



Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Wilko Weichert

**Molekulare, morphologische und Überlebensanalyse von 177
chirurgisch resezierten duktalem Adenokarzinomen des Pankreas
zur Identifikation prognostisch relevanter Subtypen**

Angela Isabel Domenica Segler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Irene Esposito
2. Prof. Dr. Helmut Friess
3. Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 11.02.2019 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.11.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
2	EINLEITUNG	9
2.1	Epidemiologie und Klinik des Pankreaskarzinoms	9
2.2	Risikofaktoren	11
2.3	Pathologische Grundlagen	12
2.4	Molekulare Grundlagen	16
2.4.1	Allgemeine Informationen	16
2.4.2	Funktion der Schlüsselmutationen	18
2.4.3	Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms und Bedeutung der Schlüsselmutationen	26
2.4.4	Schlüsselmutationen in Mausmodellen	28
3	PROBLEMSTELLUNG	30
3.1	Existieren für das PDAC Marker mit prognostischer Relevanz?	30
3.2	Existieren neben den bekannten Varianten des PDACs morphologische Subtypen mit prognostischer Relevanz?	32
3.3	Welche Rolle spielen die Schlüsselmutationen für das PDAC und bestätigen sich die bekannten Zusammenhänge in dieser Arbeit?	32
3.4	In welchem Zusammenhang stehen Morphologie und Genetik des PDACs?	34
4	MATERIAL UND METHODIK	36
4.1	Aufbau des Projektes	36
4.2	Patientenkohorte	38
4.3	Histologische Analysen	38
4.3.1	Material:	38
4.3.2	Methodik:	38
4.4	Molekularpathologische Analysen	40
4.4.1	Immunohistochemische Analysen	41

4.4.2	Manuelle Mikrodisektion von Tumorgewebe	44
4.4.3	DNA Extraktion aus mikrodisektiertem Material	46
4.4.4	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	48
4.4.5	Agarose- Gelelektrophorese	51
4.4.6	Aufreinigung des PCR Produktes	52
4.4.7	Sequenzier-PCR	53
4.4.8	Aufreinigung des Sequenzier-PCR Produktes	55
4.4.9	Sequenzierung	56
4.4.10	Genanalyse mittels <i>Real-time</i> PCR und hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (HRMA)	56
4.4.11	Analyse der P16/ <i>CDKN2A</i> Heterozygotie mittels <i>Real-time</i> PCR und relativer Quantifizierung	59
4.4.12	<i>Next-Generation</i> Sequenzierung	60
4.5	Statistische Auswertung	60
5	ERGEBNISSE	62
5.1	Klinisch-pathologische Daten (Deskriptive Statistik)	62
	Allgemeine Informationen und präoperativer Allgemeinzustand	62
5.1.1	Alter, Geschlecht und präoperativer Allgemeinzustand	64
5.1.2	Erkrankungsspezifische Informationen	64
5.1.3	Durchgeführte Therapien	65
5.2	Histomorphologische Analyse	66
5.3	Molekulare Analysen	72
5.3.1	Übersicht	72
5.3.2	<i>KRAS</i>	72
5.3.3	<i>P16/CDKN2A</i>	74
5.3.4	<i>SMAD4</i>	75
5.3.5	<i>TP53</i>	76
5.3.6	Mutationsanzahl	80
5.3.7	Ergebnisse der <i>Next-Generation</i> Sequenzierung	81
5.3.8	Analyse der Metastasen	81
5.4	Korrelation von Morphologie und Genstatus	84
5.5	Klinisch-pathologische Korrelationen	87
5.5.1	Korrelation von Morphologie und klinischem Verlauf	87
5.5.2	Korrelation von Genetik und klinischem Verlauf	89
5.5.3	Gesamtübersicht der signifikanten Parameter	99

6	DISKUSSION	101
6.1	Individualisierte Medizin für das PDAC?	101
6.1.1	Prognostische Marker für das PDAC	101
6.1.2	Prädiktive Marker für das PDAC	102
6.1.3	Existenz von Subtypen in dieser Studie?	102
6.2	Exististenz und Bedeutung morphologischer Subtypen des PDACs	103
6.2.1	Vergleich der Eigenschaften bekannter Varianten mit der Literatur	106
6.2.2	Das tubuläre Karzinom als neue Variante des PDACs	107
6.3	Verteilung der Schlüsselmutationen und klinische Bedeutung für das PDAC	108
6.3.1	Vergleich der Mutationsraten mit der Literatur	109
6.3.2	Zusammenhänge der Mutationsrate mit Morphologie und Klinik	110
6.3.3	Bedeutung der Verteilung der Mutationen für die Modelle der Karzinogenese	111
6.3.4	Prognostischer Wert und klinische Relevanz von KRAS und P16/CDKN2A	111
6.3.5	Fragliche Relevanz von SMAD4 und TP53	116
7	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	119
8	LITERATURVERZEICHNIS	125
9	DANKSAGUNG	138
10	ZUGEHÖRIGE PUBLIKATION.....	142

1 Abkürzungsverzeichnis

ADM.....	<i>Azinär-duktales Metaplasie</i>
AFL.....	<i>Atypische flache Läsionen</i>
ASA.....	<i>Amerikanische Gesellschaft für Anästhesisten</i>
ATM/ATR.....	<i>ATM Kinase ("Ataxia Telangiectasia Mutated" Enzym)</i>
BRCA2.....	<i>Brustkrebs 2 Gen("Breast cancer 2")</i>
CDKN2A.....	<i>Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A</i>
CEA.....	<i>Karzinembryologisches Antigen</i>
c-Jun.....	<i>Zelluläres Jun</i>
DAB.....	<i>Diaminobenzidin</i>
DNA.....	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
dNTP.....	<i>Nukleosidtriphosphate</i>
EDTA.....	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EGFR.....	<i>Epidermal Wachstumsrezeptor</i>
FAMMM.....	<i>Familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom</i>
FANC.....	<i>Fanconi Anämie, Untergruppe A</i>
FAP.....	<i>Familiäre adenomatöse Polyposis</i>
FFPE	<i>Formalin fixiert und Parafin eingebettet</i>
GAP.....	<i>GTPase-aktivierendes Protein</i>
GDP.....	<i>Guanosindiphosphat</i>
GEF.....	<i>Guanin Nukleotid Austauschfaktor</i>
GTP.....	<i>Guanosintriphosphat</i>
GTPase.....	<i>GTP bindendes Protein</i>
HE.....	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>
HNPCC.....	<i>Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom</i>
HR.....	<i>Hazard Ratio</i>
HRM.....	<i>Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse</i>
IPMN.....	<i>Intraduktale papillär-muzinösen Neoplasie</i>
k.A.....	<i>Keine Angaben</i>
KRAS.....	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma virales Onkogen Homolog</i>
LFLS.....	<i>Li-Fraumeni-like Syndrom</i>
LFS.....	<i>Li-Fraumeni Syndrom</i>

