta mini“), bei der Metalloproteinase- und Disintegrin-Domäne fehlen, wurde im Zusammenhang mit dem Wachstum von Nervenzellen während der Embryogenese beschrieben (Kurisaki et al. 2002).

Da andere Vertreter der ADAM-Genfamilie, wie etwa ADAM9, bereits als prognostische Faktoren im PDAC identifiziert wurden (Grützmann et al. 2004), sollte die Rolle des hier nachgewiesenen ADAM19-Transkriptes im Pankreaskarzinom weiter untersucht werden.

Eine alternative Transkript-Variante des Gens **RHOC** konnte ebenfalls in Proben des Pankreaskarzinoms nachgewiesen werden. Dieses Gen kodiert für ein Protein, das an der Signaltransduktion im Bereich der Fokal-Adhäsion beteiligt ist. Von anderen Genen der RHO-Genfamilie ist bekannt, dass sie Zell-Motilität und maligne Transformation von Tumorzellen regulieren. Sie wechseln dabei zwischen GDP- und GTP-gebundenen Zustand und fungieren so als „molecular switches“ in Signaltransduktions-Kaskaden (Jaffe und Hall 2005). Studien belegen eine Rolle von RHOC bei der Induktion von Migration und Invasion von PDAC-Zellen (Dietrich et al. 2009), was auf eine mögliche Rolle der hier identifizierten Transkript-Variante bei der Bildung von Metastasen hindeutet. Die in mehreren PDAC-Proben gefundene alternative Transkript-Variante von RHOC zeichnet sich durch das Fehlen eines Exons im 5‘ Bereich des Transkriptes aus.

Das Gen **BCAR1** kann ebenfalls dem Bereich Zelladhäsion bzw. Zellwachstum zugeordnet werden. BCAR1 gehört zur Familie der CAS-Gene („Crk-associated substrate“), die an wichtigen zellulären Mechanismen wie Apoptose, Migration oder Zellzyklus beteiligt sind und bei Überexpression mit einer schlechten Prognose einhergehen (Tikhmyanova et al. 2010). In allen untersuchten Proben war neben dem kompletten Transkript eine Variante ohne Exon 12 zu sehen. Diese war in Tumorproben aber stärker exprimiert als in Proben von Normalgewebe des Pankreas. Denkbar wäre, dass die verkürzte Variante zu einem Protein führt, dass funktionell stärker aktiv ist und so zur Onkogenese beiträgt.
Eine weitere alternative Transkript-Variante wurde für das Gen **PIP4K2A** gefunden. Hierbei konnte das Fehlen von Exon 4 in Tumor-Proben nachgewiesen werden. Eine entsprechende Variante des PIP4K2A-Gens wurde bisher noch nicht beschrieben. Dieses Gen kodiert für ein Protein, dass nach Angaben der NCBI-Datenbank an Vorgängen bei der Zell-Proliferation, Differenzierung und Motilität beteiligt ist.

Mit dem Gen **PTPRT** konnte ein Gen als alternativ gespleißt detektiert werden, das aus der gleichen Familie wie das bereits in Kapitel 4.4 im Zusammenhang mit einem prognostischen SNP und einer LOH-Region beschriebene Gen PTPRD kommt. Wie PTPRD wurde auch dieses Gen als potentieller Tumor-Suppressor beschrieben und konnte bereits in Brustkrebs als häufig inaktiviert oder mutiert nachgewiesen werden (Lee et al. 2007). Gene aus der PTP-Familie („protein tyrosine phosphatase“) dienen als Signalmoleküle, die eine Vielzahl von zellulären Prozessen regulieren, darunter auch Zell-Wachstum, Differenzierung, Mitose und

onkogene Transformation. Die nachgewiesene Transkript-Variante, bei der Exon 22 fehlt, konnte überwiegend in Nicht-Tumor-Proben gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass es neben der Funktion von PTPRT eine eigenständige Funktion von Δ22-PTPRT in Nicht-Tumor-Zellen geben könnte, die in den PDAC-Tumoren verloren geht.

Mit dem oben bereits erwähnten Gen **LEF1** wurde eines der wenigen Gene untersucht, von denen bekannt war, dass im Pankreaskarzinom eine alternative Transkript-Variante existiert. Jesse und Kollegen identifizierten in PDAC-Zell-Linien eine Variante, bei der Exon 6 durch alternatives Spleißen entfernt ist (Jesse et al. 2010). Neben dieser Variante konnten in der vorliegenden Arbeit zwei weitere Varianten bestätigt werden, die sich von dem normal exprimierten („full-length“, FL) Transkript unterschieden. Im Pankreaskarzinom wurden neben der FL-Variante die beschriebene Transkript-Variante ohne Exon 6 gefunden. Bei Proben gesunder Pankreas konnte jedoch beobachtet werden, dass die FL-Variante nicht vorhanden war, dafür jedoch zwei kleinere Varianten, bei denen Exon 6, Exon 7 und ein 5‘ gelegener Teil von Exon 8, bzw. Exon 6 und Exon 8 fehlten. LEF1 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor im Wnt-Signalweg und spielt so eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren. Eine Überexpression von LEF1 wurde vor kurzem als prognostischer Marker im Kolorektal-Karzinom beschrieben, wobei hier eine Überexpression mit dem Auftreten von Leber-Metastasen in Verbindung stand (Lin et al. 2011). Möglicherweise könnte der in Kapitel 4.2 beschriebene Verlust einer genomischen Region in Zusammenhang mit alternativen Transkript-Varianten von LEF1 stehen, wobei der Verlust allerdings nicht in den durch alternatives Spleißen betroffenen Exons lokalisiert ist.

Eine ausgeglichene Verteilung zweier **GSTK1**-Transkript-Varianten wurde in Nicht-Tumor-Proben gefunden, während in Tumor-Proben von Patienten mit kurzem Überleben bevorzugt das längere Transkript exprimiert wurde. In Patienten mit langem Überleben war zudem eine stärkere Expression des verkürzten Transkriptes, bei dem ein interner Teil von Exon 3 durch differentielles Spleißen entfernt war, zu sehen. Gene der GST-Familie übernehmen zelluläre Entgiftungsfunktionen (Hayes und Pulford 1995) für xenobiotische und karzinogene Stoffe, sowie Reaktiven Sauerstoffspezies. Aufgrund dieser entgiftenden Funktion könnten differentiell gespleißte Varianten von GSTK1 in Zusammenhang mit Tabakkonsum stehen, der den größten Risikofaktor für das Auftreten des Pankreaskarzinoms darstellt (American Cancer Society 2011). Aufgrund des Fehlens von Daten zum Tabakkonsum der einzelnen

Patienten kann aber kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Intensität des Tabakkonsums und den gefundenen Spleiß-Varianten hergestellt werden.

Eine erfolgreiche Validierung der durch easyExon und oneChannelGUI detektierten alternativen Transkript-Varianten war bei 12 von 29 untersuchten Genen möglich. Die Rate der erfolgreich validierten Gene beläuft sich somit auf 41%, was verglichen mit bisherigen Untersuchungen eine Verbesserung darstellt. Dieses positive Ergebnis bestätigt die Strategie der Verwendung mehrerer Analyse-Programme zur Detektion von alternativen Spleiß-Varianten. Trotz der methodischen Verbesserung bleibt bei der Analyse von alternativen Transkript-Varianten noch viel Raum für Verbesserungen, die hauptsächlich durch Entwicklung verbesserter Algorithmen erfolgen sollte. Unter Umständen könnte sich eine Vor-Filterung (SNP-Regionen, Cross-Hybridisierung, etc.) der verwendeten Probesets als sinnvoll für die Verbesserung der Detektion von alternativem Spleißen erweisen.

Eine abschließende Analyse der 1451 als alternativ gespleißt detektierten Transkripte hinsichtlich der Verteilung über die verschiedenen GeneOntology-Klassen wurde mit der GoMiner-Software durchgeführt. Hierbei konnte eine deutliche Anreicherung in Signalwegen beobachtet werden, die im Pankreaskarzinom von großer Bedeutung sind. Hierzu gehören neben den für Metastasierung wichtigen Kategorien (z. B. „cell-cell adhesion“, „cell-matrix adhesion“, „focal adhesion“, focal adhesion formation”) auch Signalwege im Bereich Apoptose (z. B. “I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade”, “anti-apoptosis”, “activation of JNK activity”), Kinasen (z. B. „regulation of MAPK acticity“) und Neubildung von Blutgefäßen (z. B. “angiogenesis”). Adhäsion spielt bei der Onkogenese eine wichtige Rolle. So wurde etwa gezeigt, dass es bei der Entstehung von Tumoren zu einer De-Regulation bei einer Vielzahl von Zell-Zell-Kontakt-Proteinen führt, die in einer Veränderung des epithelialen Phänotyps zu einer eher mesenchymalen Struktur resultiert (Baum et al. 2008, Peinado et al. 2007). Dies ist auch im Pankreaskarzinom zu beobachten und untermauert die Validität der hier angewandten Analysemethode zur Detektion von alternativem Spleißen. Auch in anderen detektierten Signalwegen, wie zum Beispiel im Bereich Kinasen, wurden bereits Veränderungen beschrieben, darunter auch alternative Transkript-Varianten einzelner Gene (Zhou et al. 2010).

Da bisher kein globales Screening zu alternativem Spleißen an Primärtumoren des Pankreaskarzinoms durchgeführt wurde, konnten hier erste umfassende Daten zu alternativen Transkript-Varianten im PDAC generiert werden.

4.7 Prognostische miRNAs

Neben der Identifikation von prognostischen SNPs und LOHs wurde in dieser Arbeit die Expression von miRNAs im Hinblick auf die Prognose von Patienten mit Pankreaskarzinom untersucht. Diese kleinen regulatorischen Ribonukleinsäuren sind erst seit wenigen Jahren Gegenstand von onkologischen Untersuchungen, bieten jedoch aufgrund der großen regulatorischen Auswirkungen lohnende Ziele bei der Suche nach prognostischen Faktoren für das Pankreaskarzinom. Neuere Studien belegen die gute Eignung von miRNAs als Möglichkeit, Krankheiten anhand von Blut-Untersuchungen zu erkennen (Keller et al. 2011).

Derzeit sind etwa 1400 verschiedene miRNAs bekannt (Quelle: miRBase.org, Release 17), wobei jede einzelne miRNA eine Vielzahl von potentiellen Bindepartnern hat. Hierbei gibt es viele durch computergestützte Vorhersagen identifizierte Ziel-Gene, von denen allerdings die wenigsten experimentell validiert sind. In der Regel besitzt ein Transkript mehrere Bindestellen für miRNAs, welche sich in der Regel in der Sequenz des 3'URT befinden.

In dieser Arbeit wurde mittels Affymetrix miRNA Arrays die Expression von 847 verschiedenen humanen miRNAs bestimmt. Hierbei handelt es sich um die größte Analyse der miRNA-Expression, die bisher für das Pankreaskarzinom durchgeführt wurde. Viele der differentiell exprimierten miRNAs wurden zuvor bereits in der Literatur beschrieben. Hierzu zählen unter anderem miR-31 (Cottonham et al. 2010), miR-21, miR-155 (Park et al. 2011), miR-34b (Hermeking 2010), miR-217 (Zhao et al. 2010) und miR-520c (Liu und Wilson 2011).

Neben diesen bereits gut untersuchten miRNAs konnten weitere miRNAs als differentiell zwischen Tumor- und Normalgewebe-Proben des Pankreas identifiziert werden, die in vorhergehenden Untersuchungen noch nicht berücksichtigt wurden. Auf Grundlage des hier gefundenen Expressions-Musters von miRNAs wäre beispielsweise ein diagnostischer Test für das PDAC denkbar. Hierfür könnte der von der Pankreas gebildete Bauchspeichel, der

auch einen geringen Teil an duktalen Zellen enthält (Yoshida et al. 2003), mittels qRT-PCR auf die Expression von PDAC-spezifischen miRNAs hin untersucht werden.

Durch Untersuchung der 31 PDAC-Fällen in der „BRB Array Tools"-Software mittels einer Kaplan-Meier-Analyse wurden 49 miRNAs detektiert, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und Expressionsstärke aufweisen. Eine Übersicht über alle gefundenen miRNAs ist im Ergebnis-Teil in Tabelle 25 dargestellt. Im Folgenden wird auf einige ausgewählte miRNAs eingegangen, die in der Literatur entweder in Verbindung mit Tumoren und Prognose, und/oder dem Pankreaskarzinom beschrieben wurden. Hierzu zählen miR-22, miR-29b, miR-34a, miR-142-5p, miR-190, miR-193b, miR-296-3p und miR-433.

Die mikro-RNA **miR-22** befindet sich auf Chromosom 17p13.3 und wurde bereits in mehreren Studien in Zusammenhang mit Tumoren beschrieben. Hierbei gibt es mehrere Untersuchungen bei denen miR-22 im Zusammenhang mit onkogenen Veränderungen gefunden wurde, die im Pankreaskarzinom von großer Bedeutung sind:
In einer Studie zum Kolonkarzinom wurde miR-22 als post-transkriptioneller Regulator von p21 beschrieben (Tsuchiya et al.). Dieses Protein ist am Stopp des Zellzyklus beim Auftreten von DNA-Schäden beteiligt und wird durch Akkumulation von p53 induziert. In der hier durchgeführten Analyse war eine verstärkte Expression von miR-22 mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Ein Grund hierfür könnte der negative Einfluss auf die Synthese von p21 sein, wodurch der p53-induzierte Stopp des Zellzyklus inhibiert wird.
Neben der Interaktion mit p21 wurde für miR-22 eine Rolle bei der Induktion der zellulären Seneszenz beschrieben (Xu et al. 2011). Diese wirkt allerdings anti-onkogen, so dass die Auswirkungen einer erhöhten Expression von miR-22 eher zu einem längeren Überleben führen müssten. Möglicherweise haben miRNAs in verschiedenen Gewebetypen aber auch durch Zelltyp-spezifische Charakteristika unterschiedliche Auswirkungen.

In der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) wurde die hier identifizierte **miR-29b** bereits als erniedrigt exprimiert beschrieben (Zhu et al. 2010), eine andere Studie zur Akuten Myeloischen Leukämie (AML) schreibt dieser miRNA Tumorsuppressor-Funktion zu (Garzon et al. 2009). In der einzigen zum Pankreaskarzinom publizierten Studie wurde epigenetisches Gen-Silencing dieser miRNA in zwei Pankreaskarzinom-Zelllinien nachgewiesen (Lee et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte bei Patienten mit hoher

Expression ein längeres Überleben beobachtet werden, was die Rolle von miR-29b als Tumorsuppressor im PDAC untermauert.

Für die ebenfalls in Verbindung mit Tumoren stehende **miR-34a** wurde bereits eine direkte Beziehung zu p53 nachgewiesen: p53 bindet an den Promotor der miR-34a, was durch eine positive Rückkopplung zu einer erhöhten Aktivität von p53 führt (Yamakuchi und Lowenstein 2009). miR-34a interagiert mit p53 und liegt häufig, z. B. durch Methylierung, inaktiviert oder deletiert vor (Hermeking 2010). In einer anderen Studie (Tarasov et al. 2007) konnte nachgewiesen werden, dass miR-34a Apoptose und Zell-Zyklus-Arrest induziert. Dies spricht ebenfalls für eine Tumor-inhibierende Wirkung von miR-34a. Die vorliegenden PDAC-Daten zeigen ein schlechteres Überleben bei Patienten, bei denen miR-34a schwach exprimiert ist. Schwache Expression dieser miRNA führt in den betroffenen Zellen zu einer geringeren Reaktion auf DNA-Schäden und einer späteren Induktion der Apoptose.

In einer Studie zu prognostischen Faktoren bei Gemcitabin-behandelten PDAC-Patienten nach operativer Tumorentfernung konnte **miR-142-5p** (zusammen mit miR-204) als positiver prognostischer Marker identifiziert werden (Ohuchida et al. 2011). Hierbei war eine erhöhte Expression mit einem besseren Ansprechen auf die Behandlung mit Gemcitabin assoziiert. In der nicht mit Gemcitabin behandelten Patientengruppe konnte kein Effekt von miR-142-5p detektiert werden. Im Gegensatz zu dieser Studie war in den hier untersuchten PDAC-Proben eine hohe Expression von miR-142-5p jedoch mit einem schlechten Überleben assoziiert.

Eine erhöhte Expression von **miR-190** wurde bereits in einer kleinen Zahl an PDAC-Zell-Linien und Primärtumoren nachgewiesen (Zhang et al. 2009). Eine kürzlich erschienene Studie belegt einen Zusammenhang zwischen Arsen, das auch in Zigarettenrauch enthalten ist, und der Induktion der miR-190 Expression (Beezhold et al. 2011). Hierbei kommt es zu einer Verstärkten AKT-Aktivierung und Expression von VEGF, was zu verstärkter Proliferation und malignen Veränderungen führt. Die prognostisch negativen Auswirkungen einer hohen miR-190 Expression konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da nach den hier vorliegenden Daten Patienten, die eine hohe Expression von miR-190 aufwiesen, eine längere Überlebendauer zeigten.