LKB1	Leber Kinase B1
LOH	Verlust der Heterozygotie
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MCN	Muzinös zystische Neoplasie
MEK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase, MAPK/ERK pathway
MLH1	MutL Homolog 1
MRI	Klinikum Rechts der Isar, München
MSH2	MutS Protein homolog 2
MUC1	Mucin 1 Gen
MUC5AC	Mucin 5 AC Gen
Mut	Mutation
MYC	Myelocytomatose-assoziiertes Gen
n.a.	nicht auswertbar
NRAS	Neuroblastom RAS virales Onkogene Homolog
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PAX5	Paired box protein 5
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	Adenokarzinom des Pankreas
RAF	Rattenfibrosarkom Gen ("rapidly accelerated fibrosarcoma")
RAS	Rattensarkom Gen ("Ratsarkoma")
RB	Retinoblastomprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNF43	Ringfinger Protein 43
ROS	Reaktive Sauererstoffspezies
rpm	Runden pro Minute
SBE	SMAD-bindendes Element
SMAD4	"Smad family member 4"
SPSS	Bayesian Statistical Science Section
STK11	Serin/Threonin Kinase 11
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor beta
TNM	TNM Klassifikation der Malignen Tumore ("Classification of Malignant Tumours")

TMA.....	<i>"Tissue-micro-array"</i>
TP53.....	<i>Tumor Protein p53</i>
UICC.....	<i>"Union internationale contre le cancer"</i>
UV.....	<i>Ultraviolett</i>
WHO.....	<i>Welt Gesundheitsorganisation ("World Health Organization")</i>
Wnt.....	<i>"Wingless-related integration Site"</i>

2 Einleitung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist eine aggressive Erkrankung, die mit schlechter Prognose und begrenzten Therapieoptionen einhergeht. Im Mittelpunkt dieser Promotionsarbeit steht die detaillierte morphologische und molekulare Subtypisierung von 177 chirurgisch resezierten PDACs und Korrelation mit den Überlebensdaten der Patienten mit dem Ziel, prognostisch relevante Subgruppen zu identifizieren.

2.1 Epidemiologie und Klinik des Pankreaskarzinoms

Das duktales Pankreaskarzinom ist eine extrem aggressive Erkrankung mit sehr schlechter Prognose. Zahlen demonstrieren dies anschaulich: so beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 6% und liegt selbst für die Minderheit der chirurgisch resektablen Tumoren unter 25% (Spath, Nitsche et al. 2015). Damit stellt das PDAC eine der tödlichsten soliden Krebserkrankungen in den Industrienationen dar (Siegel, Miller et al. 2015). In Deutschland weist es mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 8% sogar die niedrigste Überlebensrate aller soliden Krebserkrankungen auf und ist auf alle Altersgruppen verteilt die vierthäufigste Krebstodesursache (Robert-Koch-Institut 2011/2012, Siegel, Miller et al. 2016).

Trotz neuer Erkenntnisse bezüglich der Therapie und der Diagnostik sind die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten seit Ende der 1990er Jahre nahezu konstant. Hingegen steigt die absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle stetig (Robert-Koch-Institut 2011/2012). Das Pankreaskarzinom machte im Jahr 2012 6,6% der Tumorlokalisationen an allen Neuerkrankungen bei Männern und 8,1% bei Frauen aus. Im Jahr 2012 erkrankten in Deutschland etwa 16.700 Menschen (Robert-Koch-Institut 2011/2012). Männer sind häufiger betroffen als Frauen (1,5:1). Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen 65 und 85 Jahren, Patienten unter 40 Jahren erkranken nur äußerst selten (Klöppel, Sipos et al. 2008, Klimstra and Klöppel 2013).

Gründe für die schlechte Prognose der Erkrankung sind zum einen späte und unspezifische Symptome, welche die Diagnose hinauszögern, und zum anderen die aggressive Tumorbilogie, die durch frühes invasives Wachstum und hohe Metastasierungsraten gekennzeichnet ist (Spath, Nitsche et al. 2015). PDACs

reagieren häufig schlecht auf Chemotherapie und entwickeln Resistenzen, obwohl mittlerweile mit neuen hocheffektiven Therapieregimen gearbeitet wird (Paulson, Tran Cao et al. 2013).

Nur 10-20% der Patienten befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnose in einem Stadium, das die chirurgische Resektion zulässt. Als Kriterien für eine Resektabilität gelten dabei das Fehlen von Fernmetastasen und von Infiltration des Truncus coeliacus und der Arteria mesenterica superior (Spath, Nitsche et al. 2015).

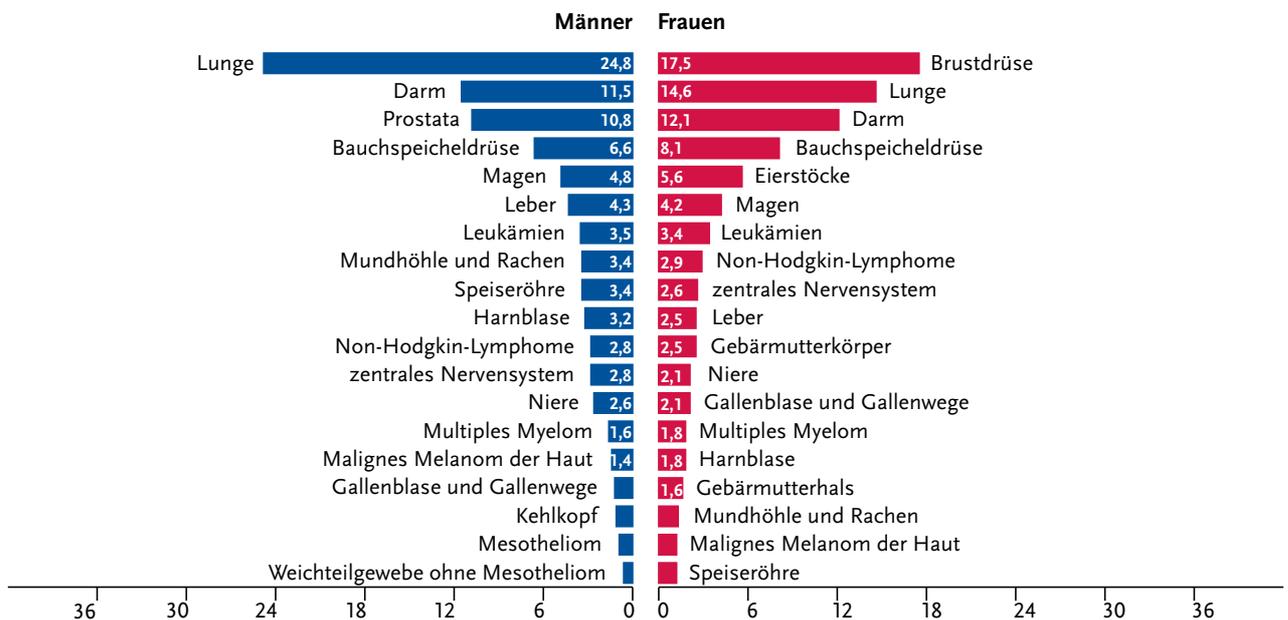


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2012. Originalabbildung aus Krebs in Deutschland 2011/2012 (Robert-Koch-Institut 2011/2012)

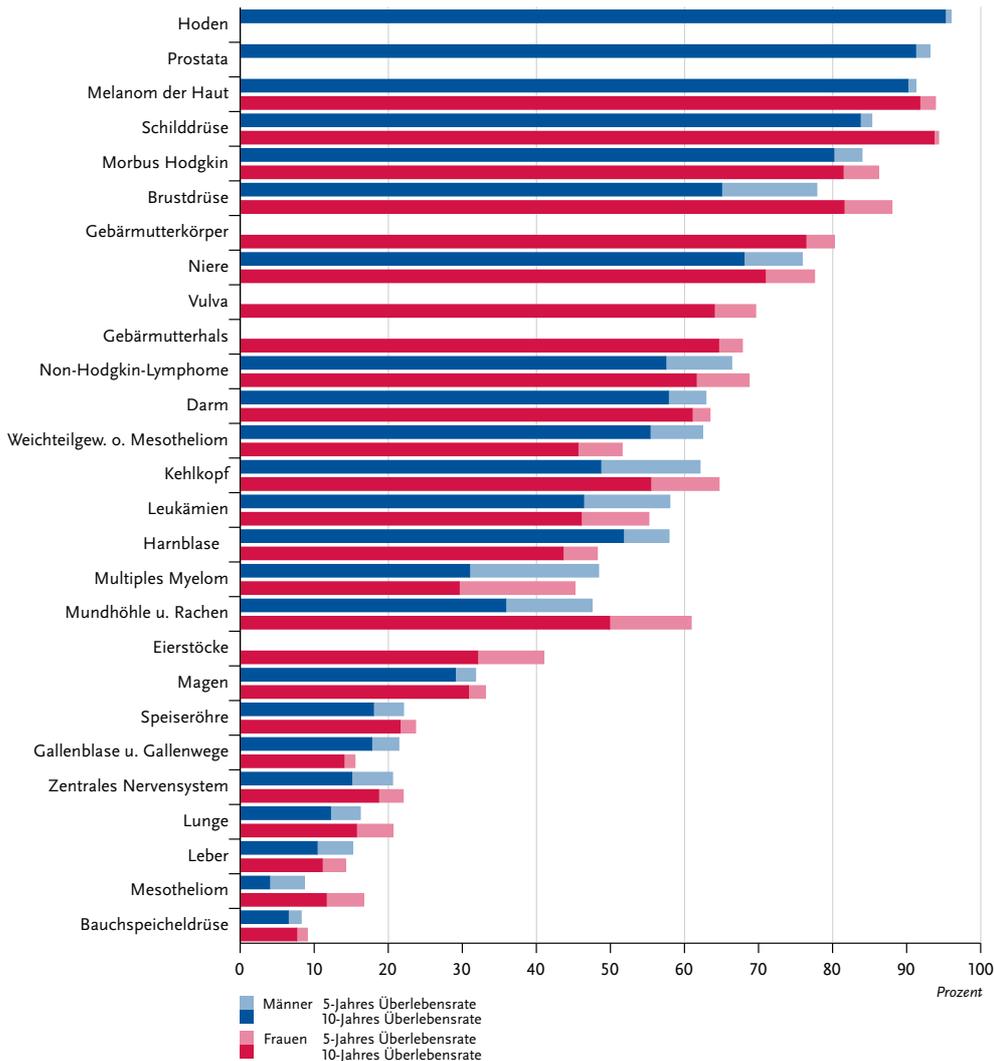


Abbildung 2: Vergleich der relativen 5- und 10-Jahres-Überlebensraten der häufigsten malignen Tumoren nach Lokalisation und Geschlecht, Deutschland 2011 - 2012 (Periodenanalyse). Originalabbildung aus Krebs in Deutschland 2011/2012 (Robert-Koch-Institut 2011/2012)

2.2 Risikofaktoren

Risikofaktoren, die für das Pankreaskarzinom als gesichert gelten, sind Rauchen, Adipositas und der Konsum von Alkohol. Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 und langjährige chronische Pankreatitis erhöhen ebenfalls das Risiko (Robert-Koch-Institut 2011/2012). Es werden auch Zusammenhänge mit anderen lebensstilbezogenen Risikofaktoren vermutet, insbesondere der Verzehr von verarbeiteten Fleischwaren. Dies ist jedoch nicht eindeutig gesichert und wird kontrovers diskutiert. Die Rolle von Umweltfaktoren und/ oder beruflichen

Schadstoffbelastungen ist ebenfalls nicht endgültig geklärt (Koch-Institut 2009/2010, Robert-Koch-Institut 2011/2012) .