Niedrige Expression von **miR-193b** (und von miR-193b*, die von derselben pre-miRNA stammt) wurde in der hier durchgeführten Kaplan-Meier-Analyse in Korrelation mit einer

längeren Überlebenszeit gefunden. Diese Mikro-RNA spielt auch in anderen Tumoren eine Rolle. Beispielsweise wurde vor kurzem gezeigt, dass miR-193b Proliferation, Migration und Invasion im Leberkarzinom reguliert (Xu et al. 2010) und im Prostatakarzinom als epigenetisch regulierter putativer Tumor-Suppressor fungiert (Rauhala et al. 2010). Bei einer Untersuchung an Melanomen wurde eine Proliferations-reprimierende Funktion von miR-193b, sowie die Interaktion mit CyclinD1 (nach eigenen Expressions-Daten in Tumorproben um den Faktor 2,2 erhöht) beschrieben (Chen, Feilotter, et al. 2010). In allen dieser Studien wurde eine niedrigere Expression von miR-193b in Tumor-Proben beschrieben, was auch durch die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigt wird. Hier konnte eine um den Faktor 2,1 niedrigere Expression von miR-193b in Tumor-Proben gemessen werden.
Im Gegensatz hierzu wurde innerhalb der PDAC-Proben ein längeres Überleben bei Patienten beobachtet, bei denen miR-193b nur schwach exprimiert war. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass miR-193b als Tumor-Suppressor fungiert und als Reaktion auf das Auftreten von malignen Veränderungen stärker exprimiert wird. Bei Patienten, bei denen dies ausbleibt, kann sich der Tumor schneller ausbreiten, was in einer kürzeren Überlebenszeit resultiert.

miR-433 wurde vor kurzem im einer Arbeit zum Magenkarzinom beschrieben, wo sie bei niedriger Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert war (Ueda et al. 2010). Den gegenteiligen Effekt, nämlich ein längeres Überleben von PDAC-Patienten mit hoher Expression von miR-433 konnte an den hier untersuchten Proben festgestellt werden. Ein Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten tumorspezifische Charakteristika sein, die zu einer unterschiedlichen Wirkung von miR-433 in beiden Tumor-Arten führen. Da im Moment keine Daten aus sequenzierten PDAC-Proben vorliegen, kann auch eine Mutation von miR-433, die zu einem veränderten Spektrum an Ziel-Genen führen würde, nicht ausgeschlossen werden.

Interessanterweise zeigen zwei der hier vorgestellten miRNAs, nämlich miR-22 und miR-34a, einen Zusammenhang mit dem im Pankreaskarzinom häufig mutiert vorliegendem p53. Loss-of-function-Mutationen von p53 (d.h. Nicht-Induktion der Apoptose und fehlender Zell-Zyklus-Arrest) und die negativen Auswirkungen von miR-22 auf p21 und somit den Zell-Zyklus-Arrest ergänzen sich und bewirken den Verlust der zellulären Kontrolle von DNA-Schäden und Apoptose. Eine niedrige Expression von miR-34a führt zu geringerer Aktivität von p53, was den Effekt verstärkt und das schlechte Überleben erklären könnte. Insgesamt gesehen wäre eine Kombination aus Expression von miR-22, miR-34a und dem p53-

Mutationsstatus als verbesserter klinischer Marker für das Überleben von PDAC-Patienten denkbar.

Zur Identifikation eines Spektrums von Ziel-Genen aller hier detektierten prognostischen miRNAs is die Kenntnis aller Ziel-Gene essentiell. Da bisher nur ein relativ geringer Teil dieser Gene experimentell validiert wurde, und sich die vorhergesagten Gene je nach verwendeter Datenbank teils beträchtlich unterscheiden, ist in diesem Gebiet noch viel Forschungsarbeit nötig. Nichtsdestotrotz ist die Expression von miRNAs ein vielversprechender Ansatzpunkt beim Verstehen und Therapieren von komplexen malignen Erkrankungen wie dem Pankreaskarzinom.

4.8 Fazit

Durch den Einsatz von Affymetrix Microarrays konnten in dieser Arbeit viele bisher unbekannte tumorrelevante und prognostische Faktoren für das Pankreaskarzinom identifiziert werden. Da es sich beim PDAC allerdings um eine sehr komplexe Tumor-Form handelt, sind weitere Untersuchungen nötig, um die Auswirkung der hier gefundenen Ergebnisse zu bestimmen.

Die hier identifizierten prognostischen LOH-Regionen sollten zur besseren Abschätzbarkeit ihrer Relevanz für das PDAC durch Sequenzierung genauer charakterisiert werden.

In der Detektion von alternativ gespleißten Transkript-Varianten konnte gegenüber dem bisherigen Ansatz eine Verbesserung der Detektion von real existierenden Varianten erreicht werden. Nichtsdestotrotz ist die bisherige Vorhersagegenauigkeit ungeeignet, um z. B. eine valide Grundlage für neue Therapieansätze zu bilden. Hierfür sollte durch Einsatz von Transkriptom-Sequenzierung ein Set an validierten Transkript-Varianten erstellt werden, anhand derer zukünftige Spleiß-Analysen optimiert werden könnten. Da bisher nur wenig zur Bedeutung von alternativen Transkript-Varianten im Pankreaskarzinom bekannt ist, könnten in diesem Bereich wichtige neue Tumor-Mechanismen aufgedeckt werden.

Die hier detektierten prognostischen miRNAs bilden wahrscheinlich den interessantesten Teil der Arbeit, da durch miRNAs eine große Anzahl von Genen reguliert wird. Durch Kaplan-Meier-Analysen wurden 49 prognostisch relevante miRNAs detektiert, die als Ansatzpunkt für zukünftige Therapien genutzt werden könnten. Hierfür ist allerdings noch ein besseres Verständnis, wann welches Ziel-Gen reguliert wird, nötig.

Insgesamt gesehen konnte durch die hier durchgeführten Analysen ein wichtiger Beitrag zum Verständnis von malignen Transformationen im PDAC und eine Grundlage für weiterreichende Untersuchungen und mögliche Therapie-Ansätze geleistet werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Microarray-Analysen 70 Proben des duktalen Adenokarzinoms des Pankreas untersucht. Beim diesem handelt es sich um eine sehr aggressive und bisher schwer behandelbare Tumor-Art, die in genomischer Hinsicht komplex ist. Mittels Array-Analysen an Primärtumor-Material wurden genomische Faktoren wie Kopienzahl, SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), und LOHs (Loss of Heterozygozity), sowie Expression von Genen bzw. miRNAs, und alternativ gespleißte Transkript-Varianten untersucht.

Es wurde eine große Zahl von bekannten und bisher unentdeckten Veränderungen im Pankreaskarzinom identifiziert. Während im Bereich der Kopienzahl-Aberrationen nur relativ wenige Veränderungen detektiert wurden, konnten durch bioinformatische Analysen eine große Zahl von prognostisch relevanten SNPs und LOH-Regionen identifiziert werden. Hierbei sind vor allem die Gene SLC16A7, LEF1, SEMA3E und SETBP1 hervorzugeben, bei denen Veränderungen in Zusammenhang mit dem Überleben von PDAC-Patienten stehen.

Neben diesen genomischen Veränderungen wurde die Expression von Genen und miRNAs untersucht und eine Reihe von bisher bekannten und unentdeckten prognostischen Faktoren identifiziert, die in Patienten mit PDAC eine Rolle spielen. Zu den wichtigsten in dieser Arbeit gefundenen prognostischen miRNAs zählen miR-22, miR-34a und miR-193b.

Durch eine im Pankreaskarzinom erstmalig durchgeführte genomweite Untersuchung von Spleiß-Varianten konnte zum einen eine Reihe von differentiell gespleißten Transkripten identifiziert, sowie wichtige methodische Verbesserungen zur erfolgreichen Detektion von Spleiß-Varianten geleistet werden. Dabei konnten tumorrelevante Gene wie LEF1 und CASP8 als differentiell gespleißt nachgewiesen, sowie eine Anreicherung von vorhergesagten alternativen Transkript-Varianten in tumorrelevanten GeneOntology-Kategorien, wie Zell-Adhäsion oder Kinase-Aktivität, beobachtet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bilden eine breite Datenbasis für weitere molekularbiologische Untersuchungen des Pankreaskarzinoms, beispielweise für Genom- oder Transkriptom-Sequenzierung. In dieser Arbeit identifizierte prognostische miRNAs könnten unter anderem für die Entwicklung neuer Therapieansätze verwendet werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbas T, Dutta A (2009) p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. Nat Rev Cancer 9:400-414
2. American Cancer Society (2011) Cancer Facts and Figures 2011, http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveilance/documents/document/acspc-029771.pdf, Abgerufen am 7. 9. 2011.
3. Arason A, Jonasdottir A, Barkardottir RB, Bergthorsson JT, Teare MD, Easton DF, Egilsson V (1998) A population study of mutations and LOH at breast cancer gene loci in tumours from sister pairs: two recurrent mutations seem to account for all BRCA1/BRCA2 linked breast cancer in Iceland. J Med Genet 35:446-449
4. Barash Y, Calarco JA, Gao W, Pan Q, Wang X, Shai O, Blencowe BJ, Frey BJ (2010) Deciphering the splicing code. Nature 465:53-59
5. Baum B, Settleman J, Quinlan MP (2008) Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. Semin Cell Dev Biol 19:294-308
6. Beezhold K, Liu J, Kan H, Meighan T, Castranova V, Shi X, Chen F (2011) miR-190-Mediated Downregulation of PHLPP Contributes to Arsenic-Induced Akt Activation and Carcinogenesis. Toxicol Sci 123:411-420
7. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. Nat Genet 40:499-507
8. Bianchi F, Tagliabue E, Ménard S, Campiglio M (2007) Fhit Expression Protects Against HER2-Driven Breast tumor Development: Unraveling the Molecular Interconnections. Cell Cycle 6:643-646
9. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu C-G, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM (2007) MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. J Am Md Associ 297:1901-1908
10. Boeck S, Stieber P, Holdenrieder S, Wilkowski R, Heinemann V (2006) Prognostic and therapeutic significance of carbohydrate antigen 19-9 as tumor marker in patients with pancreatic cancer. Oncology 70:255-264
11. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. Bioinformatics 19:185-193

12. Brekhman V, Lugassie J, Zaffryar-Eilot S, Sabo E, Kessler O, Smith V, Golding H, Neufeld G (2011) Receptor activity modifying protein-3 mediates the protumorigenic activity of lysyl oxidase-like protein-2. FASEB J 25:55-65
13. Bruns C, Diebold J, Heinemann V, Wilkowski R, Wagner A, Schmid R (2006) Karzinome des exokrinen Pankreas und der periampullären Region. Manual Gastrointestinale Tumoren. 7. Aufl. Zuckschwerdt Verlag München, S. 77-99
14. Buchholz M, Gress TM (2009) Molecular changes in pancreatic cancer. Expert Rev Anticancer Ther 9:1487-1497
15. Carney ME, Basiliere MS, Mates K, Sing CK (2010) Detection of BRCA1 and BRCA2 mutations in a selected Hawaii population. Hawaii Med J 69:268-271
16. Carrigan PE, Bingham JL, Srinvasan S, Brentnall TA, Miller LJ (2011) Characterization of alternative spliceoforms and the RNA splicing machinery in pancreatic cancer. Pancreas 40:281-288
17. Chang T-Y, Li Y-Y, Jen C-H, Yang T-P, Lin C-H, Hsu M-T, Wang H-W (2008) easyExon--a Java-based GUI tool for processing and visualization of Affymetrix exon array data. BMC Bioinformatics 9:432-440
18. Chen J, Feilotter HE, Paré GC, Zhang X, Pemberton JGW, Garady C, Lai D, Yang X, Tron VA (2010) MicroRNA-193b represses cell proliferation and regulates cyclin D1 in melanoma. Am J Pathol 176:2520-2529
19. Chen Y, Song Y, Wang Z, Yue Z, Xu H, Xing C, Liu Z (2010) Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. J Gastrointest Surg 14:1170-1179
20. Cottonham CL, Kaneko S, Xu L (2010) miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells. J Biol Chem 285:35293-35302
21. Cress RD, Yin D, Clarke L, Bold R, Holly EA (2006) Survival among patients with adenocarcinoma of the pancreas: a population-based study (United States). Cancer Causes Control 17:403-409
22. Cristóbal I, Blanco FJ, Garcia-Orti L, Marcotegui N, Vicente C, Rifon J, Novo FJ, Bandres E, Calasanz MJ, Bernabeu C, Odero MD (2010) SETBP1 overexpression is a novel leukemogenic mechanism that predicts adverse outcome in elderly patients with acute myeloid leukemia. Blood 115:615-625
23. David CJ, Manley JL (2010) Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. Genes Dev 24:2343-2364

24. Derheimer FA, Kastan MB (2010) Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. FEBS Lett 584:3675-3681
25. Dietrich K-A, Schwarz R, Liska M, Grass S, Menke A, Meister M, Kierschke G, Längle C, Genze F, Giehl K (2009) Specific induction of migration and invasion of pancreatic carcinoma cells by RhoC, which differs from RhoA in its localisation and activity. Biol Chem 390:1063-1077
26. Du J, Guan M, Fan J, Jiang H (2011) Loss of DMBT1 expression in human prostate cancer and its correlation with clinical progressive features. Urology 77:509.e9-13
27. Dutertre M, Vagner S, Auboeuf D (2010) Alternative splicing and breast cancer. RNA Biol 7:403-411
28. Espina V, Wulfkuhle JD, Calvert VS, VanMeter A, Zhou W, Coukos G, Geho DH, Petricoin EF, Liotta LA (2006) Laser-capture microdissection. Nat Protocols 1:586-603
29. Feldmann G, Beaty R, Hruban RH, Maitra A (2007) Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. J Hepatobiliary Pancreat Surg 14:224-232
30. Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, Coleman N (1999) Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. Clin Cancer Res 5:2121-2132
31. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG (2004) Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. Endocrinology 145:5439-5447
32. Garzon R, Heaphy CEA, Havelange V, Fabbri M, Volinia S, Tsao T, Zanesi N, Kornblau SM, Marcucci G, Calin GA, Andreeff M, Croce CM (2009) MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. Blood 114:5331-5341
33. Gearhart J, Pashos EE, Prasad MK (2007) Pluripotency redux--advances in stem-cell research. N Engl J Med 357:1469-1472
34. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP (2008) Biology and management of pancreatic cancer. Postgrad Med J 84:478-497
35. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. FEBS Journal 278:16-27
36. Giefing M, Zemke N, Brauze D, Kostrzewska-Poczekaj M, Luczak M, Szaumkessel M, Pelinska K, Kiwerska K, Tönnies H, Grenman R, Figlerowicz M, Siebert R, Szyfter K, Jarmuz M (2011) High resolution ArrayCGH and expression profiling identifies PTPRD and PCDH17/PCH68 as tumor suppressor gene candidates in laryngeal squamous cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 50:154-166

37. Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, RayChaudhury A, Newton HB, Chiocca EA, Lawler S (2008) Targeting of the Bmi-1 Oncogene/Stem Cell Renewal Factor by MicroRNA-128 Inhibits Glioma Proliferation and Self-Renewal. Cancer Res 68:9125-9130
38. de la Grange P, Dutertre M, Correa M, Auboeuf D (2007) A new advance in alternative splicing databases: from catalogue to detailed analysis of regulation of expression and function of human alternative splicing variants. BMC Bioinformatics http://www.biomedcentral.com/1471-2105/8/180, Abgerufen am 18. 10. 2010
39. Gress TM, Müller-Pillasch F, Geng M, Zimmerhackl F, Zehetner G, Friess H, Büchler M, Adler G, Lehrach H (1996) A pancreatic cancer-specific expression profile. Oncogene 13:1819-1830
40. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2007) miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Research 36:154-158
41. Grützmann R, Lüttges J, Sipos B, Ammerpohl O, Dobrowolski F, Alldinger I, Kersting S, Ockert D, Koch R, Kalthoff H, Schackert HK, Saeger HD, Klöppel G, Pilarsky C (2004) ADAM9 expression in pancreatic cancer is associated with tumour type and is a prognostic factor in ductal adenocarcinoma. Br J Cancer 90:1053-1058
42. Gutiérrez ML, Muñoz-Bellvis L, Abad M del M, Bengoechea O, González-González M, Orfao A, Sayagués JM (2011) Association between Genetic Subgroups of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Defined by High Density 500 K SNP-Arrays and Tumor Histopathology. PLoS ONE http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0022315, Abgerufen am 20. 7. 2011
43. Hao J, Zhang S, Zhou Y, Liu C, Hu X, Shao C (2011) MicroRNA 421 suppresses DPC4/Smad4 in pancreatic cancer. Biochem Biophys Res Commun 406:552-557
44. Harada T, Baril P, Gangeswaran R, Kelly G, Chelala C, Bhakta V, Caulee K, Mahon PC, Lemoine NR (2007) Identification of genetic alterations in pancreatic cancer by the combined use of tissue microdissection and array-based comparative genomic hybridisation. Br J Cancer 96:373-382
45. 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 27:1951-1960

46. Harada T, Chelala C, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine NR (2009) Genome-wide analysis of pancreatic cancer using microarray-based techniques. Pancreatology 9:13-24
47. Hayes JD, Pulford DJ (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev Biochem Mol Biol 30:445-600
48. Henry C, Deschamps M, Rohrlich P-S, Pallandre J-R, Rémy-Martin J-P, Callanan M, Traverse-Glehen A, GrandClément C, Garnache-Ottou F, Gressin R, Deconinck E, Salles G, Robinet E, Tiberghien P, Borg C, Ferrand C (2010) Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance. Blood 115:2420-2429
49. Hermann PC, Bhaskar S, Cioffi M, Heeschen C (2010) Cancer stem cells in solid tumors. Semin Cancer Biol 20:77-84
50. Hermeking H (2010) The miR-34 family in cancer and apoptosis. Cell Death Differ 17:193-199
51. Hill R, Calvopina JH, Kim C, Wang Y, Dawson DW, Donahue TR, Dry S, Wu H (2010) PTEN Loss Accelerates KrasG12D-Induced Pancreatic Cancer Development. Cancer Res 70:7114-7124
52. Hirono S, Yamaue H, Hoshikawa Y, Ina S, Tani M, Kawai M, Ushijima M, Matsuura M, Saiki Y, Saiura A, Yamamoto J, Miki Y, Noda T (2010) Molecular markers associated with lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma by genome-wide expression profiling. Cancer Sci 101:259-266
53. Holzmann K, Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Kestler HA, Schwoerer A, Rau B, Radlwimmer B, Döhner H, Lichter P, Gress T, Bentz M (2004) Genomic DNA-chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes. Cancer Res 64:4428-4433
54. Hussmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U (2010) Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. http://www.rki.de/cln_234/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/krebs__node.html?__nnn=true, Abgerufen am 8. 10. 2010.