Etwa 5-10% der Patienten weisen eine positive Familienanamnese für die Erkrankung auf (Bartsch, Kress et al. 2004). Bei zwei betroffenen Verwandten ersten Grades erhöht sich das Risiko einer Karzinomentwicklung auf das siebenfache (Krejs 2010).

Die Begriffe hereditäres und familiäres Pankreaskarzinom werden in der Literatur teilweise gleichwertig verwendet, was bezüglich ihrer Definition und Bedeutung Verwirrung auslösen kann. Während der Begriff „hereditäres Pankreaskarzinom“ sich auf Pankreaskarzinome von Patienten mit bekanntem genetischen Syndromen bezieht, tritt das „familiäre Pankreaskarzinom“ in Patienten ohne bekannte genetische Syndrome mit mindestens zwei erkrankten Verwandten ersten Grades auf (Esposito, Segler et al. 2015). Für das familiäre Pankreaskarzinom wird ein autosomal dominanter Erbgang vermutet (Bartsch, Dietzel et al. 2013). Des Weiteren ist das Pankreaskarzinom auch mit bekannten genetischen Syndromen assoziiert und wird in diesen Fällen als hereditäres Pankreaskarzinom bezeichnet. Dazu gehören das familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanomsyndrom (FAMMM; Mutation des *CDKN2A*-Gens), das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (Lynch-Syndrom, HNPCC; Defekt der Mismatch-Reparaturgene *MSH2* und *MLH1*), das Li-Fraumeni Syndrom (Defekt in *TP53*), die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP; Mutation im *APC*-Gen), das familiäre Mamma- und Ovarialkarzinom (Mutation im *BRCA1* und *2*-Gen), sowie das Peutz-Jeghers Syndrom (Mutation des *STK11/LKB1*-Gens) (Shi, Hruban et al. 2009, Hruban, Canto et al. 2010, Iacobuzio-Donahue, Velculescu et al. 2012). Außerdem scheint die Blutgruppe einen Effekt auf die Entstehung des Pankreaskarzinoms zu haben. So gehen die Blutgruppen A, B und AB mit einem höheren Erkrankungsrisiko einher (Wolpin, Kraft et al. 2010).

2.3 Pathologische Grundlagen

Die Pathologie stellt eine wichtige Schnittstelle zwischen Grundlagenforschung und Klinik dar. Gewebebasierte Analysen ermöglichen genaue morphologische, molekulare und immunhistochemische Analysen und sind damit essentiell für die abschließende histopathologische Diagnose und korrekte und standardisierte Erhebung prognostisch relevanter Parameter, welche die Grundlage für das weitere

klinische Vorgehen sowie eine erfolgreiche Sammlung und Interpretation von Studienergebnisse darstellt.

Daher wird nun zunächst auf die pathologische Klassifikation der Pankreaskarzinome eingegangen. Wenn über das „Pankreaskarzinom“ gesprochen wird, ist meist das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) gemeint. Das PDAC und seine Varianten machen 85-90% aller Pankreastumore aus und sind damit die häufigste Unterform von Pankreastumoren (Bosman, Carneiro et al. 2010).

Prinzipiell kann jede Zelle eines Organs entarten, so dass daraus eine Krebszelle entsteht. Das Pankreas als Drüse ist ein komplexes Organ, das sowohl endokrine als auch exokrine Funktionen ausübt und daher aus vielen verschiedenen Zellarten besteht.

Der größte Anteil des Pankreas, etwa 85%, besteht aus exokrinem Gewebe und dabei mehrheitlich aus azinären Zellen. Azinäre Zellen produzieren die Proenzyme, welche zur Verdauung von Nahrung notwendig sind. Eben diese Proenzyme werden durch Exozytose in das azinäre Lumen ausgeschüttet, von wo aus sie durch ein komplexes Gangsystem in das Duodenum transportiert werden. Diese Gänge sind mit duktalem Epithel ausgekleidet (Solcia, Capella et al. 1997).

Die Einteilung von Tumoren des Pankreas erfolgt nach der Klassifikation der Welt Gesundheitsorganisation (2010), welche das am weitesten verbreitete und akzeptierte Klassifikationssystem für Tumoren des Pankreas darstellt (Bosman, Carneiro et al. 2010). Darin werden sie nach ihrer Histogenese in epithelial (neuroendokrine und exokrine) und nicht-epithelial eingeteilt und weiter nach ihrem biologischen Verhalten in benigne, prä-maligne und maligne (Bosman, Carneiro et al. 2010). Die meisten Neoplasien des Pankreas (90%), so auch das PDAC, sind sporadisch, epithelial und exokrinen Ursprungs (Solcia, Capella et al. 1997).

Makroskopisch sind PDACs meist zwischen 2,3 – 3 cm große, solide, harte und unscharf begrenzte Tumoren, die vor allem im Pankreaskopf (70%) auftreten (Esposito, Kleeff et al. 2008). Häufig infiltrieren PDACs den intrapankreatischen Teil des Ductus choledochus communis, wobei sie eine Stenose erzeugen, und das peripankreatische Fettgewebe, wo sie entlang von Nervenscheiden wachsen und häufig auch die Arteria mesenterica superior ummauern (Klöppel, Sipos et al. 2008, Klimstra and Klöppel 2013). Neben den peripankreatischen Lymphknoten sind Lymphknotenmetastasen häufig entlang der Abflussgebiete der Arteria coelica und der

Aorta zu finden. Hämatogene Metastasen treten in abnehmender Reihenfolge in Leber, Lunge, Knochen und Nebennieren auf (Klöppel, Sipos et al. 2008, Klimstra and Klöppel 2013).

Histologisch imitiert das PDAC die Form und Funktion, z.B. die Schleimproduktion, der kleinen und mittleren Pankreasgänge. Daher bestehen die meisten PDACs aus deutlich ausgebildeten glandulären oder gang-ähnlichen, duktalem Strukturen. Es kommt oft zu einer starken desmoplastischen Reaktion des Stromas, also des umliegenden Bindegewebes, die mit einer Fibrose des pankreatischen Parenchyms verbunden ist (Hruban and Fukushima 2007). In einzelnen Fällen kann eine Unterscheidung zwischen reaktiven Gangveränderungen und gut differenzierten duktalem Pankreaskarzinomen eine große Herausforderung darstellen. In diesen Fällen können spezifische histopathologische und genetische Eigenschaften für die Unterscheidung zwischen benignen reaktiv veränderten Drüsen und infiltrierenden Adenokarzinomen herangezogen werden. Zu den Kriterien eines invasiven Karzinoms gehören das Wachstum in ungeordneten Strukturen, das Heranwachsen an muskeldurchzogene Arterien und Fettgewebe ohne dazwischenliegendes pankreatisches Parenchym, perineurale Invasion oder starke Kernpleomorphismen (Hruban and Fukushima 2007).