55. Hwang J-H, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM, Leon LG, Kim Y-T, Funel N, Park JK, Kim MA, Kang GH, Kim S-W, Del Chiaro M, Peters GJ, Giaccone G (2010) Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. PLoS ONE http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871055/pdf/pone.0010630.pdf, Abgerufen am 10. 8. 2011
56. Jaffe AB, Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. Annu Rev Cell Dev Biol 21:247-269
57. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008) Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 58:71-96
58. Jesse S, Koenig A, Ellenrieder V, Menke A (2010) Lef-1 isoforms regulate different target genes and reduce cellular adhesion. Int J Cancer 126:1109-1120
59. Joergensen MT, Heegaard NHH, Schaffalitzky de Muckadell OB (2010) Comparison of plasma Tu-M2-PK and CA19-9 in pancreatic cancer. Pancreas 39:243-247
60. Keller A, Leidinger P, Bauer A, Elsharawy A, Haas J, Backes C, Wendschlag A, Giese N, Tjaden C, Ott K, Werner J, Hackert T, Ruprecht K, Huwer H, Huebers J, Jacobs G, Rosenstiel P, Dommisch H, Schaefer A, Müller-Quernheim J, Wullich B, Keck B, Graf N, Reichrath J, Vogel B, Nebel A, Jager SU, Staehler P, Amarantos I, Boisguerin V, Staehler C, Beier M, Scheffler M, Büchler MW, Wischhusen J, Haeusler SFM, Dietl J, Hofmann S, Lenhof H-P, Schreiber S, Katus HA, Rottbauer W, Meder B, Hoheisel JD, Franke A, Meese E (2011) Toward the blood-borne miRNome of human diseases. Nat Methods 8:841-843
61. Kennedy KM, Dewhirst MW (2010) Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. Future Oncol 6:127-148
62. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler and D (2002) The Human Genome Browser at UCSC. Genome Res 12:996-1006
63. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell 141:52-67
64. Kim JK, Diehl JA (2009) Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. J Cell Physiol 220:292-296
65. Kim J, Oh W-J, Gaiano N, Yoshida Y, Gu C (2011) Semaphorin 3E-Plexin-D1 signaling regulates VEGF function in developmental angiogenesis via a feedback mechanism. Genes Dev 25:1399-1411

66. Kong X, Du Y, Wang G, Gao J, Gong Y, Li L, Zhang Z, Zhu J, Jing Q, Qin Y, Li Z (2011) Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: miR-196a could be a potential marker for poor prognosis. Dig Dis Sci 56:602-609
67. Kufe DW (2009) Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. Nat Rev Cancer 9:874-885
68. Kumar D (2008) Disorders of the genome architecture: a review. Genomic Med 2:69-76
69. Kurisaki T, Wakatsuki S, Sehara-Fujisawa A (2002) Meltrin beta mini, a new ADAM19 isoform lacking metalloprotease and disintegrin domains, induces morphological changes in neuronal cells. FEBS Lett 532:419-422
70. Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 358:15-16
71. Lee JW, Jeong EG, Lee SH, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2007) Mutational analysis of PTPRT phosphatase domains in common human cancers. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 115:47-51
72. Lee K-H, Lotterman C, Karikari C, Omura N, Feldmann G, Habbe N, Goggins MG, Mendell JT, Maitra A (2009) Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer. Pancreatology 9:293-301
73. Li C, Wong WH (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. Proc Natl Acad Sci USA 98:31-36
74. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res 67:1030-1037
75. Li Y, Liang Q, Wen Y-q, Chen L-l, Wang L-t, Liu Y-l, Luo C-q, Liang H-z, Li M-t, Li Z (2010) Comparative proteomics analysis of human osteosarcomas and benign tumor of bone. Cancer Genet Cytogenet 198:97-106
76. Li C, Lu J, Liu Z, Wang L-E, Zhao H, El-Naggar AK, Sturgis EM, Wei Q (2010) The six-nucleotide deletion/insertion variant in the CASP8 promoter region is inversely associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Prev Res (Phila) 3:246-253

77. Lin AY, Chua M-S, Choi Y-L, Yeh W, Kim YH, Azzi R, Adams GA, Sainani K, van de Rijn M, So SK, Pollack JR (2011) Comparative profiling of primary colorectal carcinomas and liver metastases identifies LEF1 as a prognostic biomarker. PLoS ONE http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3044708/pdf/pone.0016636.pdf, Abgerufen am 30. 8. 2011
78. Lin R-J, Lin Y-C, Yu AL (2010) miR-149* induces apoptosis by inhibiting Akt1 and E2F1 in human cancer cells. Mol Carcinog 49:719-727
79. Lin R-Y, Vera JC, Chaganti RSK, Golde DW (1998) Human Monocarboxylate Transporter 2 (MCT2) Is a High Affinity Pyruvate Transporter. J Biol Chem 273:28959-28965
80. Lin M, Wei L-J, Sellers WR, Lieberfarb M, Wong WH, Li C (2004) dChipSNP: significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. Bioinformatics 20:1233-1240
81. Liu P, Wilson MJ (2011) miR-520c and miR-373 target mTOR and SIRT1, activate the Ras/Raf/MEK/Erk pathway and NF-κB, with up-regulation of MMP9 in human fibrosarcoma cells. J Cell Physiol http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.22993/pdf, Abgerufen am 12. 10. 2011
82. Liu J, Gao J, Du Y, Li Z, Ren Y, Gu J, Wang X, Gong Y, Wang W, Kong X (2011) Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. Int J Cancer
83. Lo S-S, Lo SH, Lo SH (2005) Cleavage of cten by caspase-3 during apoptosis. Oncogene 24:4311-4314
84. Loukopoulos P, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Sakamoto M, Yamazaki K, Kosuge T, Kanai Y, Hosoda F, Imoto I, Ohki M, Inazawa J, Hirohashi S (2007) Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: identification of genetic indicators that predict patient outcome. Cancer Sci 98:392-400
85. Lu Z, Li Y, Takwi A, Li B, Zhang J, Conklin DJ, Young KH, Martin R, Li Y (2011) miR-301a as an NF-κB activator in pancreatic cancer cells. EMBO J 30:57-67
86. Lu Y, Zhang Z, Yu H, Zheng SL, Isaacs WB, Xu J, Sun J (2011) Functional annotation of risk loci identified through genome-wide association studies for prostate cancer. Prostate 71:955-963

87. De Luca A, Bottillo I, Dasdia MC, Morella A, Lanari V, Bernardini L, Divona L, Giustini S, Sinibaldi L, Novelli A, Torrente I, Schirinzi A, Dallapiccola B (2007) Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. J Med Genet 44:800-808
88. Lupski JR, Stankiewicz P (2005) Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. PLoS Genet http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1352149/pdf/pgen.0010049.pdf, Abgerufen am 5. 10. 2011
89. Maher DM, Gupta BK, Nagata S, Jaggi M, Chauhan SC (2011) Mucin 13: Structure, Function, and Potential Roles in Cancer Pathogenesis. Molecular Cancer Research 9:531-537
90. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH (2003) Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. Mod Pathol 16:902-912
91. Marlow R, Strickland P, Lee JS, Wu X, Pebenito M, Binnewies M, Le EK, Moran A, Macias H, Cardiff RD, Sukumar S, Hinck L (2008) SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium. Cancer Res 68:7819-7827
92. Matsuyama Y, Takao S, Aikou T (2002) Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. J Surg Oncol 80:105-110
93. Mayr C, Bartel DP (2009) Widespread shortening of 3′UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. Cell 138:673-684
94. Merolla F, Pentimalli F, Pacelli R, Vecchio G, Fusco A, Grieco M, Celetti A (2007) Involvement of H4(D10S170) protein in ATM-dependent response to DNA damage. Oncogene 26:6167-6175
95. Miele A, Dekker J (2008) Long-range chromosomal interactions and gene regulation. Mol Biosyst 4:1046-1057
96. Moore JK, Haber JE (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 16:2164-2173
97. Mössner J (2010) What's new in therapy of pancreatic cancer? Dig Dis 28:679-683
98. Müller A, Holzmann K, Kestler HA (2007) Visualization of genomic aberrations using Affymetrix SNP arrays. Bioinformatics 23:496-497

99. Nakao A, Fujii T, Sugimoto H, Kanazumi N, Nomoto S, Kodera Y, Inoue S, Takeda S (2006) Oncological problems in pancreatic cancer surgery. World J Gastroenterol 12:4466-4472
100. Nannya Y, Sanada M, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Bailey DK, Kennedy GC, Ogawa S (2005) A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. Cancer Res 65:6071-6079
101. Nishida N, Mimori K, Fabbri M, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M (2011) MicroRNA-125a-5p Is an Independent Prognostic Factor in Gastric Cancer and Inhibits the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells in Combination with Trastuzumab. Clin Cancer Res 17:2725-2733
102. Nishida N, Yokobori T, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Kuwano H, Mori M (2011) MicroRNA miR-125b is a prognostic marker in human colorectal cancer. Int J Oncol 38:1437-1443
103. Odefrey F, Stone J, Gurrin LC, Byrnes GB, Apicella C, Dite GS, Cawson JN, Giles GG, Treloar SA, English DR, Hopper JL, Southey MC (2010) Common genetic variants associated with breast cancer and mammographic density measures that predict disease. Cancer Res 70:1449-1458
104. Ohuchida K, Mizumoto K, Kayashima T, Fujita H, Moriyama T, Ohtsuka T, Ueda J, Nagai E, Hashizume M, Tanaka M (2011) MicroRNA Expression as a Predictive Marker for Gemcitabine Response after Surgical Resection of Pancreatic Cancer. Ann Surg Oncol 18:2381-2387
105. Omenn GS, Yocum AK, Menon R (2010) Alternative splice variants, a new class of protein cancer biomarker candidates: findings in pancreatic cancer and breast cancer with systems biology implications. Dis Markers 28:241-251
106. Ozaki T, Nakagawara A (2011) p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. J Biomed Biotechnol http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3004423/pdf/JBB2011-603925.pdf, Abgerufen am 10. 10. 2011
107. Park JY, Helm J, Coppola D, Kim D, Malafa M, Kim SJ (2011) MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. World J Gastroenterol 17:817-827
108. Pastwa E, Błasiak J (2003) Non-homologous DNA end joining. Acta Biochim Pol 50:891-908

109. Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? Nat Rev Cancer 7:415-428
110. Pradervand S, Weber J, Thomas J, Bueno M, Wirapati P, Lefort K, Dotto GP, Harshman K (2009) Impact of normalization on miRNA microarray expression profiling. RNA 15:493-501
111. Preis M, Gardner TB, Gordon SR, Pipas MJ, Mackenzie TA, Klein EE, Longnecker DS, Gutmann EJ, Sempere LF, Korc M (2011) microRNA-10b Expression Correlates with Response to Neoadjuvant Therapy and Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Clin Cancer Res 17:5812-5821
112. Rauhala HE, Jalava SE, Isotalo J, Bracken H, Lehmusvaara S, Tammela TLJ, Oja H, Visakorpi T (2010) miR-193b is an epigenetically regulated putative tumor suppressor in prostate cancer. Int J Cancer 127:1363-1372
113. Raychaudhuri S, Plenge RM, Rossin EJ, Ng ACY, Purcell SM, Sklar P, Scolnick EM, Xavier RJ, Altshuler D, Daly MJ (2009) Identifying relationships among genomic disease regions: predicting genes at pathogenic SNP associations and rare deletions. PLoS Genet http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2694358/pdf/pgen.1000534.pdf, Abgerufen am 22. 6. 2011
114. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS (1996) Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. Nat Genet 14:185-187
115. Ryan BM, Robles AI, Harris CC (2010) Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. Nat Rev Cancer 10:389-402
116. Ryan M, Zeeberg B, Caplen N, Cleland J, Kahn A, Liu H, Weinstein J (2008) SpliceCenter: A suite of web-based bioinformatic applications for evaluating the impact of alternative splicing on RT-PCR, RNAi, microarray, and peptide-based studies. BMC Bioinformatics http://www.biomedcentral.com/1471-2105/9/313, Abgerufen am 18. 10. 2010
117. Sanges R, Cordero F, Calogero RA (2007) oneChannelGUI: a graphical interface to Bioconductor tools, designed for life scientists who are not familiar with R language. Bioinformatics 23:3406-3408
118. SantaLucia J (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. Proc Natl Acad Sci U S A 95:1460-1465
119. Setoyama T, Zhang X, Natsugoe S, Calin GA (2011) MicroRNA-10b - a new marker or the marker of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma? Clin Cancer Res 17:5527-5529

120. Simon R, Lam A, Li M-C, Ngan M, Menenzes S, Zhao Y Analysis of Gene Expression Data Using BRB-Array Tools. Cancer Inform 3:11-17
121. Singh AP, Chaturvedi P, Batra SK (2007) Emerging roles of MUC4 in cancer: a novel target for diagnosis and therapy. Cancer Res 67:433-436
122. Smith LT, Lin M, Brena RM, Lang JC, Schuller DE, Otterson GA, Morrison CD, Smiraglia DJ, Plass C (2006) Epigenetic regulation of the tumor suppressor gene TCF21 on 6q23-q24 in lung and head and neck cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 103:982-987
123. Snyder M, He W, Zhang JJ (2005) The DNA replication factor MCM5 is essential for Stat1-mediated transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci USA 102:14539-14544
124. Splinter D, Tanenbaum ME, Lindqvist A, Jaarsma D, Flotho A, Yu KL, Grigoriev I, Engelsma D, Haasdijk ED, Keijzer N, Demmers J, Fornerod M, Melchior F, Hoogenraad CC, Medema RH, Akhmanova A (2010) Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. PLoS Biol http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2850381/pdf/pbio.1000350.pdf, Abgerufen am 16. 6. 2011
125. Steele CW, Oien KA, McKay CJ, Jamieson NB (2011) Clinical Potential of MicroRNAs in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Pancreas 40:1165-1171
126. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A 102:15545-15550
127. Takahashi S, Kato K, Nakamura K, Nakano R, Kubota K, Hamada H (2011) Neural cell adhesion molecule 2 as a target molecule for prostate and breast cancer gene therapy. Cancer Sci 102:808-814
128. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Meister G, Hermeking H (2007) Differential Regulation of microRNAs by p53 Revealed by Massively Parallel Sequencing: miR-34a is a p53 Target That Induces Apoptosis and G1-arrest. Cell Cycle 6:1586-1593
129. Tazi J, Bakkour N, Stamm S (2009) Alternative splicing and disease. Biochim Biophys Acta 1792:14-26
130. The 1000 Genomes Project Consortium (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature 467:1061-1073

131. Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J (2006) AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation. Genome Biol http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2850381/pdf/pbio.1000350.pdf, Abgerufen am 15. 8. 2011
132. Tikhmyanova N, Little JL, Golemis EA (2010) CAS proteins in normal and pathological cell growth control. Cell Mol Life Sci 67:1025-1048
133. Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata-Kawata H, Okamoto K, Fujiwara Y, Nakai M, Okabe A, Schetter AJ, Bowman ED, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H, Harris CC, Nakagama H Tumor-suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. Cancer Res 71:4628-4639
134. Turati F, Galeone C, Talamini R, Franceschi S, Manzari M, Gallino G, Polesel J, La Vecchia C, Tavani A (2011) Coffee, decaffeinated coffee, tea, and pancreatic cancer risk: a pooled-analysis of two Italian case-control studies. Eur J Cancer Prev 20:287-292
135. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu C-gong, Oue N, Yasui W, Yoshida K, Sasaki H, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin GA, Croce CM (2010) Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. Lancet Oncol 11:136-146
136. Venkataraman, Alimova I, Fan R, Harris P, Foreman N, Vibhakar R (2010) MicroRNA 128a Increases Intracellular ROS Level by Targeting Bmi-1 and Inhibits Medulloblastoma Cancer Cell Growth by Promoting Senescence. PLoS ONE http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0010748, Abgerufen am 22. 6. 2011
137. Venkatraman und Olshen (2004) DNAcopy: A Package for Analyzing DNA Copy Data.http://www.mskcc.org/mskcc/shared/graphics/epidemiology/AdamOlshen/DNAcopy.pdf, Abgerufen am 18. 10. 2010.
138. Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ (2002) 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. Science 298:1435-1438
139. Weiss FU, Marques IJ, Woltering JM, Vlecken DH, Aghdassi A, Partecke LI, Heidecke C-D, Lerch MM, Bagowski CP (2009) Retinoic acid receptor antagonists inhibit miR-10a expression and block metastatic behavior of pancreatic cancer. Gastroenterology 137:2136-2145

140. Wildeboer D, Naus S, Amy Sang Q-X, Bartsch JW, Pagenstecher A (2006) Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. J Neuropathol Exp Neurol 65:516-527
141. Xu Z, Taylor JA (2009) SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. Nucleic Acids Res 37:600-605
142. Xu C, Liu S, Fu H, Li S, Tie Y, Zhu J, Xing R, Jin Y, Sun Z, Zheng X (2010) MicroRNA-193b regulates proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma cells. Eur J Cancer 46:2828-2836
143. Xu D, Takeshita F, Hino Y, Fukunaga S, Kudo Y, Tamaki A, Matsunaga J, Takahashi R-u, Takata T, Shimamoto A, Ochiya T, Tahara H (2011) miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. J Cell Biol 193:409 -424
144. Yamakuchi M, Lowenstein CJ (2009) MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. Cell Cycle 8:712-715
145. Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koeffler HP, Ogawa S (2007) Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. Am J Hum Genet 81:114-126
146. Yoshida K, Ueno S, Iwao T, Yamasaki S, Tsuchida A, Ohmine K, Ohki R, Choi YL, Koinuma K, Wada T, Ota J, Yamashita Y, Chayama K, Sato K, Mano H (2003) Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma. Cancer Sci 94:263-270
147. Yu F, Zhu Y, Gong C, Jiao Y, Song E (2010) Mir-128 Regulates the Self-Renewal of Breast Tumor-Initiating Cells through HTERT. Cancer Research 69:5157-5157
148. Yustein JT, Dang CV (2007) Biology and treatment of Burkitt's lymphoma. Curr Opin Hematol 14:375-381
149. Zanesi N, Pekarsky Y, Croce CM (2005) A mouse model of the fragile gene FHIT: From carcinogenesis to gene therapy and cancer prevention. Mutat Res 591:103-109
150. Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, Sunshine M, Narasimhan S, Kane DW, Reinhold WC, Lababidi S, Bussey KJ, Riss J, Barrett JC, Weinstein JN (2003) GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. Genome Biol 4:R28

151. Zhang J, Han L, Ge Y, Zhou X, Zhang A, Zhang C, Zhong Y, You Y, Pu P, Kang C (2010) miR-221/222 promote malignant progression of glioma through activation of the Akt pathway. Int J Oncol 36:913-920
152. Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, Yao Q, Chen C (2009) Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. World J Surg 33:698-709
153. Zhao W-G, Yu S-N, Lu Z-H, Ma Y-H, Gu Y-M, Chen J (2010) The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS. Carcinogenesis 31:1726-1733
154. Zhou L, Tan X, Kamohara H, Wang W, Wang B, Liu J, Egami H, Baba H, Dai X (2010) MEK1 and MEK2 isoforms regulate distinct functions in pancreatic cancer cells. Oncol Rep 24:251-255
155. Zhu D-X, Miao K-R, Fang C, Fan L, Zhu W, Zhu H-Y, Zhuang Y, Hong M, Liu P, Xu W, Li J-Y (2010) Aberrant microRNA expression in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. Leuk Res 35:730-734

ANHANG

Tabelle 26: Durch bioinformatische Analysen gefundenen prognostischen SNPs (n = 81) mit Angabe von Position, Ausprägungsformen, Häufigkeit in der Bevölkerung (NT), dem PDAC, sowie identifizierter Gene und Transkriptionsfaktor-Bindestellen.