Nicht alle PDAC sehen mikroskopisch klassisch tubulär aus. Es bestehen zahlreiche Varianten, darunter das adenosquamöse, das kolloidale/muzinöse Karzinom, das medulläre und das undifferenzierte Pankreaskarzinom (siehe Tabelle 1).

Für die meisten Zellen des PDAC gilt, dass sie sich mit der PAS Reaktion anfärben lassen und häufig Zytokeratine 7,8,18 und 19, Muzin Marker (MUC1, MUC5AC), CA19-9, Claudin 4 und 18, CEA und meist auch das p53 Protein nukleär stark exprimieren (Klöppel, Sipos et al. 2008, Klimstra and Klöppel 2013).

Wichtigste prognostische Parameter, die durch die histopathologische Untersuchung festgestellt werden, sind der Grad der Differenzierung (G1-3), die Ausbreitung und Metastasierung (TNM Status) und der Status des Resektionsrandes (R-Status) (Schlitter and Esposito 2010, Hartwig, Hackert et al. 2011).

Tabelle 1: Varianten des duktales Adenokarzinoms nach der aktuellen Klassifikation der WHO 2010 (Bosman, Carneiro et al. 2010; Luchini, Capelli et al. 2016)

Variante	Medianes Alter	Geschlechterverteilung	Mittlere Größe	Häufigkeit	Histologie	Typische genetische Veränderungen	Prognose im Vergleich zum klassischen PDAC	Immunhistochemische Marker	Besonderheiten
Adeno-squamöses Karzinom	63 (28-86)	häufiger Männer (m:f 1,5:1,0)	6 cm (groß)	3-4%	glanduläre und plattenepitheliale Komponenten	<i>KRAS</i>	schlecht, aggressives Wachstum	CEA, EMA, squamös: CK5/6, CK13, P63 CD44, glandulär: CK7, CK20, CA19-19, B72.3	Assoziiert mit FAMMM Syndrom
Kolloidales/muzinöses Karzinom	65	Häufiger Männer	4,5 cm	1-3%	Muzin produzierende, neoplastische Zellen schwimmen in extrazellulären Schleimseen	<i>KRAS</i> , <i>TP53</i> , <i>Mikrosatelliten-Stabilität</i>	besser	CEA, CA19-9, MUC2, CDX2, negativ für <i>MUC1</i>	assoziiert mit IPMN vom intestinalen Typ
Medulläres Karzinom	68	Häufiger Männer	weich, gut begrenzt	selten	schlecht differenziert, synzytisches Wachstum, scharf begrenzt	<i>MLH1</i> , <i>MSH1</i> , <i>MSH2</i> , häufig <i>KRAS</i> wt	besser	k.A.	assoziiert mit HNPCC
Undifferenziertes Karzinom	k.A.	Häufiger Männer	9-10 cm (groß)	0,3-10%	undifferenzierte, pleomorphe Zellen	<i>KRAS</i> , <i>TP53</i>	schlecht, aggressives Wachstum	Zyto-keratin, Vimentin <i>MUC1</i> , CEA, CA19-9	k.A.
Hepatoides Karzinom	k.A.	k.A.	groß	wenige bekannte Fälle	hepatozellulär differenzierte Komponente	k.A.	schlechter	CEA, CD10, AFP	k.A.
Siegelring-Zelliges Karzinom	k.A.	k.A.	k.A.	wenige bekannte Fälle	runde, isolierte Zellen mit intra-zellulärem Muzin	k.A.	k.A.	CEA, CK18, MUC1, MUC5A	k.A.

2.4 Molekulare Grundlagen

2.4.1 Allgemeine Informationen

In den letzten Jahren ist es gelungen, Einblicke in die genetische Komplexität des PDACs zu erhalten, die ein tieferes Verständnis der Mechanismen und der Pathogenese ermöglichen und Anhaltspunkte für die Entwicklung neuer Therapien liefern können.

Dabei profitiert auch die Pankreasforschung von den neusten technischen molekularbiologischen Errungenschaften der weltweiten Forschung, wie der Sequenzierung des kompletten menschlichen Genoms oder der Anwendung von Methoden wie der Hochdurchsatz-Sequenzierung (Venter, Adams et al. 2001, Jones, Zhang et al. 2008).

Ein Meilenstein in dieser noch voranschreitenden Entwicklung war die Entdeckung, dass das PDAC von wiederkehrenden Mutationen in den Genen *TP53*, *CDKN2A*, *KRAS* und *SMAD4* geprägt ist, welche eine Art genetischen Fingerabdruck für diese Erkrankung darstellen (Rozenblum, Schutte et al. 1997).

2008 gelang es erstmals durch umfangreiche Sequenzierung des gesamten Exoms von 24 PDACs zwölf Hauptsignalwege zu identifizieren, die bei einem Großteil der Fälle verändert sind. Dazu gehören unter anderem Apoptose, DNA Reparatur Gene, Hedgehog und Wnt/ Notch Signalwege (Jones, Zhang et al. 2008). Interessanterweise unterscheiden sich die betroffenen Gene innerhalb dieser Signalwege zwischen den einzelnen Individuen stark.

Im Schnitt wurden pro Fall 63 Mutationen identifiziert. Von den zahlreichen unterschiedlichen Mutationen treten die meisten insgesamt selten auf und sammeln sich im Verlauf der Karzinogenese an, so dass sie vermutlich keine zentrale Rolle dabei spielen. Die Mutationen von *TP53*, *CDKN2A*, *KRAS* und *SMAD4* treten hingegen häufig auf und sind weit verbreitet. Sie werden daher als Schlüsselmutationen bezeichnet und in direkten Zusammenhang mit der Karzinogenese gesetzt.