Affymetrix SNP ID	dbSNP RS ID	Chr	Position (hg19)	Cytobande	Allel A	Allel B	p(A) NT	p(B) NT	p(A) PDAC	p(B) PDAC	Gen	CNV	rSNP TF
SNP_A-2179242	rs10909872	1	2723552	p36.32	A	C	0.99	0.01	0.99	0.01		Ja	ESR1, Myc, MYC::MAX, NR2F1, USF1
SNP_A-1799171	rs6683116	1	46975773	p33	A	G	0.19	0.81	0.15	0.85	DMBX1		
SNP_A-1925224	rs11265211	1	159460574	q23.2	C	T	0.22	0.78	0.19	0.81			Gfi, NFYA
SNP_A-2040339	rs10919039	1	162245622	q23.3	A	G	0.89	0.11	0.87	0.13	NOS1AP		ELK4, GABPA
SNP_A-2174874	rs12022368	1	180934047	q25.3	A	G	0.25	0.75	0.27	0.73	AK056657		ESR1, ESR2, NR3A2, PBX1, PPARG
SNP_A-1982115	rs10494915	1	209241880	q32.2	A	G	0.78	0.22	0.81	0.19			IRF1
SNP_A-1991273	rs547441	1	245223967	q44	A	C	0.62	0.38	0.66	0.34	EFCAB2		ELK1, ELK4, FEV, GABPA
SNP_A-2077196	rs13411969	2	82921097	p12	C	T	0.85	0.15	0.89	0.11		Ja	Nkx3-2
SNP_A-2244914	rs10201184	2	103089078	q12.1	G	C	0.39	0.61	0.57	0.43	SLC9A4		
SNP_A-2101471	rs2190387	2	107630101	q12.3	A	G	0.11	0.89	0.17	0.83		Ja	
SNP_A-2006795	rs2971899	2	155689683	q24.1	C	T	0.22	0.78	0.18	0.82	KCNJ3		
SNP_A-2104040	rs1534692	2	181062797	q31.3	C	T	0.13	0.87	0.09	0.91			HNF4A, IRF1, IRF2, TBP
SNP_A-2084785	rs13012596	2	215418821	q35	A	C	0.72	0.28	0.69	0.31	VWC2L		
SNP_A-4208690	rs6705632	2	218294420	q35	A	G	0.00	1.00	0.01	0.99	DIRC3		BRCA1
SNP_A-2045747	rs10202619	2	221827380	q36.1	A	T	0.76	0.24	0.80	0.20			
SNP_A-1895758	rs7620213	3	59482405	p14.2	A	G	0.67	0.33	0.69	0.31			FOXA1, Foxa2
SNP_A-2103422	rs11707243	3	63663240	p14.2	A	G	0.10	0.90	0.18	0.82	AK126350		NR1H2::RXRA
SNP_A-2064101	rs12485766	3	132651876	q22.1	A	G	0.36	0.64	0.47	0.53	AK096400		
SNP_A-2028688	rs1533292	4	90044048	q22.1	A	G	0.21	0.79	0.27	0.73		Ja	
SNP_A-1869513	rs1817142	4	109725373	q25	C	G	0.53	0.47	0.55	0.45			
SNP_A-1821649	rs1025999	5	83530814	q14.3	A	G	0.23	0.77	0.21	0.79	EDIL3		MZF1_1-4, MZF1_5-13
SNP_A-1838745	rs39797	5	168863432	q35.1	A	G	0.68	0.32	0.65	0.35			
SNP_A-1985538	rs7746199	6	27261324	p22.1	A	G	0.17	0.83	0.09	0.91			Nkx3-2
SNP_A-2182370	rs9354470	6	67475333	q12	A	G	1.00	0.00	0.99	0.01			REST, znf143

Affymetrix SNP ID	dbSNP RS ID	Chr	Position (hg19)	Cytobande	Allel A	Allel B	p(A) NT	p(B) NT	p(A) PDAC	p(B) PDAC	Gen	CNV	rSNP TF
SNP_A-2056659	rs11984152	7	13176846	p21.3	C	T	0.02	0.98	0.05	0.95			
SNP_A-1943057	rs10950613	7	16395343	p21.2	C	T	0.84	0.16	0.84	0.16	ISPD	Ja	TP53
SNP_A-2288659	rs13246285	7	45293329	p13	C	T	0.24	0.76	0.25	0.75		Ja	
SNP_A-4212377	rs2237457	7	50726144	p12.1	A	G	0.31	0.69	0.31	0.69	GRB10		
SNP_A-1912990	rs10270844	7	83109037	q21.11	C	T	0.46	0.54	0.52	0.48	SEMA3E		Hand1::Tcfe2a
SNP_A-2048831	rs17785550	7	93041548	q21.3	A	G	0.60	0.40	0.62	0.38			
SNP_A-2101410	rs7806304	7	94794785	q21.3	C	G	0.47	0.53	0.50	0.50	PPP1R9A		
SNP_A-4198267	rs2052648	8	5994657	p23.2	A	G	0.46	0.54	0.36	0.64		Ja	
SNP_A-2192835	rs3910124	8	13170751	p22	C	G	0.30	0.70	0.41	0.59	DLC1	Ja	PPARG, Zfx
SNP_A-2202546	rs13253838	8	61123647	q12.1	A	C	0.59	0.41	0.56	0.44	CA8		
SNP_A-1887894	rs13260204	8	64207363	q12.3	A	G	0.47	0.53	0.36	0.64		Ja	Esrrb, MZF1_1-4, Stat3
SNP_A-2085568	rs4338075	8	78015205	q21.11	A	G	0.37	0.63	0.40	0.60			
SNP_A-2120455	rs16905005	8	134869714	q24.22	C	G	0.02	0.98	0.02	0.98			
SNP_A-2126556	rs16905690	8	137360227	q24.23	C	T	0.00	1.00	0.02	0.98			NFE2L2, RORA_2
SNP_A-2062564	rs16910015	8	140055955	q24.3	A	G	0.10	0.90	0.08	0.92			TEAD1, ZNF354C
SNP_A-2014049	rs6477424	9	9866363	p23	C	T	1.00	0.00	0.98	0.02	PTPRD	Ja	
SNP_A-1903385	rs4741411	9	14616371	p22.3	C	T	0.09	0.91	0.10	0.90	ZDHHC21	Ja	HOXA5
SNP_A-1918525	rs2025882	9	77241242	q21.13	A	G	0.63	0.37	0.63	0.37	RORB		
SNP_A-2275779	rs16908498	9	95475352	q22.31	A	G	0.01	0.99	0.02	0.98	BICD2		EWSR1-FLI1
SNP_A-1923407	rs11252514	10	499573	p15.3	A	G	0.00	1.00	0.03	0.97	DIP2C	Ja	
SNP_A-2000940	rs2133469	10	55137245	q21.1	A	G	0.08	0.92	0.18	0.82		Ja	NR4A2, PPARG, RORA_1, RORA_2
SNP_A-2244245	rs16914105	10	61548802	q21.2	A	G	0.06	0.94	0.02	0.98	CCDC6		Myb
SNP_A-1936416	rs4612716	10	119619382	q26.11	A	G	0.36	0.64	0.46	0.54			Sox2
SNP_A-2045452	rs7942590	11	2633715	p15.5	C	G	0.38	0.62	0.54	0.46	KCNQ1	Ja	
SNP_A-1817014	rs4910092	11	10003622	p15.4	C	T	0.79	0.21	0.85	0.15	SFB2		
SNP_A-1961652	rs1826836	11	50140456	p11.12	A	G	0.07	0.93	0.08	0.92		Ja	AP1
SNP_A-2013704	rs10501798	11	92584875	q14.3	C	T	0.29	0.71	0.35	0.65	FAT3		
SNP_A-1936462	rs17497683	12	27496606	p11.23	C	G	0.18	0.82	0.15	0.85	ARNTL2		
SNP_A-1849338	rs7974213	12	48881492	q13.11	C	T	0.59	0.41	0.57	0.43	C12orf54		NR2F1
SNP_A-2061304	rs1512906	12	54933057	q13.2	C	G	0.72	0.28	0.77	0.23	NCKAP1L		
SNP_A-2198730	rs7976838	12	60086206	q14.1	C	T	0.06	0.94	0.08	0.92	SLC16A7		Ar

Affymetrix SNP ID	dbSNP RS ID	Chr	Position (hg19)	Cytobande	Allel A	Allel B	p(A) NT	p(B) NT	p(A) PDAC	p(B) PDAC	Gen	CNV	rSNP TF
SNP_A-2228542	rs7311647	12	78835018	q21.2	C	G	0.61	0.39	0.71	0.29			
SNP_A-1881241	rs6489234	12	128554956	q24.32	C	G	0.07	0.93	0.11	0.89			MIZF, RXRA::VDR
SNP_A-4231892	rs11147519	13	34198941	q13.2	A	G	1.00	0.00	0.99	0.01	STARD13		CEBPA, Esrrb, INSM1
SNP_A-2254149	rs7333778	13	42546074	q14.11	A	C	0.13	0.87	0.14	0.86	AK092199	Ja	Sox17
SNP_A-1822423	rs17063992	13	75793457	q22.2	C	T	0.01	0.99	0.02	0.98			Nkx3-2
SNP_A-2221833	rs17733086	14	58386924	q23.1	G	T	0.10	0.90	0.07	0.93			Pax6
SNP_A-2061968	rs3742387	14	100847930	q32.2	C	T	0.78	0.22	0.75	0.25	WDR25	Ja	
SNP_A-1892686	rs3852637	15	24386487	q11.2	C	G	0.65	0.35	0.64	0.36		Ja	
SNP_A-2275983	rs1514255	15	32245584	q13.3	G	T	0.75	0.25	0.73	0.27		Ja	ESR1, SP1
SNP_A-4227288	rs1836975	15	34928525	q14	C	T	0.02	0.98	0.08	0.92		Ja	
SNP_A-2241497	rs2123148	15	45018735	q21.1	G	T	0.93	0.07	0.94	0.06		Ja	NR3C1
SNP_A-2161360	rs12901436	15	47683095	q21.1	C	G	0.70	0.30	0.76	0.24	SEMA6D		
SNP_A-1807492	rs11854406	15	86486290	q25.3	A	G	0.69	0.31	0.71	0.29			TP53
SNP_A-2277746	rs8053700	16	25454785	p12.1	C	G	0.39	0.61	0.43	0.57			NHLH1
SNP_A-2066488	rs8058174	16	62017413	q21	A	G	0.42	0.58	0.36	0.64	CDH8		
SNP_A-2251501	rs16963551	16	84417003	q24.1	C	G	0.89	0.11	0.91	0.09	ATP2C2		RORA_2
SNP_A-2213653	rs4076503	16	86105916	q24.1	C	T	1.00	0.00	0.99	0.01			HOXA5
SNP_A-1796008	rs180171	17	68037274	q24.3	C	G	0.48	0.52	0.48	0.52		Ja	
SNP_A-1818040	rs7406894	17	72054051	q25.1	A	G	0.23	0.77	0.30	0.70		Ja	
SNP_A-2088037	rs7253209	19	43063494	q13.2	C	T	0.07	0.93	0.11	0.89	AK311181	Ja	CREB1, PPARG
SNP_A-2077387	rs11699547	20	41838127	q13.11	C	T	0.26	0.74	0.34	0.66		Ja	
SNP_A-4241225	rs4558646	20	50463070	q13.2	C	G	0.37	0.63	0.36	0.64	AK096285		ESR1
SNP_A-2016188	rs460639	21	22125690	q21.1	A	G	0.10	0.90	0.06	0.94	C21orf131		Foxd3, FOXI1, Foxq1, znf143
SNP_A-1811354	rs7287281	22	48618698	q13.32	C	T	0.07	0.93	0.15	0.85			
SNP_A-1806432	rs17219378	23	4871591	p22.32	A	G	0.18	0.82	0.09	0.91			
SNP_A-4213790	rs873275	23	99833975	q22.1	A	G	0.76	0.24	0.82	0.18			

Tabelle 27: In dieser Arbeit identifizierte prognostische LOH Regionen (p < 0,01; SNP n > 2)

Chromosom	Cytobande	Start	Stop	Länge (SNPs)	Anzahl Gruppe 1	Anzahl Gruppe 2
1	p36.23	8621197	8967711	23	1	48
1	p31.3	63403386	63986159	70	4	45
1	p31.1	68276114	69732724	132	3	46
1	p31.1	71542954	72186115	56	7	42
1	p31.1	74027940	74540432	41	3	46
1	p31.1	77525671	77598066	22	4	45
1	p31.1	78765405	78775177	4	4	45
1	p21.2	99729795	99817827	12	6	43
1	p13.3	107023856	107802830	94	1	48
1	p12	118659741	119584746	87	6	43
1	q21.1	144964403	145241823	34	8	41
1	q21.2	146227590	148541971	38	3	46
1	q23.1	155416412	155748995	21	1	48
1	q24.2	168777118	168954629	11	1	48
1	q24.3	169469551	169702166	18	1	48
1	q25.2	178493251	178829362	29	4	45
1	q25.3	179853727	179990832	11	3	46
1	q25.3	180252338	180504381	22	1	48
1	q31.1	184467478	184804601	40	1	48
1	q31.1	187102823	187819159	60	17	55
1	q31.1	188568155	189070492	68	8	41
1	q31.3	195962416	196773681	75	6	43
1	q32.1	199829276	200861776	58	2	47
1	q32.2	206223590	207671725	166	2	47
1	q41	214800624	215200363	82	1	48
1	q41	215985793	216489573	55	2	47
1	q41	217152207	217295439	19	2	47
1	q41	219724431	220406261	82	1	48
1	q43	236610193	236805165	32	2	47
2	p25.2	5777782	6092311	55	1	1
2	p25.2	6483994	6884946	59	1	48
2	p25.1	11052055	11165264	19	3	46
2	p24.3	16807399	17170134	42	5	44
2	p24.2	17980717	18312930	32	4	45
2	p24.1	22179300	22857012	61	4	45
2	p22.3	35055306	35679916	82	5	44
2	p22.2	37867695	38114254	38	1	48
2	p22.1	41216240	41400411	34	3	46
2	p21	43052815	43291804	31	1	48
2	p16.3	49122308	49170652	12	4	45
2	p16.3	49689830	49946265	35	1	48
2	p16.3	50389572	50670974	39	1	48
2	p16.2	52818343	53206134	69	11	38
2	p16.2	53281553	53462867	32	1	48
2	p16.1	57795039	57814733	5	3	46
2	p16.1	58566115	58913375	35	2	47
2	p16.1	59602905	59809120	30	1	48
2	p16.1	60805819	61086526	13	1	48
2	p14	64709771	65233462	47	1	48
2	p14	66206103	66334021	18	4	45
2	p12	83404583	83969496	42	10	39
2	q11.1	94914685	96703508	27	1	48
2	q12.1	102466651	102543727	13	5	44
2	q12.2	105843717	105946548	20	2	47
2	q12.3	107264626	107543150	25	3	46
2	q14.1	114567660	114927043	28	3	46
2	q14.1	116453178	116645481	16	8	41
2	q22.1	141512579	141693090	16	3	46

Chromosom	Cytobande	Start	Stop	Länge (SNPs)	Anzahl Gruppe 1	Anzahl Gruppe 2
2	q22.2	142832259	143391296	55	24	25
2	q22.3	145732417	146207031	43	3	46
2	q24.1	157226944	158813630	123	5	44
2	q24.3	164423883	164815544	47	8	41
2	q31.1	171401954	171557858	14	2	47
2	q31.1	176583689	177691833	137	4	45
2	q31.2	180031534	180243497	32	2	47
2	q32.1	183717921	183983610	26	2	47
2	q32.1	185052431	185143028	16	3	46
2	q32.3	193516105	194884458	91	16	33
2	q33.3	206494076	207358659	79	4	45
2	q33.3	207832838	209026579	89	6	43
2	q34	210768295	211126163	45	9	40
2	q34	212588716	213552195	130	5	44
2	q34	214752480	215601087	95	6	43
2	q35	216599864	217281937	76	3	46
2	q36.1	223775131	223823920	12	8	41
2	q36.1	224270769	224953845	73	6	43
2	q36.3	228249517	228361483	8	2	47
2	q36.3	228730203	229125529	43	2	47
2	q37.1	234505096	234907155	49	2	47
2	q37.2	236228020	236276002	6	2	47
3	p26.3	48789	416553	79	2	47
3	p26.1	6069373	6099295	7	2	47
3	p14.3	55651363	56088596	55	6	43
3	p14.3	57106569	58736848	97	3	46
3	p14.2	60434227	60478478	17	4	45
3	p14.1	67066723	67073419	5	5	44
3	p12.3	81235306	81353365	15	5	44
3	q11.2	97770237	98508607	51	14	35
3	q12.1	100588881	101570024	81	11	38
3	q13.11	105637747	105742077	9	2	47
3	q13.11	106055148	106402180	36	2	47
3	q13.31	117891785	117928301	5	4	45
3	q13.31	118178243	118829361	97	2	47
3	q21.2	127132735	127541452	32	4	45
3	q21.3	128454438	129156025	44	2	47
3	q22.2	135961212	136064194	10	4	45
3	q23	140425733	140810917	50	4	45
3	q24	146024762	147062155	114	4	45
3	q25.2	153551827	153663019	12	2	47
3	q25.2	155414032	156557223	66	2	47
3	q26.1	168757781	169085611	33	4	45
3	q26.31	174772293	174807704	12	2	47
3	q26.32	178539833	180789469	186	2	47
3	q26.33	181565619	181907703	21	4	45
3	q26.33	184096377	184736138	52	5	44
4	p15.32	15445335	15677846	34	1	48
4	p15.32	15971851	16604593	58	2	47
4	p15.32	17215757	17418636	26	3	46
4	p15.1	35426032	35674494	37	2	47
4	p14	36659702	36817028	44	3	46
4	p14	39494917	39839120	17	1	48
4	p13	41374230	42515001	117	1	48
4	p13	44528549	44961257	61	6	43
4	p12	47141223	47470226	42	1	48
4	q12	53128445	54178905	92	6	43
4	q12	54686489	54815432	7	2	47
4	q12	57428256	57781793	54	2	47
4	q13.1	63129593	63229043	6	4	45

Chromosom	Cytobande	Start	Stop	Länge (SNPs)	Anzahl Gruppe 1	Anzahl Gruppe 2
4	q13.3	70838463	70939569	8	1	48
4	q21.1	77989573	78099916	20	2	47
4	q21.23	85594591	85619077	4	3	46
4	q21.3	87283699	87323194	3	4	45
4	q25	109414829	109441014	7	1	48
4	q28.1	127248513	127478171	21	4	45
4	q28.2	130483967	130552094	7	5	44
4	q28.3	131386443	131460947	8	3	46
4	q28.3	132099716	132182068	3	5	44
4	q31.3	153405576	153757121	12	4	45
4	q32.1	160433073	160544399	11	2	47
4	q35.1	184806510	185402399	74	1	48
4	q35.2	189093367	189294114	26	2	47
5	p15.33	1599049	2097935	49	1	48
5	p15.33	3667846	3787365	21	1	48
5	p15.31	7584303	7728722	24	2	47
5	p15.1	16354350	16760837	68	1	48
5	p14.1	26102784	26728518	56	2	47
5	p14.1	27363094	28118416	66	2	47
5	p13.3	29501352	31089541	188	4	45
5	p13.1	39497012	39606981	17	2	47
5	p13.1	41080373	41483944	44	5	44
5	q11.2	52289413	52699792	70	8	41
5	q11.2	52903087	53852539	89	2	47
5	q11.2	55859861	56393904	88	4	45
5	q11.2	56951342	57014937	11	2	47
5	q11.2	57441557	57740222	41	3	46
5	q12.1	59770613	61091141	126	8	41
5	q13.2	73184872	73196531	3	5	44
5	q21.2	102920123	103056748	13	2	47
5	q23.1	116708696	116910275	32	6	43
5	q23.1	117087225	117144342	8	4	45
5	q23.1	117365652	117366264	2	5	44
5	q23.1	118879633	119217322	34	4	45
5	q23.3	128389795	128452593	9	7	42
5	q31.1	130390366	131703763	82	18	31
5	q31.1	134452111	137472899	313	4	45
5	q33.1	149326168	149946883	45	2	47
5	q33.1	150422174	151004245	59	1	48
5	q33.2	154670414	154750972	12	9	40
5	q33.2	154948814	155052244	22	9	40
5	q34	160321994	160464342	14	2	47
5	q34	164351321	164789868	69	12	37
5	q35.1	170246222	170251444	4	9	40
5	q35.1	170499296	170748847	15	7	42
6	p25.2	3131048	3410832	36	4	45
6	p24.3	8753010	9019224	43	5	44
6	p22.3	17367659	17592490	14	3	46
6	p22.3	19552477	20686355	135	2	47
6	p22.3	22614552	22705604	25	4	45
6	p22.3	22834179	23164067	20	1	48
6	p22.1	29566220	29690504	19	8	41
6	p22.1	29853740	30301492	77	5	44
6	p21.31	35484265	36088690	39	3	46
6	p21.2	38724245	38726225	2	2	47
6	p21.2	39323579	39876385	45	2	47
6	p12.3	46295713	47050513	84	3	46
6	p12.3	49628042	49920891	29	2	47
6	p12.2	51791333	52087688	27	6	43
6	q12	66037956	66327875	22	3	46

Chromosom	Cytobande	Start	Stop	Länge (SNPs)	Anzahl Gruppe 1	Anzahl Gruppe 2
6	q12	67058797	67362028	45	3	46
6	q13	73637772	73736298	9	3	46
6	q14.1	77539033	77694652	31	4	45
6	q14.1	82501165	82983497	53	2	47
6	q14.3	85301899	85391817	9	4	45
6	q14.3	85823204	85845113	12	4	45
6	q16.3	100348879	100385569	8	3	46
6	q21	112408629	112964792	60	2	47
6	q22.1	115333820	116112228	57	5	44
6	q22.2	117564000	117922821	48	2	47
6	q22.31	123446403	123940204	48	4	45
6	q22.31	125082055	125340039	32	2	47
6	q23.2	132825558	133045037	26	4	45
6	q23.3	137011307	137020933	3	5	44
6	q23.3	138174209	138878665	64	4	45
6	q24.1	139411236	139529087	13	3	46
6	q24.1	142309717	142927644	56	7	42
6	q24.2	143057236	143260833	22	4	45
6	q25.1	149348677	149643284	22	3	46
6	q25.1	150425014	150557543	19	2	47
6	q25.3	158946367	159452448	34	2	47
6	q26	162768919	163253575	54	9	40
6	q27	164980085	165474393	51	5	44
7	p22.2	3290559	3955084	97	3	46
7	p21.3	8379176	8662442	57	1	48
7	p21.2	13659315	13692936	6	1	48
7	p21.2	14071373	14298448	45	2	47
7	p21.2	14817764	14881543	15	4	45
7	p21.1	15450601	16023596	97	4	45
7	p15.3	23417323	23909790	34	2	47
7	p15.2	25480258	25566166	13	1	48
7	p15.1	29468810	29624984	18	1	48
7	p14.3	32365499	32526778	19	5	44
7	p14.3	33473074	33554069	14	3	46
7	p14.1	38936691	39263867	37	5	44
7	p13	45992706	46540548	90	7	42
7	p11.2	53976109	54104682	16	3	46
7	p11.1	57430153	57923922	33	2	47
7	q11.21	63960987	65557633	49	6	43
7	q11.22	66983805	67133827	14	1	48
7	q11.23	72400365	72879322	7	1	48
7	q11.23	76739843	77588425	59	2	47
7	q21.11	81402565	81878689	64	2	47
7	q21.11	82806406	83070275	36	6	43
7	q21.11	86060195	86216832	15	2	47
7	q21.12	86886466	87697892	39	2	47
7	q21.13	88486071	88689428	20	1	48
7	q21.13	89569916	89985172	35	4	45
7	q31.1	109805335	109921826	21	1	48
7	q31.31	120089523	120424032	24	14	35
7	q32.3	132156198	132380354	23	6	43
7	q34	141587367	141690532	17	1	48
7	q35	142864307	143360707	26	2	47
7	q36.3	156440680	156805124	25	3	46
8	p23.1	6434931	6447596	9	4	45
8	p22	13409237	13539660	45	2	47
8	p12	32275327	32306622	7	1	48
8	p11.22	39548228	39692225	13	1	48
8	q11.23	54080020	54108723	5	3	46
8	q12.1	56816615	56869548	7	1	48

Chromosom	Cytobande	Start	Stop	Länge (SNPs)	Anzahl Gruppe 1	Anzahl Gruppe 2
8	q12.1	57953734	57985421	10	7	42
8	q22.1	94190998	94447095	23	3	46
8	q23.1	106793887	107487948	72	5	44
8	q23.3	114765406	115055589	45	6	43
8	q23.3	117178354	117404529	19	8	41
8	q24.12	119961670	120638107	110	7	42
8	q24.21	129274792	129488632	24	1	48
8	q24.21	129599674	129641731	12	1	48
8	q24.23	137918448	138167112	35	5	44
9	p24.1	5164829	5541261	41	3	46
9	p24.1	8526034	8546180	2	5	44
9	p23	10025658	10118645	38	6	43
9	p22.3	14256746	14559262	37	2	47
9	p22.2	17726775	17849223	18	5	44
9	p22.2	18302495	18420609	13	2	47
9	p21.3	23746299	23803100	7	3	46
9	p21.2	27913958	27973086	21	3	46
9	p21.2	28039518	28370244	53	3	46
9	p21.1	31436639	31861335	67	9	40
9	p21.1	32103319	33200959	121	4	45
9	p13.3	35846634	36907333	76	2	47
9	q21.11	71669176	72434455	95	3	46
9	q21.11	72648924	72692456	13	1	48
9	q21.13	77538604	77561230	8	1	48
9	q21.31	81142463	81360270	39	4	45
9	q21.32	84953084	85095886	34	1	48
9	q22.33	100839114	101694574	55	2	47
9	q31.1	101724864	102067676	27	6	43
9	q31.1	102527621	102594448	9	1	48
9	q31.1	103163583	103205181	6	1	48
9	q32	114904286	115184794	31	2	47
9	q33.1	117615774	117758018	19	3	46
9	q34.3	139586637	139874940	15	1	48
10	p15.3	148946	1160496	95	5	44
10	p15.1	4061978	4215127	21	6	43
10	p14	8178281	8228936	9	2	47
10	p14	9483504	10289933	79	4	45
10	p13	13692836	15673163	294	3	46
10	p12.33	17577372	18400510	36	2	47
10	p12.33	19184471	19483329	41	7	42
10	p12.32	20148234	20227503	11	7	42
10	p12.31	20636397	21005946	47	3	46
10	p12.31	21712282	22060671	14	4	45
10	p12.2	23398083	23415729	3	3	46
10	p12.1	24283369	25746982	145	3	46
10	p12.1	26016558	27640386	213	3	46
10	p11.23	29056900	31651262	340	2	47
10	p11.22	33432271	33467609	12	10	39
10	p11.21	36903981	36974718	15	3	46
10	q11.21	44118488	44206348	15	2	47
10	q11.22	49890618	50620982	74	4	45
10	q21.1	54331891	54494921	29	2	47
10	q21.1	58618091	59003077	59	8	41
10	q21.1	59650658	59831646	15	8	41
10	q21.1	59987781	60011404	8	10	39
10	q21.2	61236216	61264458	4	4	45
10	q21.3	65422711	65444020	3	7	42
10	q22.1	71384543	71806006	42	3	46
10	q22.2	76607581	76877984	13	5	44
10	q22.2	77040325	77715269	83	4	45

Chromosom	Cytobande	Start	Stop	Länge (SNPs)	Anzahl Gruppe 1	Anzahl Gruppe 2
10	q22.3	78366711	78426933	14	2	47
10	q23.1	86536593	87001287	72	8	41
10	q23.1	87567313	87719173	14	3	46
10	q23.2	88372590	88921717	27	2	47
10	q23.31	92644327	92823738	18	3	46
10	q23.33	94745188	95629802	100	2	47
10	q23.33	97330608	98138547	70	5	44
10	q24.32	104698302	105380011	39	5	44
10	q25.2	112689969	113055030	39	3	46
10	q25.3	117515187	117656755	24	10	39
10	q26.11	121265893	121318411	8	3	46
10	q26.11	121595918	121809910	21	7	42
10	q26.12	121963094	122376622	57	3	46
10	q26.12	122779808	122909299	29	3	46
10	q26.13	125218812	125440976	32	3	46
10	q26.13	127269561	127798714	57	4	45
11	p15.4	6440086	6622089	12	2	47
11	p15.4	8372604	8708216	31	5	44
11	p15.1	21051286	21313391	35	1	48
11	p14.3	24514743	24607432	14	2	47
11	p14.2	26305459	26341558	6	5	44
11	q12.1	57699904	57725262	6	10	39
11	q12.1	59563222	59645277	20	5	44
11	q12.3	61840484	62478243	23	2	47
11	q13.4	73776381	73806589	3	2	47
11	q14.1	78887454	79065602	32	1	48
11	q14.2	87597469	87815416	25	6	43
11	q14.3	91682927	91712390	5	1	48
11	q14.3	92277315	92381970	13	2	47
11	q21	92995557	93537561	54	5	44
11	q21	94704374	94884912	31	1	48
11	q22.1	100396203	100713984	39	2	47
11	q22.3	109297912	109437279	18	2	47
11	q23.3	118706909	119269245	58	2	47
11	q24.2	123958703	123986930	4	1	48
11	q24.2	126709174	127014160	52	2	47
12	p13.33	100208	685143	47	2	47
12	p13.1	14466726	14780032	23	2	47
12	p12.3	16194276	16344492	24	3	46
12	p12.3	17405876	17685445	47	3	46
12	p12.1	24480016	25295871	128	3	46
12	p11.22	28130326	28216385	15	2	47
12	q15	68310545	68480702	20	1	48
12	q21.2	75571913	75790849	22	2	47
12	q21.2	76289799	76333719	16	6	43
12	q21.33	90829401	90837924	3	2	47
12	q22	91526326	92010315	42	2	47
12	q23.3	104121414	104620036	56	2	47
12	q23.3	106228244	106281133	9	4	45
13	q12.2	26945908	27826688	88	3	46
13	q13.1	31281225	31402939	16	3	46
13	q13.1	32770675	32799161	6	1	48
13	q14.3	51036156	52296069	56	2	47
13	q21.1	55407817	56008904	63	14	35
13	q21.2	58712771	58750647	8	1	48
13	q21.33	69783825	69870734	23	1	48
13	q21.33	70443355	70578186	20	2	47
13	q31.3	91836574	91896638	13	4	45
14	q12	25046559	25514014	58	1	48
14	q12	27175888	27326993	12	5	44

Chromosom	Cytobande	Start	Stop	Länge (SNPs)	Anzahl Gruppe 1	Anzahl Gruppe 2
14	q12	29571390	29880348	26	1	48
14	q13.2	34892982	35155497	22	2	47
14	q21.2	41989605	42220772	22	3	46
14	q22.1	50395267	50395789	2	2	47
14	q23.2	62543233	62749462	20	8	41
14	q23.2	63899770	64640139	81	6	43
14	q24.2	70864498	71122850	9	2	47
14	q24.3	74100217	74109504	4	6	43
14	q31.1	82061523	82069781	4	2	47
15	q14	32274208	32330347	5	5	44
15	q14	37374297	37439272	21	5	44
15	q15.1	40548728	40751718	10	11	38
15	q15.3	41419430	41999160	13	13	36
15	q21.2	49464551	49574169	4	5	44
15	q22.33	65034856	65045401	3	2	47
16	p13.12	12525966	12585366	11	1	48
16	p13.12	12781401	12872549	11	2	47
16	p13.12	13339834	13547480	41	3	46
16	p12.3	20029791	20098136	9	1	48
16	q23.1	74355880	74542562	13	4	45
16	q23.1	76160009	76400711	74	4	45
16	q23.2	78526600	78915159	101	10	39
16	q23.3	81602482	81647004	13	2	47
17	p13.3	1819758	2062672	14	3	46
17	p13.1	7490406	7962790	14	2	47
17	p13.1	10246545	10548743	20	3	46
17	p11.2	18512070	19329816	29	3	46
17	q11.2	24433864	25002820	18	4	45
17	q21.32	43038124	44402113	66	4	45
17	q22	54542511	55565566	36	6	43
17	q24.2	61789701	61813324	4	8	41
17	q24.2	62030921	62168179	19	3	46
17	q24.3	65310483	65489965	25	4	45
17	q24.3	67869653	67871690	2	3	46
17	q24.3	68344689	68513074	22	2	47
17	q25.3	77303541	77796556	11	3	46
18	p11.31	5280198	5635281	40	1	48
18	p11.31	5809800	6097709	39	2	47
18	q12.1	26090227	26205825	17	4	45
18	q12.2	32936968	33156123	8	4	45
18	q12.2	33496434	33762380	23	3	46
18	q12.2	34296404	34597806	35	2	47
18	q12.2	34825074	35009755	18	7	42
18	q12.3	37759004	38401669	79	12	37
18	q12.3	39812216	40717438	84	4	45
18	q21.2	48203568	48205774	3	4	45
18	q21.2	48658755	49193696	64	8	41
18	q21.33	57282780	57446966	31	2	47
18	q21.33	58128370	59164615	82	2	47
18	q22.3	70399230	70906685	57	3	46
18	q23	71413641	71542855	25	2	47
18	q23	71616004	71632221	3	2	47
19	q12	33995506	34395197	55	2	47
20	p12.1	15066513	15194984	28	3	46
20	p11.21	22496142	22786648	45	5	44
20	q13.12	41708913	41816915	9	1	48
20	q13.13	47509319	47596551	8	1	48
20	q13.2	51106390	51111377	2	1	48
20	q13.2	51889852	52230378	69	1	48
20	q13.2	53661541	53949745	58	3	46