Die Entschlüsselung der komplexen Genetik des PDAC hat auch klinische Relevanz. 2011 konnten Collison et al. erstmals zeigen (Collisson, Sadanandam et al. 2011), dass nicht nur verschiedene molekulare Subtypen des PDAC existieren, sondern dass sie diese sich auch in der Prognose unterscheiden und unterschiedlich auf

verschiedene Chemotherapeutika ansprechen. Mittels der kombinierten Analyse der Transkriptionsprofile von primärem Tumorgewebe und Zelllinien von Mäusen und Menschen wurden drei Subtypen definiert und als klassisch, quasi-mesenchymal und exokrin-ähnlich bezeichnet. Die Stratifikation dieser Subtypen ergab, dass Individuen mit klassischem Subtyp signifikant länger überleben als solche mit quasi-mesenchymalem und exokrin-ähnlichen Subtyp.

Weitere Analysen der humanen PDAC Zelllinien legen nahe, dass sich die Subtypen sogar im Ansprechen auf die häufigsten klinisch verwendeten Chemotherapeutika unterscheiden. Zielgerichtete Therapien gegen den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (Erlotinib) wirkten gut im klassischen Subtyp, während der quasi-mesenchymale Subtyp besser auf konventionelle Chemotherapie (Gemcitabine) ansprach. Außerdem zeigte die gezielte Therapie von inaktiviertem *KRAS* in Zelllinien des klassischen und quasi-mesenchymalen Typs mittels RNA Interferenz eine deutlich höhere antiproliferative Wirkung bei klassischen Zelllinien (Collisson, Sadanandam et al. 2011). Dazu passt auch das Ergebnis einer Folgestudie, in der die Inhibierung von *MEK*, einem Zielgen in der Transkriptionskaskade von *KRAS*, und *EGFR* nur beim klassischen und nicht beim quasi-mesenchymalen Subtypen erfolgreich war (Mirzoeva, Collisson et al. 2013). Die klinische Relevanz des exokrin-ähnlichen Subtyps blieb zunächst unklar. Obwohl dieser an Tumorgewebe identifiziert wurde, konnte von den Autoren keine dazu passende Tumorzelllinie gefunden werden, sodass die Möglichkeit der Kontamination mit Normalgewebe des Pankreas bedacht werden muss (Collisson, Sadanandam et al. 2011). In einer 2016 publizierten Arbeit von Noll et al. konnte jedoch an repräsentativem Patientenmaterial für alle von Collisson et al. beschriebenen Subtypen zwei Proteine identifiziert werden (*HNF1A* und *KRT81*), die eine immunhistochemische Klassifizierung der Subtypen ermöglichen (Noll, Eisen et al. 2016).

Für die Existenz dieser Subtypen spricht auch das Ergebnis einer Genomanalyse von über 450 PDACs in einer 2016 publizierten Arbeit von Bailey et al. (Bailey, Chang et al. 2016). Es wurden vier molekulare Subtypen beschrieben, von denen sich interessanterweise bei drei Subtypen eine direkte Überlappung mit den Subtypen von Collisson et al. feststellen lässt mit Ausnahme eines vierten Subtyps mit prominenten Immunzellinfiltraten (sog. „*immunogenic*“ Subtyp). Die Autoren der aktuellen Studie haben die Subtypen allerdings zur Veranschaulichung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen umbenannt (Bezeichnung des „klassischen“ Subtyps als

„*pancreatic progenitor*“, „quasi-mesenchymaler“ Subtyp als „*squamous*“ und „exokrinhähnlich“ als „*ADEX/aberrantly differentiated endocrine exocrine*“).

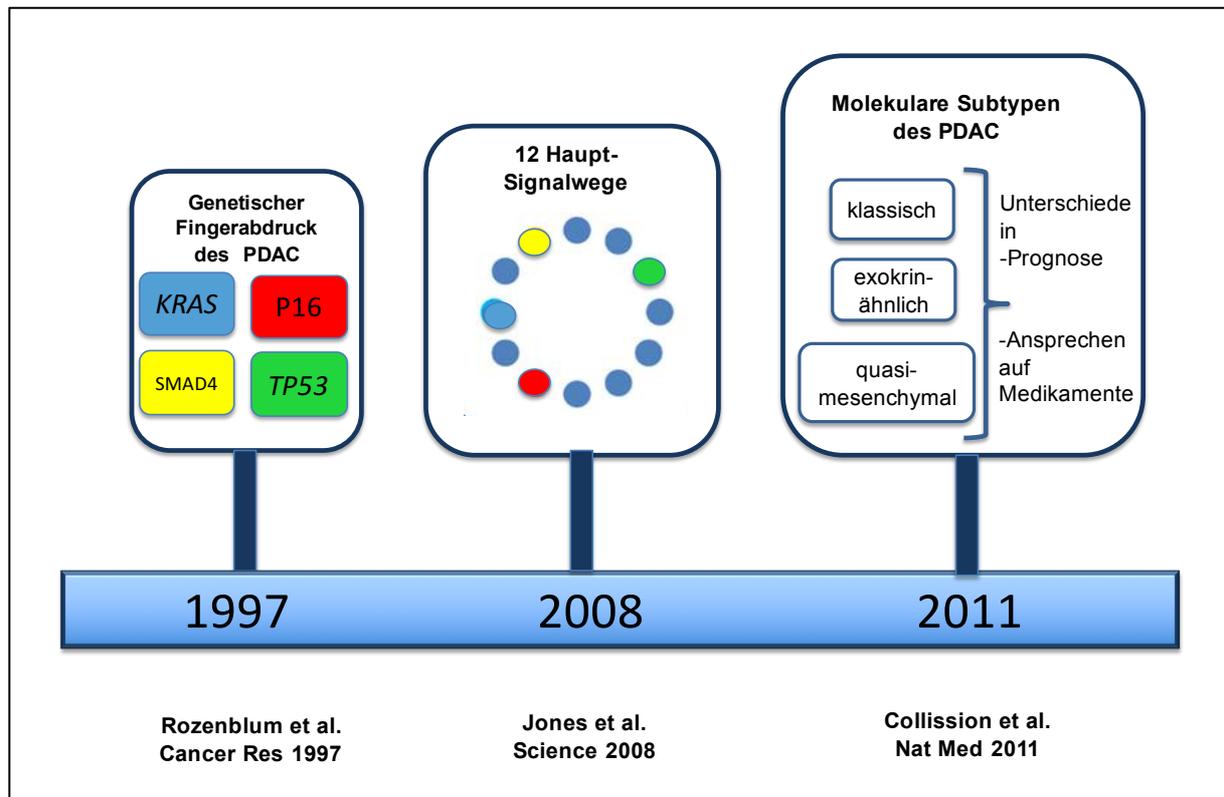


Abbildung 3: Meilensteine der Pankreasbiologie (in Anlehnung an Esposito, Konukiewicz et al. 2014)