Chromosom	Cytobande	Start	Stop	Länge (SNPs)	Anzahl Gruppe 1	Anzahl Gruppe 2
20	q13.2	54095616	54337486	34	1	48
21	q11.2	15161613	15578522	49	2	47
21	q21.1	18469345	18755241	33	2	47
21	q21.1	19018794	19272082	37	4	45
21	q21.1	20064295	20084545	2	4	45
21	q21.1	20847744	20857270	5	3	46
21	q21.1	21743514	21758220	2	4	45
21	q21.2	23860188	23864946	2	4	45
21	q21.2	24254905	24465879	62	10	39
21	q21.2	24882261	25032989	32	3	46
21	q22.12	36104818	36822288	70	4	45
21	q22.2	39721667	40175164	70	3	46
21	q22.2	40946021	41065373	21	3	46
22	q12.2	29194692	29444086	13	1	48
22	q12.3	32765815	32803145	2	3	46
22	q13.1	37522941	39453222	72	3	46
22	q13.31	45728382	45786323	9	3	46

Tabelle 28: Differentielle Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe-Proben des Pankreas (FC > 5; p < 0,05)

Gen	Cytobande	Beschreibung	FC	1/FC	p-Wert
CEACAM6	19q13.2	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	31.91	0.03	0.00026
POSTN	13q13.3	periostin, osteoblast specific factor	30.99	0.03	0.00000
COL1A1	17q21.33	collagen, type I, alpha 1	25.73	0.04	0.00000
SULF1	8q13.2-q13.3	sulfatase 1	20.85	0.05	0.00000
TFF1	21q22.3	trefoil factor 1	19.20	0.05	0.00097
CEACAM5	19q13.1-q13.2	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	17.68	0.06	0.00149
ASPN	9q22	asporin	16.21	0.06	0.00000
ANXA1	9q12-q21.2|9q12-q21.2	annexin A1	15.81	0.06	0.00000
COL3A1	2q31	collagen, type III, alpha 1	15.61	0.06	0.00000
NQO1	16q22.1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	15.02	0.07	0.00000
TSPAN1	1p34.1	tetraspanin 1	14.53	0.07	0.00003
COL1A2	7q22.1	collagen, type I, alpha 2	14.46	0.07	0.00000
LUM	12q21.3-q22	lumican	13.91	0.07	0.00001
SFRP4	7p14.1	secreted frizzled-related protein 4	13.81	0.07	0.00024
GEM	8q13-q21	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	13.22	0.08	0.00000
LYZ	12q15	lysozyme (renal amyloidosis)	13.09	0.08	0.00002
PLAC8	4q21.22	placenta-specific 8	13.09	0.08	0.00001
GPRC5A	12p13-p12.3	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	12.93	0.08	0.00001
FN1	2q34	fibronectin 1	12.69	0.08	0.00000
CRIP1	14q32.33	cysteine-rich protein 1 (intestinal)	11.92	0.08	0.00001
SEMA3C	7q21-q31	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	11.78	0.08	0.00000
SPARC	5q31.3-q32	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	11.45	0.09	0.00000
ITGA2	5q23-q31	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	11.31	0.09	0.00002
LAMC2	1q25-q31	laminin, gamma 2	11.14	0.09	0.00014
TSPAN8	12q14.1-q21.1	tetraspanin 8	11.10	0.09	0.00002
THY1	11q22.3-q23	Thy-1 cell surface antigen	10.73	0.09	0.00000
HIST1H3C	6p21.3	histone cluster 1, H3c	10.60	0.09	0.00000

Gen	Cytobande	Beschreibung	FC	1/FC	p-Wert
AHNAK2	14q32.33	AHNAK nucleoprotein 2	10.32	0.10	0.00004
SFRP2	4q31.3	secreted frizzled-related protein 2	10.20	0.10	0.00129
VCAN	5q14.3	versican	10.14	0.10	0.00000
APOL1	22q13.1	apolipoprotein L, 1	10.10	0.10	0.00000
ANTXR1	2p13.1	anthrax toxin receptor 1	9.74	0.10	0.00000
BGN	Xq28	biglycan	9.72	0.10	0.00000
ACTA2	10q23.3	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	9.36	0.11	0.00001
CDH11	16q22.1	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	9.18	0.11	0.00000
GREM1	15q13-q15	gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	8.90	0.11	0.00041
CTSK	1q21	cathepsin K	8.88	0.11	0.00000
EMP1	12p12.3	epithelial membrane protein 1	8.87	0.11	0.00000
F2R	5q13	coagulation factor II (thrombin) receptor	8.76	0.11	0.00000
HLA-DRA	6p21.3	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	8.47	0.12	0.00000
IGJ	4q21	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	8.44	0.12	0.00871
TGFBI	5q31	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	8.38	0.12	0.00000
SLC2A1	1p35-p31.3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	8.30	0.12	0.00003
NT5E	6q14-q21	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	8.16	0.12	0.00010
EDIL3	5q14	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	8.08	0.12	0.00004
REEP3	10q21.3	receptor accessory protein 3	8.03	0.12	0.00000
IGFBP5	2q33-q36	insulin-like growth factor binding protein 5	8.01	0.12	0.00008
LCN2	9q34	lipocalin 2	8.01	0.12	0.00078
GABRP	5q33-q34	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi	7.95	0.13	0.00462
IFI6	1p35	interferon, alpha-inducible protein 6	7.92	0.13	0.00000
CKLF	16q21	chemokine-like factor	7.75	0.13	0.00000
RAB31	18p11.3	RAB31, member RAS oncogene family	7.74	0.13	0.00000
FBN1	15q21.1	fibrillin 1	7.73	0.13	0.00000
IFI44L	1p31.1	interferon-induced protein 44-like	7.68	0.13	0.00000
SLPI	20q12	secretory leukocyte peptidase inhibitor	7.61	0.13	0.00006
SLC16A3	17q25	solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	7.57	0.13	0.00002
CST1	20p11.21	cystatin SN	7.46	0.13	0.00368
FAM127A	Xq26	family with sequence similarity 127, member A	7.44	0.13	0.00023
GLIPR1	12q21.2	GLI pathogenesis-related 1	7.44	0.13	0.00001
MYOF	10q24	myoferlin	7.39	0.14	0.00000
TIMP1	Xp11.3-p11.23	TIMP metallopeptidase inhibitor 1	7.35	0.14	0.00000
RCN1	11p13	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain	7.33	0.14	0.00002
COL5A2	2q14-q32	collagen, type V, alpha 2	7.30	0.14	0.00000
THBS2	6q27	thrombospondin 2	7.27	0.14	0.00000
HIST1H3B	6p21.3	histone cluster 1, H3b	7.26	0.14	0.00079
TMPRSS4	11q23.3	transmembrane protease, serine 4	7.24	0.14	0.00151
ITGB6	2q24.2	integrin, beta 6	7.22	0.14	0.00092
ACSL5	10q25.1-q25.2	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	7.22	0.14	0.00002
SERPINE1	7q21.3-q22	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	7.18	0.14	0.00039
ISLR	15q23-q24	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat	7.15	0.14	0.00001
ARHGDIB	12p12.3	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	7.12	0.14	0.00000
PLAU	10q24	plasminogen activator, urokinase	7.00	0.14	0.00010

Gen	Cytobande	Beschreibung	FC	1/FC	p-Wert
GPX2	14q24.1	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	6.99	0.14	0.00040
CFH	1q32	complement factor H	6.93	0.14	0.00000
IGFBP3	7p13-p12	insulin-like growth factor binding protein 3	6.91	0.14	0.00005
PLAUR	19q13	plasminogen activator, urokinase receptor	6.90	0.14	0.00000
HLA-DPB1	6p21.3	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	6.90	0.15	0.00006
SLC6A14	Xq23-q24	solute carrier family 6 (amino acid transporter), member 14	6.89	0.15	0.00183
TCN1	11q11-q12	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	6.77	0.15	0.00045
IL2RG	Xq13.1	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	6.70	0.15	0.00000
TGM2	20q12	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	6.70	0.15	0.00005
OAS1	12q24.1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	6.69	0.15	0.00000
CCDC80	3q13.2	coiled-coil domain containing 80	6.69	0.15	0.00130
HLA-DMB	6p21.3	major histocompatibility complex, class II, DM beta	6.68	0.15	0.00002
RRM2	2p25-p24	ribonucleotide reductase M2	6.68	0.15	0.00071
S100A16	1q21	S100 calcium binding protein A16	6.67	0.15	0.00001
MMP2	16q13-q21	matrix metallopeptidase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	6.62	0.15	0.00002
EDNRA	4q31.22	endothelin receptor type A	6.60	0.15	0.00000
GCNT3	15q21.3	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type	6.55	0.15	0.00167
SLC16A1	1p12	solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)	6.55	0.15	0.00001
CALM2	2p21	calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)	6.45	0.15	0.00000
ITGBL1	13q33	integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)	6.42	0.16	0.00054
GALNT5	2q24.1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 (GalNAc-T5)	6.39	0.16	0.00089
IFI27	14q32	interferon, alpha-inducible protein 27	6.36	0.16	0.00001
C15orf48	15q21.1	chromosome 15 open reading frame 48	6.31	0.16	0.00120
CCL18	17q11.2	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	6.28	0.16	0.00059
CXCR4	2q21	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	6.23	0.16	0.00003
CCL19	9p13	chemokine (C-C motif) ligand 19	6.23	0.16	0.00642
SLC6A6	3p25-p24	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	6.19	0.16	0.00000
IFI16	1q22	interferon, gamma-inducible protein 16	6.07	0.16	0.00000
TUBA1B	12q13.12	tubulin, alpha 1b	5.97	0.17	0.00126
INHBA	7p15-p13	inhibin, beta A	5.96	0.17	0.00002
MMP1	11q22.3	matrix metallopeptidase 1 (interstitial collagenase)	5.96	0.17	0.02006
IGK@	2p12	immunoglobulin kappa locus	5.86	0.17	0.00575
IL8	4q13-q21	interleukin 8	5.77	0.17	0.00171
UACA	15q22-q24	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	5.67	0.18	0.00000
DPYSL3	5q32	dihydropyrimidinase-like 3	5.66	0.18	0.00000
SLC2A3	12p13.3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	5.64	0.18	0.00002
SLFN5	17q12	schlafen family member 5	5.63	0.18	0.00000
PMP22	17p12-p11.2	peripheral myelin protein 22	5.62	0.18	0.00005
IFITM1	11p15.5	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	5.60	0.18	0.00000
PLAT	8p12	plasminogen activator, tissue	5.59	0.18	0.00000
HIST1H3I	6p22-p21.3	histone cluster 1, H3i	5.58	0.18	0.00093
COL6A3	2q37	collagen, type VI, alpha 3	5.55	0.18	0.00000
FAP	2q23	fibroblast activation protein, alpha	5.55	0.18	0.00016
ANO1	11q13.3	anoctamin 1, calcium activated chloride channel	5.52	0.18	0.00000

Gen	Cytobande	Beschreibung	FC	1/FC	p-Wert
HLA-DPA1	6p21.3	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	5.52	0.18	0.00024
SAMD9	7q21.2	sterile alpha motif domain containing 9	5.52	0.18	0.00004
RAP1B	12q14	RAP1B, member of RAS oncogene family	5.47	0.18	0.00013
GBP1	1p22.2	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	5.46	0.18	0.00003
RARRES3	11q23	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	5.46	0.18	0.00000
MMD	17q	monocyte to macrophage differentiation-associated	5.43	0.18	0.00001
PLXDC2	10p12.31	plexin domain containing 2	5.40	0.19	0.00001
MGP	12p13.1-p12.3	matrix Gla protein	5.37	0.19	0.00384
GPNMB	7p15	glycoprotein (transmembrane) nmb	5.33	0.19	0.00004
PSMB9	6p21.3	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)	5.33	0.19	0.00001
SH3PXD2A	10q24.33	SH3 and PX domains 2A	5.33	0.19	0.00048
LAPTM5	1p34	lysosomal protein transmembrane 5	5.30	0.19	0.00004
CLDN18	3q22.3	claudin 18	5.30	0.19	0.00366
OAS2	12q24.2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	5.28	0.19	0.00001
LAMA4	6q21	laminin, alpha 4	5.27	0.19	0.00000
HAS2	8q24.12	hyaluronan synthase 2	5.23	0.19	0.00024
IL2RA	10p15-p14	interleukin 2 receptor, alpha	5.23	0.19	0.00017
FRMD6	14q22.1	FERM domain containing 6	5.21	0.19	0.00000
RND3	2q23.3	Rho family GTPase 3	5.18	0.19	0.00000
TUBA1C	12q12-q14	tubulin, alpha 1c	5.16	0.19	0.00000
GMFG	19q13.2	glia maturation factor, gamma	5.13	0.19	0.00007
CD74	5q32	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	5.11	0.20	0.00000
MUC13	3q21.2	mucin 13, cell surface associated	5.09	0.20	0.00797
MALL	2q13	mal, T-cell differentiation protein-like	5.07	0.20	0.00004
IFIT1	10q25-q26	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	5.05	0.20	0.00014
AMICA1	11q23.3	adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1	5.03	0.20	0.00020
RBPJL	20q12-q13.1	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region-like	0.20	5.10	0.00000
GOLSYN	8q23.2	Golgi-localized protein	0.20	5.11	0.00000
SLC38A3	3p21.3	solute carrier family 38, member 3	0.19	5.15	0.00007
ALG1L	3q21.2	asparagine-linked glycosylation 1-like	0.19	5.23	0.00061
GOLGA8B	15q14	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8B	0.19	5.24	0.00058
KIAA1324	1p13.3	KIAA1324	0.19	5.39	0.00223
DEFB1	8p23.2-p23.1	defensin, beta 1	0.18	5.50	0.00001
SLC1A2	11p13-p12	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	0.18	5.58	0.00000
GPT2	16q12.1	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2	0.18	5.68	0.00000
SST	3q28	somatostatin	0.18	5.71	0.02890
AKR7A3	1p36.13	aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase)	0.17	5.72	0.00000
CFTR	7q31.2	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7)	0.17	5.79	0.01616
PRSS3	9p11.2	protease, serine, 3	0.17	5.79	0.00109
RPS4Y1	Yp11.3	ribosomal protein S4, Y-linked 1	0.17	5.81	0.03898
SLC30A2	1p35.3	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 2	0.17	5.97	0.00000
IAPP	12p12.3-p12.1	islet amyloid polypeptide	0.17	6.01	0.00543
SLC43A1	11p11.2-p11.1	solute carrier family 43, member 1	0.16	6.09	0.00000
SLC4A4	4q21	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4	0.16	6.21	0.01115

Gen	Cytobande	Beschreibung	FC	1/FC	p-Wert
SLC7A2	8p22-p21.3	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	0.15	6.53	0.00000
PSAT1	9q21.2	phosphoserine aminotransferase 1	0.14	7.38	0.00005
EGF	4q25	epidermal growth factor (beta-urogastrone)	0.13	7.57	0.00000
SERPINA3	14q32.1	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	0.13	7.71	0.00174
AADAC	3q21.3-q25.2	arylacetamide deacetylase (esterase)	0.13	7.92	0.00000
AOX1	2q33	aldehyde oxidase 1	0.13	7.96	0.00010
AZGP1	7q22.1	alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding	0.13	7.99	0.00193
GNMT	6p12	glycine N-methyltransferase	0.12	8.29	0.00001
SPINK1	5q32	serine peptidase inhibitor, Kazal type 1	0.12	8.42	0.01033
PM20D1	1q32.1	peptidase M20 domain containing 1	0.11	8.70	0.00000
ERO1LB	1q42.2-q43	ERO1-like beta (S. cerevisiae)	0.11	8.74	0.00001
NR5A2	1q32.1	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	0.11	9.20	0.00001
REG3G	2p12	regenerating islet-derived 3 gamma	0.11	9.27	0.00151
IL22RA1	1p36.11	interleukin 22 receptor, alpha 1	0.11	9.36	0.00000
REG3A	2p12	regenerating islet-derived 3 alpha	0.10	9.57	0.00363
TRHDE	12q15-q21	thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme	0.10	9.82	0.00000
PDK4	7q21.3	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	0.10	9.84	0.00014
ANPEP	15q25-q26	alanyl (membrane) aminopeptidase	0.10	9.97	0.00002
MT1G	16q13	metallothionein 1G	0.10	10.23	0.00066
BHLHA15	7q21.3	basic helix-loop-helix family, member a15	0.09	11.17	0.00000
ALDOB	9q21.3-q22.2	aldolase B, fructose-bisphosphate	0.09	11.32	0.00000
AQP8	16p12	aquaporin 8	0.09	11.62	0.00002
BNIP3	10q26.3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	0.09	11.65	0.00093
GATM	15q21.1	glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	0.08	13.33	0.00006
TMED6	16q22.1	transmembrane emp24 protein transport domain containing 6	0.06	15.86	0.00000
CELP	9q34.3	carboxyl ester lipase pseudogene	0.06	16.54	0.00000
GCG	2q36-q37	glucagon	0.06	16.57	0.02466
SLC39A5	12q13.3	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 5	0.06	17.16	0.00000
CTRB2	16q23.1	chymotrypsinogen B2	0.05	22.02	0.00063
AMY2B	1p21	amylase, alpha 2B (pancreatic)	0.04	23.34	0.00003
PDIA2	16p13.3	protein disulfide isomerase family A, member 2	0.04	27.54	0.00000
SERPINI2	3q26.1-q26.2	serpin peptidase inhibitor, clade I (pancpin), member 2	0.03	28.64	0.00000
REG1A	2p12	regenerating islet-derived 1 alpha	0.03	30.48	0.00438
KLK1	19q13.3	kallikrein 1	0.03	35.34	0.00001
ERP27	12p12.3	endoplasmic reticulum protein 27	0.03	36.06	0.00001
REG1P	2p12	regenerating islet-derived 1 pseudogene	0.03	38.79	0.00006
FGL1	8p22	fibrinogen-like 1	0.02	40.28	0.00000
GSTA2	6p12.1	glutathione S-transferase alpha 2	0.02	41.55	0.00000
CELA3B	1p36.12	chymotrypsin-like elastase family, member 3B	0.02	44.60	0.00008
TRY6	7q34	trypsinogen C	0.02	45.68	0.00003
CTRL	16q22.1	chymotrypsin-like	0.02	48.28	0.00002
CTRC	1p36.21	chymotrypsin C (caldecrin)	0.02	50.65	0.00007
PRSS1	7q32-qter|7q34	protease, serine, 1 (trypsin 1)	0.02	51.40	0.00030
CELA2B	1p36.21	chymotrypsin-like elastase family, member 2B	0.02	54.35	0.00004
CUZD1	10q26.13	CUB and zona pellucida-like domains 1	0.02	61.90	0.00000