Mutationen in *KRAS*, *P16/CDKN2A*, *SMAD4* und *TP53* stellen den molekularen Fingerabdruck des PDACs dar (Rozenblum, Schutte et al. 1997). Globale genomische Analysen des PDACs definieren 12 Hauptsignalwege, die in einer Mehrheit der untersuchten Fälle verändert sind (Jones, Zhang et al. 2008). Drei bestimmte molekulare Subtypen (klassisch, quasi-mesenchymal und exokrinhähnlich) mit prognostischer Relevanz und unterschiedlichem Ansprechen auf Medikamente wurden durch kombinierte Analysen von Transkriptionsprofilen von Primärtumoren und murinen Zelllinien definiert (Collisson, Sadanandam et al. 2011).

2.4.2 Funktion der Schlüsselmutationen

Das Pankreaskarzinom ist eine genetisch komplexe Erkrankung mit vier Schlüsselmutationen: *KRAS*, *P16/CDKN2A*, *SMAD4* und *TP53* (Rozenblum, Schutte et al. 1997, Jones, Zhang et al. 2008). Es handelt sich um bekannte und bedeutende Tumorsuppressor- und Onkogene, die nicht nur für das PDAC, sondern auch für viele andere Krebsarten eine entscheidende Rolle spielen. Durch bestimmte Mechanismen nehmen sie Einfluss auf wichtige Funktionen der Zelle, welche für die Tumorentstehung von großer Bedeutung sind. Im Folgenden wird auf die Funktionen jedes einzelnen Gens eingegangen.

2.4.2.1 Funktion von *KRAS*

KRAS gehört zur Gruppe der *RAS* Onkogene. Die *RAS* Onkogene kodieren für 21kDa schwere GTP-bindende Proteine (GTPasen), die in die Transduktion von Wachstumssignalen innerhalb der Zelle involviert sind, ähnlich den *second messenger* G-Proteinen (McCormick 1995). Dabei werden extrazelluläre Stimuli beispielsweise über transmembranäre Tyrosinkinase-Rezeptoren weitergegeben, die so die GTPasen als intrazelluläre Antwort aktivieren (Rajalingam, Schreck et al. 2007). Beim Austausch von GDP (inaktives Stadium) zu GTP (aktives Stadium) helfen Regulationsproteine, die sogenannten GEFs (Guanin Nukleotid Austauschfaktoren) (Reddy 2001). Die Inaktivierung von *KRAS* wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) vermittelt, welche die Hydrolyse von GTP induzieren (Pylayeva-Gupta, Grabocka et al. 2011).

Aktivierende Mutationen von *KRAS*, die im menschlichen PDACs gefunden wurden, beeinträchtigen die intrinsische GTPase Aktivität des *KRAS* Proteins und können die Interaktion zwischen *KRAS* und GAPs blockieren. Das führt zur konstitutiven Aktivierung von *KRAS* und persistierender Stimulation von *downstream*- Signalwegen, die entscheidende krebsfördernde Wirkungen haben: Proliferationserhalt, metabolische Effekte, Anti-Apoptose, Modulation der Immunantwort und Zellmigration (Pylayeva-Gupta, Grabocka et al. 2011).

Die Aktivierung des *KRAS* Proteins setzt eine komplexe Signalkaskade in Gang, deren Auswirkungen bis heute nicht gänzlich verstanden sind.

Auf die *KRAS* Aktivierung folgt die Aktivierung der mitogen-aktivierten Kinase Kinase Kinase (die *RAF*-Proteine), mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase (MEK-Isoformen) und schließlich die mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) bis hin zur Aktivierung der p90^{msk} Kinase. Als Folge dessen werden zahlreiche Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, darunter TCF/ELK, c-Jun oder MYC, welche in den Zellkern translokalisieren und dort die verstärkte Produktion von Proteinen bewirken, die im Zusammenhang mit Zellwachstum oder -differenzierung stehen. So entsteht beispielsweise vermehrt Cyclin-D1, das durch Komplexbildung mit CDK4/6 das Retinoblastomprotein (RB) phosphoryliert und inaktiviert.

Beispielhaft wird auf die Aktivierung von *KRAS* durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) eingegangen, da dieser Mechanismus für aktuelle Therapieregime besonders relevant ist. Liganden des EGFR Rezeptors binden an die

extrazelluläre Domäne des Rezeptors, was zu Dimerisierung der Rezeptoren und Phosphorylierung der intrazellulären Domäne führt. Die Aktivierung von EGFR führt wiederum zur Aktivierung des Onkogens *KRAS*, was die Onkogene *BRAF*, mitogen-aktivierte Protein Kinase (*MEK*) und mitogen-aktivierte Protein Kinase (*MAPK*) aktiviert und zur Expression von Genen führt, die das Wachstum unterstützen (Eser, Schnieke et al. 2014).

Eine unvermeidbare Folge der kontinuierlichen Stimulation der Zelle durch die Aktivierung von *KRAS* ist die Initiierung von replikativem Stress, der sich in einer erhöhten Anzahl der DNA Replikationsurspünge und folglich teilweise kollabierter Replikationsgabeln manifestiert (Bartkova, Horejsi et al. 2005, Gorgoulis, Vassiliou et al. 2005, Di Micco, Fumagalli et al. 2006, Koorstra, Hong et al. 2009). Dadurch entstehen Schäden an der DNA und es kommt zur Aktivierung der *DNA-Damage-Response*, welche zum irreversiblen Zellzyklus Arrest, der zellulären Seneszenz, führt (Di Micco, Fumagalli et al. 2006). Dieser Mechanismus wirkt eigentlich der Tumorgenese entgegen. Existieren jedoch andere Zellen, die zusätzlich einen Verlust von Kontrollmechanismen der DNA, wie von *TP53*, erlitten haben, erhalten diese so einen starken Selektionsvorteil (Halazonetis, Gorgoulis et al. 2008).