Gen	Cytobande	Beschreibung	FC	1/FC	p-Wert
CELA3A	1p36.12	chymotrypsin-like elastase family, member 3A	0.01	68.53	0.00023
CELA2A	1p36.21	chymotrypsin-like elastase family, member 2A	0.01	70.11	0.00003
CPB1	3q24	carboxypeptidase B1 (tissue)	0.01	73.80	0.00115
ALB	4q11-q13	albumin	0.01	75.32	0.00000
CPA1	7q32	carboxypeptidase A1 (pancreatic)	0.01	75.42	0.00023
REG1B	2p12	regenerating islet-derived 1 beta	0.01	79.70	0.00152
PNLIPRP1	10q25.3	pancreatic lipase-related protein 1	0.01	86.22	0.00000
PNLIP	10q26.1	pancreatic lipase	0.01	87.93	0.00037
CEL	9q34.3	carboxyl ester lipase (bile salt-stimulated lipase)	0.01	94.75	0.00007
PNLIPRP2	10q25.3	pancreatic lipase-related protein 2	0.01	99.38	0.00003
PLA2G1B	12q23-q24.1	phospholipase A2, group IB (pancreas)	0.01	100.01	0.00016
CPA2	7q32	carboxypeptidase A2 (pancreatic)	0.01	107.18	0.00013
GP2	16p12	glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	0.01	128.34	0.00002
CLPS	6pter-p21.1	colipase, pancreatic	0.01	142.22	0.00005

Tabelle 29: Differentielle miRNA-Expression zwischen Proben von Normalgewebe und Tumorproben des Pankreas (FC > 1,5; p < 0,05)

miRNA	Intensität Normal	Intensität Tumor	FC	1/FC	FDR	p-Wert
hsa-miR-31	3.1174355	16.9323531	0.18	5.43	0.013	0.000
hsa-miR-21	3.7477265	15.9706463	0.23	4.26	0.008	0.000
hsa-miR-155	3.2325965	12.3011943	0.26	3.81	0.010	0.000
hsa-miR-34b	2.2653183	8.2022761	0.28	3.62	0.000	0.000
hsa-miR-210	3.0271163	10.5578303	0.29	3.49	0.063	0.007
hsa-miR-199a-3p	7.7412618	26.1165126	0.30	3.37	0.048	0.004
hsa-miR-185	6.5879671	22.1268135	0.30	3.36	0.005	0.000
hsa-miR-146a	2.6095803	8.6803097	0.30	3.33	0.013	0.000
hsa-miR-100	5.8646319	18.1196309	0.32	3.09	0.051	0.005
hsa-miR-199b-3p	8.8375541	26.7273886	0.33	3.02	0.062	0.007
hsa-miR-10a	2.5367571	7.1669337	0.35	2.83	0.013	0.000
hsa-miR-708	2.5062786	6.8088196	0.37	2.72	0.029	0.001
hsa-miR-143	15.5987052	42.3211809	0.37	2.71	0.112	0.019
hsa-miR-106b	5.9643055	15.8643824	0.38	2.66	0.029	0.001
hsa-miR-18a	2.4309305	6.4118836	0.38	2.64	0.037	0.002
hsa-miR-23a	37.2245885	96.8185159	0.38	2.60	0.042	0.004
hsa-miR-103	27.7682239	67.0572713	0.41	2.41	0.007	0.000
hsa-miR-106a	9.8251763	23.5471517	0.42	2.40	0.037	0.002
hsa-miR-214-star	1.7876147	4.2195987	0.42	2.36	0.063	0.007
hsa-miR-130a	4.8824693	11.4561826	0.43	2.35	0.037	0.002
hsa-miR-17	11.9073043	27.2630715	0.44	2.29	0.037	0.002
hsa-miR-20a	9.0592208	20.5347787	0.44	2.27	0.077	0.009
hsa-miR-214	14.1962607	31.8735806	0.45	2.25	0.041	0.003
hsa-miR-27a-star	1.2386969	2.7606156	0.45	2.23	0.005	0.000
hsa-miR-27a	10.0242574	22.1146992	0.45	2.21	0.119	0.020
hsa-miR-199a-5p	10.0795284	22.1433327	0.46	2.20	0.206	0.043

miRNA	Intensität Normal	Intensität Tumor	FC	1/FC	FDR	p-Wert
hsa-miR-34a	6.8405647	15.0133569	0.46	2.19	0.037	0.003
hsa-miR-146b-5p	5.040075	10.8710165	0.46	2.16	0.132	0.023
hsa-miR-95	1.5285738	3.2578144	0.47	2.13	0.005	0.000
hsa-let-7i	14.1813298	30.1703694	0.47	2.13	0.011	0.000
hsa-miR-152	5.2504009	11.0760533	0.47	2.11	0.095	0.013
hsa-miR-221	12.2115782	25.1356576	0.49	2.06	0.060	0.006
hsa-miR-132	6.1539632	12.4735181	0.49	2.03	0.108	0.016
hsa-miR-27b-star	1.702077	3.3698892	0.51	1.98	0.049	0.005
hsa-miR-886-3p	4.0200544	7.9551714	0.51	1.98	0.112	0.018
hsa-miR-107	27.7201879	53.3250313	0.52	1.92	0.010	0.000
hsa-miR-297	1.8149946	3.4856695	0.52	1.92	0.060	0.006
hsa-miR-24	65.3883063	122.512339	0.53	1.87	0.108	0.016
hsa-miR-503	2.4991268	4.671846	0.53	1.87	0.037	0.003
hsa-miR-342-5p	2.7860549	5.1187167	0.54	1.84	0.037	0.002
hsa-miR-424-star	2.7215821	4.9843276	0.55	1.83	0.085	0.011
hsa-miR-342-3p	13.8530914	25.0455798	0.55	1.81	0.017	0.001
hsa-miR-24-2-star	2.2182704	3.9979834	0.55	1.80	0.077	0.009
hsa-miR-378	6.7876584	12.0605452	0.56	1.78	0.146	0.026
hsa-miR-1290	1.2152287	2.1557804	0.56	1.77	0.116	0.019
hsa-miR-143-star	1.9817684	3.471623	0.57	1.75	0.063	0.007
hsa-miR-532-5p	5.1032624	8.9329495	0.57	1.75	0.091	0.012
hsa-miR-595	2.5925163	4.5312261	0.57	1.75	0.037	0.002
hsa-miR-497	5.0059107	8.7467246	0.57	1.75	0.112	0.018
hsa-miR-421	2.0745809	3.6196221	0.57	1.74	0.050	0.005
hsa-miR-425	7.4758373	13.0217006	0.57	1.74	0.035	0.002
hsa-miR-26b	2.9694215	5.1467471	0.58	1.73	0.109	0.017
hsa-miR-362-5p	3.083356	5.3289655	0.58	1.73	0.037	0.003
hsa-miR-629	3.3450936	5.71565	0.59	1.71	0.007	0.000
hsa-miR-222	16.3654945	27.6504715	0.59	1.69	0.112	0.019
hsa-miR-151-3p	5.4194033	9.1563356	0.59	1.69	0.088	0.012
hsa-miR-361-5p	12.4687671	20.520899	0.61	1.65	0.037	0.002
hsa-miR-1299	1.7791956	2.9032026	0.61	1.63	0.191	0.039
hsa-miR-520c-5p	1.8314591	2.9815813	0.61	1.63	0.172	0.033
hsa-miR-542-5p	1.6978347	2.7142633	0.63	1.60	0.163	0.030
hsa-miR-125b-1-star	1.5221651	2.426904	0.63	1.59	0.206	0.043
hsa-miR-505-star	2.4376877	3.8513267	0.63	1.58	0.080	0.010
hsa-miR-548p	1.7035651	2.6652739	0.64	1.56	0.050	0.005
hsa-miR-374a-star	2.1922037	3.4083435	0.64	1.55	0.061	0.006
hsa-miR-593	1.7188308	2.657897	0.65	1.55	0.075	0.009
hsa-miR-324-5p	4.7135679	7.2068638	0.65	1.53	0.063	0.007
hsa-miR-944	1.1429136	1.7447807	0.66	1.53	0.088	0.011
hsa-let-7e	32.1823694	49.0560058	0.66	1.52	0.191	0.039
hsa-miR-660	2.8761124	4.3419253	0.66	1.51	0.037	0.002
hsa-miR-382	4.001291	6.0377977	0.66	1.51	0.106	0.016
hsa-miR-127-5p	1.4598732	2.1983434	0.66	1.51	0.093	0.013

miRNA	Intensität Normal	Intensität Tumor	FC	1/FC	FDR	p-Wert
hsa-miR-1248	2.5268731	1.6816131	1.50	0.67	0.191	0.039
hsa-miR-933	5.3180645	3.4586683	1.54	0.65	0.220	0.047
hsa-miR-378-star	15.5935764	9.9177022	1.57	0.64	0.128	0.022
hsa-miR-92a	43.1091696	27.4138067	1.57	0.64	0.098	0.014
hsa-miR-548i	4.5810449	2.8635836	1.60	0.63	0.037	0.003
hsa-miR-520a-3p	2.1270139	1.3238012	1.61	0.62	0.048	0.004
hsa-miR-182-star	1.9510459	1.2112314	1.61	0.62	0.176	0.034
hsa-miR-1231	4.637496	2.8366509	1.63	0.61	0.112	0.018
hsa-miR-615-5p	2.8568366	1.7441218	1.64	0.61	0.061	0.006
hsa-let-7e-star	3.4758615	2.1081035	1.65	0.61	0.081	0.010
hsa-miR-1228-star	31.7596195	19.2177892	1.65	0.61	0.112	0.018
hsa-miR-148a-star	3.707622	2.2415422	1.65	0.60	0.132	0.023
hsa-miR-367-star	7.9461928	4.7517684	1.67	0.60	0.041	0.003
hsa-miR-1207-5p	16.3944576	9.7364499	1.68	0.59	0.009	0.000
hsa-miR-518d-3p	2.3835745	1.4069087	1.69	0.59	0.037	0.003
hsa-miR-768-5p	51.8598585	29.6843284	1.75	0.57	0.037	0.003
hsa-miR-1268	15.7669137	9.024388	1.75	0.57	0.037	0.003
hsa-miR-494	22.7053766	12.7646913	1.78	0.56	0.027	0.001
hsa-miR-1281	9.7093213	5.3390547	1.82	0.55	0.106	0.016
hsa-miR-339-5p	8.4574579	4.6152579	1.83	0.55	0.042	0.004
hsa-miR-572	6.3164188	3.2242462	1.96	0.51	0.029	0.001
hsa-miR-1229	6.9194285	3.5081137	1.97	0.51	0.037	0.002
hsa-miR-532-3p	12.2796098	6.0556576	2.03	0.49	0.001	0.000
hsa-miR-149-star	42.3040109	19.5863825	2.16	0.46	0.033	0.002
hsa-miR-129-3p	14.2523633	6.5875396	2.16	0.46	0.001	0.000
hsa-miR-193b	24.175018	11.0844428	2.18	0.46	0.029	0.001
hsa-miR-638	78.1203421	33.3998623	2.34	0.43	0.018	0.001
hsa-miR-802	10.3826978	4.3809206	2.37	0.42	0.011	0.000
hsa-miR-1826	280.096769	116.732217	2.40	0.42	0.088	0.012
hsa-miR-1308	27.5400747	11.3229643	2.43	0.41	0.077	0.009
hsa-miR-623	14.8044952	6.0222871	2.46	0.41	0.001	0.000
hsa-miR-431-star	13.9560459	4.8895639	2.85	0.35	0.002	0.000
hsa-miR-936	16.9649867	5.8763689	2.89	0.35	0.001	0.000
hsa-miR-923	190.248793	37.8645227	5.02	0.20	0.002	0.000
hsa-miR-216b	22.3209136	3.6731283	6.08	0.16	0.037	0.003
hsa-miR-217	35.6356188	5.4294907	6.56	0.15	0.109	0.017
hsa-miR-216a	31.1018849	4.0412459	7.70	0.13	0.041	0.003

Tabelle 30: Für die Durchführung der Affymetrix Exon Arrays, sowie die Validierung eingesetzten Patientenproben (mit Angabe der Position auf dem Agarosegel)

Probe	Array Nr.	Geschlecht	Bezugsquelle	TNM	Validierung
Tumor	1	m	Ulm	pT3, pN1, pMx, GIII, R1	
Tumor	2	w	Ulm	pT3, N1b, M0, R0, GII	Spur 1
Tumor	3	w	Ulm	pT3, pN1b, pMx, G1, R0	Spur 2
Tumor	4	w	Ulm	pT2, pN1, M0, G3	Spur 3
Tumor	5	m	Ulm	R pT3, R pN0, R pMX, GIII, R0	
Tumor	6	w	Ulm	pT3, pN1, pM1(HEP), GIII	Spur 4
Tumor	7	m	Ulm	pT3, pN1, pMx, pV1, G III, R0	Spur 5
Tumor	8	m	Ulm	T2, N1b, M0, R0, GI-III	Spur 6
Tumor	9	m	Ulm	pT3, N1, Mx, R0, G II	
Tumor	10	m	Ulm	pT3, N1b, M0	
Tumor	11	w	Ulm	pT3, pN1a, M0, G2, R0	Spur 7
Tumor	12	m	Ulm	pT1, pN0, pMx, G I, R0	Spur 8
Tumor	13	w	Ulm	pT2, pN0, pMx, GII, R0	Spur 9
Tumor	14	w	Ulm	pT3, N1, Mx, V1, L1, R1	
Tumor	15	w	Ulm	pT3, N1, Mx, R0, G I – II	
Nicht-Tumor	A	m	Clontech Lot 8062507A	---	Spur 10
Nicht-Tumor	B	m	Clontech Lot 8081302A	---	Spur 11
Nicht-Tumor	C	m	Stratagene Cat 540023	---	Spur 12
Nicht-Tumor	D	m	BioChain R1234188-50	---	
Nicht-Tumor	E	m	Ambion AM7954	---	
Nicht-Tumor	---	n/a	Affymetrix Pancreas A*	---	---

*) Daten eines Affymetrix Exon Array von Normalgewebe des Pankreas wurden von der Affymetrix-Webseite (www.affymetrix.com) bezogen.

Tabelle 31: TOP 100 durch oneChannelGUI (1.10.7; R 2.9.1) detektierte Spleiß-Varianten (MIDAS $p < 0,05$; SI $> 0,5$)

Probeset ID	Transkript Cluster ID	Gen	Cytobande	p-Wert
3320764	3320717	MICAL2	11p15.3	0.003
3930428	3930360	RUNX1	21q22.12	0.006
3193627	3193482	COL5A1	9q34.3	0.007
3655818	3655806	TMEM219	16p11.2	0.007
2568694	2568687	FHL2	2q12.2	0.007
3694754	3694657	CDH11	16q21	0.007
3110331	3110317	CTHRC1	8q22.3	0.008
3428292	3428268	GAS2L3	12q23.2	0.008
3102380	3102372	SULF1	8q13.2	0.008
3944417	3944404	APOL1	22q13.1	0.008
3193619	3193482	COL5A1	9q34.3	0.008
2870918	2870889	C5orf13	5q22.1	0.009
2570197	2570193	MALL	2q13	0.009
2343493	2343473	IFI44L	1p31.1	0.009
3930427	3930360	RUNX1	21q22.12	0.009

Probeset ID	Transkript Cluster ID	Gen	Cytobande	p-Wert
3762258	3762198	COL1A1	17q22	0.010
2756969	2756965	SPON2	4p16.3	0.010
3945243	3945225	MAFF	22q13.1	0.010
2509762	2509740	MBD5	2q23.1	0.010
3385065	3385042	SYTL2	11q14.2	0.010
2496745	2496727	MAP4K4	2q12.1	0.010
2448391	2448382	PTGS2	1q31.1	0.010
3512297	3512294	TSC22D1	13q14.12	0.010
3193505	3193482	COL5A1	9q34.3	0.010
3684497	3684486	IGSF6	16p12.2	0.010
3930438	3930360	RUNX1	21q22.12	0.011
2664747	2664640	RFTN1	3p24.3	0.011
2525343	2525272	PIKFYVE	2q34	0.011
2987656	2987632	TTYH3	7p22.2	0.011
2813427	2813414	CCNB1	5q13.2	0.011
3119682	3119656	GSDMD	8q24.3	0.011
2611938	2611848	SLC6A6	3p25.1	0.011
3694705	3694657	CDH11	16q21	0.011
3694698	3694657	CDH11	16q21	0.011
3864660	3864646	KCNN4	19q13.2	0.011
3193626	3193482	COL5A1	9q34.3	0.011
3944411	3944404	APOL1	22q13.1	0.011
3193601	3193482	COL5A1	9q34.3	0.011
3422474	3422458	TRHDE	12q21.1	0.011
3824044	3823982	MYO9B	19p13.11	0.011
2756988	2756965	SPON2	4p16.3	0.011
3979801	3979762	HEPH	Xq12	0.011
3726316	3726298	TMEM92	17q22	0.012
3662462	3662444	NLRC5	16q21	0.012
3864434	3864430	ETHE1	19q13.2	0.012
3960065	3960061	RAC2	22q13.1	0.012
3930373	3930360	RUNX1	21q22.12	0.012
3193506	3193482	COL5A1	9q34.3	0.012
3373848	3373845	SLC43A3	11q12.1	0.012
2487218	2487082	ANTXR1	2p14	0.012
3652926	3652902	SCNN1B	16p12.1	0.012
2739370	2739308	EGF	4q25	0.012
3939495	3939470	MMP11	22q11.23	0.012
3219853	3219788	EPB41L4B	9q31.3	0.012
2591649	2591643	COL5A2	2q32.2	0.012
2611940	2611848	SLC6A6	3p25.1	0.012
2591675	2591643	COL5A2	2q32.2	0.012
3339015	3338968	NADSYN1	11q13.4	0.012
2591713	2591643	COL5A2	2q32.2	0.012
2539778	2539765	ITGB1BP1	2p25.1	0.013

Probeset ID	Transkript Cluster ID	Gen	Cytobande	p-Wert
3102450	3102372	SULF1	8q13.2	0.013
3735176	3735151	ITGB4	17q25.3	0.013
3623043	3623031	FBN1	15q21.2	0.013
3718557	3718555	SLFN5	17q12	0.013
3316856	3316834	BRSK2	11p15.5	0.013
2591722	2591643	COL5A2	2q32.2	0.013
2931638	2931569	AKAP12	6q25.1	0.013
2999791	2999755	AEBP1	7p13	0.013
3013077	3013054	COL1A2	7q21.3	0.013
3133256	3133233	PLAT	8p11.21	0.013
2448394	2448382	PTGS2	1q31.1	0.013
3102407	3102372	SULF1	8q13.2	0.013
3549594	3549575	IFI27	14q32.13	0.013
2591702	2591643	COL5A2	2q32.2	0.013
3762200	3762198	COL1A1	17q22	0.013
3922154	3922100	MX1	21q22.3	0.013
3894205	3894194	TBC1D20	20p13	0.013
2591667	2591643	COL5A2	2q32.2	0.013
3300643	3300597	MYOF	10q23.33	0.014
3863040	3863021	TGFB1	19q13.12	0.014
3422493	3422458	TRHDE	12q21.1	0.014
2948525	2948522	KIAA1949	6p21.33	0.014
3013135	3013054	COL1A2	7q21.3	0.014
3942362	3942350	SEC14L2 /// MTP18	22q12.3	0.014
3995635	3995633	BGN	Xq28	0.014
3102465	3102372	SULF1	8q13.2	0.014
2775025	2774971	ANTXR2	4q21.21	0.014
3320752	3320717	MICAL2	11p15.3	0.014
3863678	3863669	CEACAM1	19q13.13	0.014
3214866	3214845	ASPN	9q22.31	0.014
3836325	3836317	VASP	19q13.2	0.014
3102463	3102372	SULF1	8q13.2	0.014
2519607	2519577	COL3A1	2q32.2	0.014
3378824	3378818	PTPRCAP	11q13.2	0.014
2403265	2403261	IFI6	1p35.3	0.014
3834088	3834046	AXL	19q13.12	0.014
3762263	3762198	COL1A1	17q22	0.014
3329359	3329343	MDK	11p11.2	0.014
3863553	3863547	ERF	19q13.12	0.014
3041882	3041875	OSBPL3	7p15.3	0.014

Tabelle 32: TOP 100 durch easyExon (1.0.4) vorhergesagte Spleiß-Ereignisse (MIDAS p < 0,05, PAC < 0,5)

Transkript ID	Beschreibung	Gen	p-Wert
3320717	microtubule associated monoxygenase, calponin and LIM domain containing 2	MICAL2	0.003
2509740	methyl-CpG binding domain protein 5	MBD5	0.004
3422458	thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme	TRHDE	0.006
3102372	sulfatase 1	SULF1	0.006
3110317	collagen triple helix repeat containing 1	CTHRC1	0.006
2648074	arylacetamide deacetylase (esterase)	AADAC	0.007
2664640	raftlin, lipid raft linker 1	RFTN1	0.007
3125993	fibrinogen-like 1	FGL1	0.008
3960061	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	RAC2	0.008
3694657	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	CDH11	0.009
3762198	collagen, type I, alpha 1	COL1A1	0.009
2568687	four and a half LIM domains 2	FHL2	0.009
2739308	epidermal growth factor (beta-urogastrone)	EGF	0.009
3511698	epithelial stromal interaction 1 (breast)	EPSTI1	0.010
3930360	runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene)	RUNX1	0.010
3652902	sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta (Liddle syndrome)	SCNN1B	0.010
2421995	guanylate binding protein 4	GBP4	0.010
3664843	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3	CMTM3	0.010
3432514	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	OAS2	0.010
3373845	solute carrier family 43, member 3	SLC43A3	0.010
2900974	major histocompatibility complex, class I, F	HLA-F	0.010
2987632	tweety homolog 3 (Drosophila)	TTYH3	0.010
3219788	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B	EPB41L4B	0.011
3336801	adrenergic, beta, receptor kinase 1	ADRBK1	0.011
3331926	family with sequence similarity 111, member A	FAM111A	0.011
3631397	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	UACA	0.011
3924372	collagen, type VI, alpha 1	COL6A1	0.011
3864430	ethylmalonic encephalopathy 1	ETHE1	0.011
3369366	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	SLC1A2	0.011
3933923	cystathionine-beta-synthase	CBS	0.012
3061438	sterile alpha motif domain containing 9	SAMD9	0.012
3549575	interferon, alpha-inducible protein 27	IFI27	0.012
2421883	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	GBP1	0.012
3863547	Ets2 repressor factor	ERF	0.012
3510066	periostin, osteoblast specific factor	POSTN	0.012
3830925	kin of IRRE like 2 (Drosophila)	KIRREL2	0.012
3830216	FXYD domain containing ion transport regulator 5	FXYD5	0.012
2880292	dihydropyrimidinase-like 3	DPYSL3	0.012
2774971	anthrax toxin receptor 2	ANTXR2	0.012
2611848	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	SLC6A6	0.012
2362351	pyrin and HIN domain family, member 1	PYHIN1	0.012
2731192	albumin	ALB	0.012
2410241	peroxiredoxin 1	PRDX1	0.013
2386747	G protein-coupled receptor 137B	GPR137B	0.013
3250278	hexokinase 1	HK1	0.013
3718555	schlafen family member 5	SLFN5	0.013
3288518	chromosome 10 open reading frame 72	C10orf72	0.013
2421925	guanylate binding protein 7	GBP7	0.013
3329343	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	MDK	0.013
2471316	Gen homolog 1, endonuclease (Drosophila)	GEN1	0.013
2362394	interferon, gamma-inducible protein 16	IFI16	0.013
3133233	plasminogen activator, tissue	PLAT	0.013
2904597	peroxisome proliferator-activated receptor delta	PPARD	0.014
3512294	TSC22 domain family, member 1	TSC22D1	0.014
3014714	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa	ARPC1B	0.014
3863021	transforming growth factor, beta 1	TGFB1	0.014

Transkript ID	Beschreibung	Gen	p-Wert
3232349	phosphofructokinase, platelet	PFKP	0.014
3864646	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4	KCNN4	0.014
3944404	apolipoprotein L, 1	APOL1	0.014
4011844	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	IL2RG	0.014
3759778	Rho GTPase activating protein 27	ARHGAP27	0.014
3770606	hematological and neurological expressed 1	HN1	0.014
2720145	leucine aminopeptidase 3	LAP3	0.014
2343511	interferon-induced protein 44	IFI44	0.014
3995633	biglycan	BGN	0.014
2487082	anthrax toxin receptor 1	ANTXR1	0.015
3488602	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 1	LRCH1	0.015
3854454	bone marrow stromal cell antigen 2	BST2	0.015
3738629	solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	SLC16A3	0.015
2461891	beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2	B3GALNT2	0.015
3863522	glycogen synthase kinase 3 alpha	GSK3A	0.015
2948522	KIAA1949	KIAA1949	0.015
3058759	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	SEMA3C	0.015
3536706	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	LGALS3	0.015
3834046	AXL receptor tyrosine kinase	AXL	0.015
4001850	SH3-domain kinase binding protein 1	SH3KBP1	0.015
2931569	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	AKAP12	0.015
2999755	AE binding protein 1	AEBP1	0.016
3442854	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	SLC2A3	0.016
3601387	promyelocytic leukemia	PML	0.016
3641633	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 17	ADAMTS17	0.016
3119656	gasdermin domain containing 1	GSDMDC1	0.016
3091077	dihydropyrimidinase-like 2	DPYSL2	0.016
2901620	major histocompatibility complex, class I, E	HLA-E	0.016
3407849	chromosome 12 open reading frame 39	C12orf39	0.016
2474568	keratinocyte associated protein 3	KRTCAP3	0.016
3894194	TBC1 domain family, member 20	TBC1D20	0.016
3772719	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	LGALS3BP	0.016
3417500	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 5	SLC39A5	0.016
3502710	transcription factor Dp-1	TFDP1	0.016
3204558	KIAA1539	KIAA1539	0.016
3741769	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	P2RX1	0.016
3061456	sterile alpha motif domain containing 9-like	SAMD9L	0.016
2323774	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	NBL1	0.016
3589141	sprouty-related, EVH1 domain containing 1	SPRED1	0.016
3939470	matrix metallopeptidase 11 (stromelysin 3)	MMP11	0.016
3924041	adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (RED1 homolog rat)	ADARB1	0.016
3783398	desmoglein 1	DSG1	0.016
3457891	glutaminase 2 (liver, mitochondrial)	GLS2	0.016
3922037	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	MX2	0.016

Tabelle 33: Ergebnisse der GoMiner Analyse, die mit Schnittmenge der von oneChannelGUI und easyExon als differentiell gespleißt detektierten Gene, durchgeführt wurde ($p < 0{,}001$)

GO ID	Total	Change	p-Wert	Beschreibung
8305	30	11	<0.0001	integrin complex
5925	41	16	<0.0001	focal adhesion
5924	46	16	<0.0001	cell-substrate adherens junction
30055	50	16	<0.0001	cell-matrix junction
5178	62	19	<0.0001	integrin binding
42098	66	18	<0.0001	T cell proliferation
18108	77	22	<0.0001	peptidyl-tyrosine phosphorylation

GO ID	Total	Change	p-Wert	Beschreibung
18212	79	23	<0.0001	peptidyl-tyrosine modification
43123	84	21	<0.0001	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
8154	86	22	<0.0001	actin polymerization and/or depolymerization
7229	90	31	<0.0001	integrin-mediated signaling pathway
43122	93	23	<0.0001	regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
31252	112	29	<0.0001	leading edge
32403	126	29	<0.0001	protein complex binding
7249	133	28	<0.0001	I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
42110	148	30	<0.0001	T cell activation
9967	167	37	<0.0001	positive regulation of signal transduction
48514	240	42	<0.0001	blood vessel morphogenesis
1944	279	47	<0.0001	vasculature development
30097	304	51	<0.0001	hemopoiesis
5578	311	60	<0.0001	proteinaceous extracellular matrix
48646	313	52	<0.0001	anatomical structure formation
31012	318	61	<0.0001	extracellular matrix
3779	319	56	<0.0001	actin binding
48534	335	54	<0.0001	hemopoietic or lymphoid organ development
7167	407	64	<0.0001	enzyme linked receptor protein signaling pathway
4175	446	67	<0.0001	endopeptidase activity
16477	463	71	<0.0001	cell migration
7243	485	74	<0.0001	protein kinase cascade
42995	499	73	<0.0001	cell projection
50727	38	12	0.0001	regulation of inflammatory response
31347	39	12	0.0001	regulation of defense response
1726	59	16	0.0001	ruffle
30027	63	16	0.0001	lamellipodium
46651	91	21	0.0001	lymphocyte proliferation
32943	91	21	0.0001	mononuclear cell proliferation
5912	95	21	0.0001	adherens junction
51249	103	22	0.0001	regulation of lymphocyte activation
1525	191	35	0.0001	angiogenesis
46982	212	37	0.0001	protein heterodimerization activity
46649	232	39	0.0001	lymphocyte activation
1568	276	45	0.0001	blood vessel development
16564	293	47	0.0001	transcriptional repressor activity
15629	296	48	0.0001	actin cytoskeleton
43085	306	49	0.0001	positive regulation of enzyme activity
30036	326	51	0.0001	actin cytoskeleton organization and biogenesis
30029	346	53	0.0001	actin filament-based process
2520	352	55	0.0001	immune system development
51246	398	59	0.0001	regulation of protein metabolic process
42129	46	13	0.0002	regulation of T cell proliferation
51015	58	15	0.0002	actin filament binding
50863	78	18	0.0002	regulation of T cell activation
30155	86	19	0.0002	regulation of cell adhesion
8200	92	20	0.0002	ion channel inhibitor activity
16248	92	20	0.0002	channel inhibitor activity
4222	111	23	0.0002	metalloendopeptidase activity
8237	196	34	0.0002	metallopeptidase activity
5083	242	40	0.0002	small GTPase regulator activity
7169	267	43	0.0002	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway
45321	268	43	0.0002	leukocyte activation
8047	341	52	0.0002	enzyme activator activity
51345	88	19	0.0003	positive regulation of hydrolase activity
3714	147	27	0.0003	transcription corepressor activity
51056	191	33	0.0003	regulation of small GTPase mediated signal transduction
1775	299	46	0.0003	cell activation
8284	330	50	0.0003	positive regulation of cell proliferation
51261	62	15	0.0004	protein depolymerization

GO ID	Total	Change	p-Wert	Beschreibung
9615	103	21	0.0004	response to virus
50865	110	22	0.0004	regulation of cell activation
42060	186	32	0.0004	wound healing
51336	219	36	0.0004	regulation of hydrolase activity
9986	276	43	0.0004	cell surface
30695	372	54	0.0004	GTPase regulator activity
8064	64	15	0.0005	regulation of actin polymerization and/or depolymerization
42325	84	18	0.0005	regulation of phosphorylation
51239	463	64	0.0005	regulation of multicellular organismal process
51283	13	6	0.0006	negative regulation of sequestering of calcium ion
51282	13	6	0.0006	regulation of sequestering of calcium ion
51209	13	6	0.0006	release of sequestered calcium ion into cytosol
7015	100	20	0.0006	actin filament organization
43235	107	21	0.0006	receptor complex
7160	107	21	0.0006	cell-matrix adhesion
50767	107	21	0.0006	regulation of neurogenesis
31589	114	22	0.0006	cell-substrate adhesion
16323	114	22	0.0006	basolateral plasma membrane
30042	40	11	0.0007	actin filament depolymerization
50730	47	12	0.0008	regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation
30832	67	15	0.0009	regulation of actin filament length
7507	228	36	0.0009	heart development
9792	270	41	0.0009	embryonic development ending in birth or egg hatching
46983	462	63	0.0009	protein dimerization activity

DANKSAGUNGEN

Ich möchte allen danken, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben.

- Herrn PD Dr. Lars Bullinger danke ich für die Betreuung meiner Dissertation und deren Erstbegutachtung.
- Frau Prof Dr. Hildegard Kehrer-Sawatzki danke ich für die Übernahme der Rolle des zweiten Gutachters.
- Für die Übernahme der Rolle eines Wahlprüfers danke ich Herrn PD Dr. Dieter Kaufmann und Herrn Prof. Dr. Bernhard Eikmanns.
- Meinen Kollegen Karin Lanz, Katja Urlbauer, Juliane Gohlke, Carmen Maile und Stefanie Baumann danke ich für gute Athmosphäre im Labor, die vielen Kuchen und mehrere Zentner an Gummibärchen.
- Auch meinen Kollegen aus anderen Arbeitsgruppen, Stefan Lehnert, Stephen Maier, Eva Görz, Yvonne Koch, Alice Pabst und Conny Fleischer möchte ich für die gute gemeinsame Zeit und die vielen Murphy's-Besuche danken. Ein zusätzlicher Dank geht an Stefan Lehnert für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Meiner Freundin Mareike Swania möchte ich mich für die Unterstützung während der gesamten Promotion, sowie das Korrekturlesen bedanken.
- Der Abteilung für Innere Medizin III danke ich für die Weiterbeschäftigung nach Ablaufen meines SFB518-Vertrages und die Möglichkeit weiter mit Microarrays arbeiten zu können.
- Herrn Dr. Karlheinz Holzmann danke ich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung während meiner gesamten Promotion, die inhaltliche Korrektur dieser Arbeit, die gute Arbeitsathmosphäre und die Möglichkeit in einem sehr gut ausgestatteten Labor mit modernster Technik arbeiten zu können.