KRAS hat auch Auswirkungen auf molekularen Mechanismen, welche für die Zelladhäsion verantwortlich sind. Die Expression von *KRAS* reduziert das Maß der E-Cadherin Expression durch die Hochregulierung von E-Cadherin Transkriptions-Repressoren (Schmidt, Gi et al. 2005). E-Cadherin ist für den Erhalt der Kontakte zwischen den Zellen wichtig und die dessen Reduktion vereinfacht es den Zellen sich aus dem Verbund zu lösen, was entscheidend für Invasivität und Metastasierung ist.

Das Onkogen *KRAS* kann außerdem direkt mit antiproliferativen Signalen interferieren, indem es TGF- β Signale inhibiert (Kretschmar 1999). TGF- β ist ein potenter Inhibitor des epithelialen Zellwachstums, da über die SMAD4 Signalkaskade Funktionen wie Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest gesteuert werden (siehe Abschnitt Funktion von SMAD4).

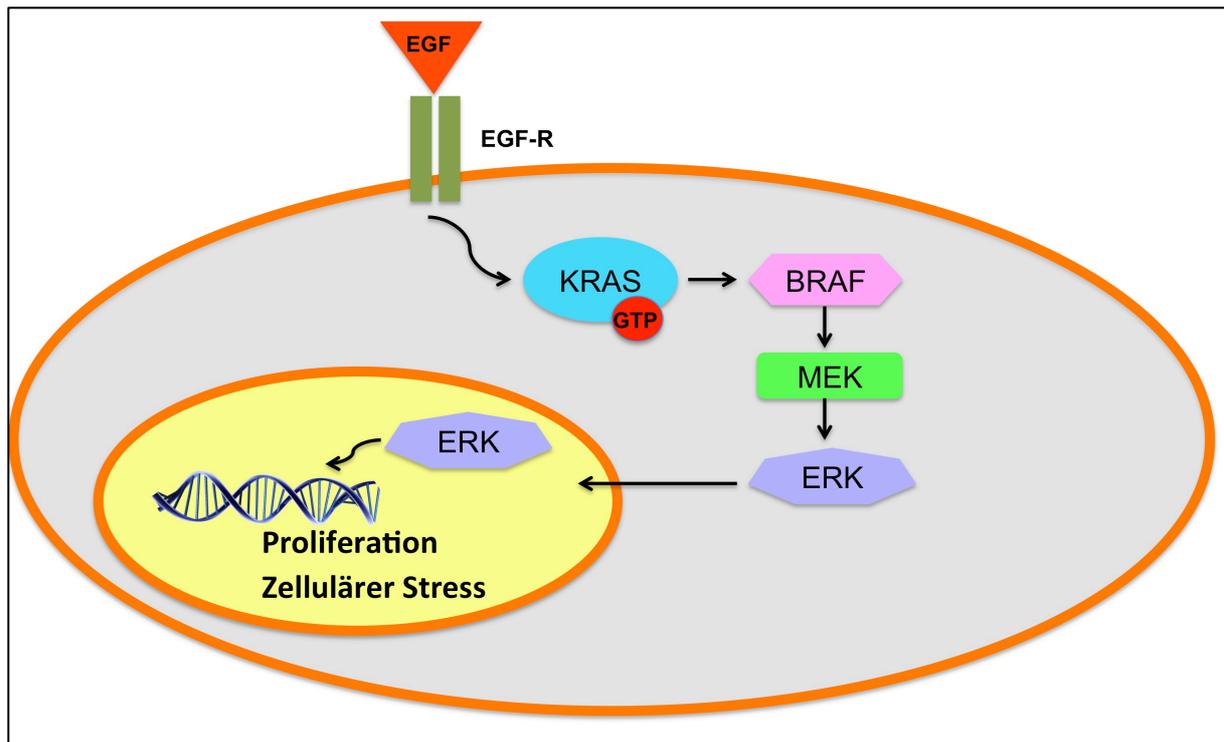


Abbildung 4: Molekularer Mechanismus von KRAS

Liganden des EGFR Rezeptors binden an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, was durch intrazelluläre Mechanismen zur Aktivierung von EGFR führt. Daraus resultiert die Aktivierung der Onkogene *KRAS*, *BRAF*, *MEK* und *MAPK* und schließlich die Expression von wachstumsunterstützenden Genen (Eser 2014). Dies führt zur gesteigerten Proliferation der Zelle und zellulärem Stress.

2.4.2.2 Funktion von P16/*CDKN2A*

Das *CDKN2A* Gen ist auf Chromosom 9p21 kodiert und erhält Informationen für die Produktion verschiedener Proteine, darunter p16 (INK4A) und p14 (ARF) (Krishnamurthy, Torrice et al. 2004, Kotake, Naemura et al. 2015). Beides sind Tumorsuppressoren, das heißt sie verhindern unkontrolliertes Wachstum und Teilung der Zellen.

Das p16 Protein bindet an zwei weitere Proteine, CDK4 und CDK6. Dadurch verhindert p16 die Komplexbildung dieser Proteine mit D-Cyclinen und zählt damit zu den sogenannten CDK4/6 Inhibitoren. Wird der Komplex durch Phosphorylierung aktiviert, führt dies zu einer Inaktivierung von Rb und einer Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F (Lazzerini Denchi, Attwooll et al. 2005, Rayess, Wang et al. 2012). Dieser sorgt durch Proteinexpression für einen Übergang des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase. Damit wird die vermehrte Zellteilung eingeleitet.

Da *CDKN2A* ein rezessives Gen ist, wird für den Verlust des Tumorsuppressorproteins eine Mutation oder Inaktivierung beider Allele benötigt. Dies kann durch drei verschiedene Mechanismen geschehen: Homozygote Deletion mit Verlust beider Allele, Verlust der Heterozygotie (LOH) oder Hypermethylierung. Der LOH tritt ein, wenn ein Allel mutiert während das andere z.B. durch Verlust bereits inaktiviert ist. Bei der Hypermethylierung werden beide Allele durch epigenetische Inaktivierung der jeweiligen Promotorregion nicht transkribiert (Rayess, Wang et al. 2012).

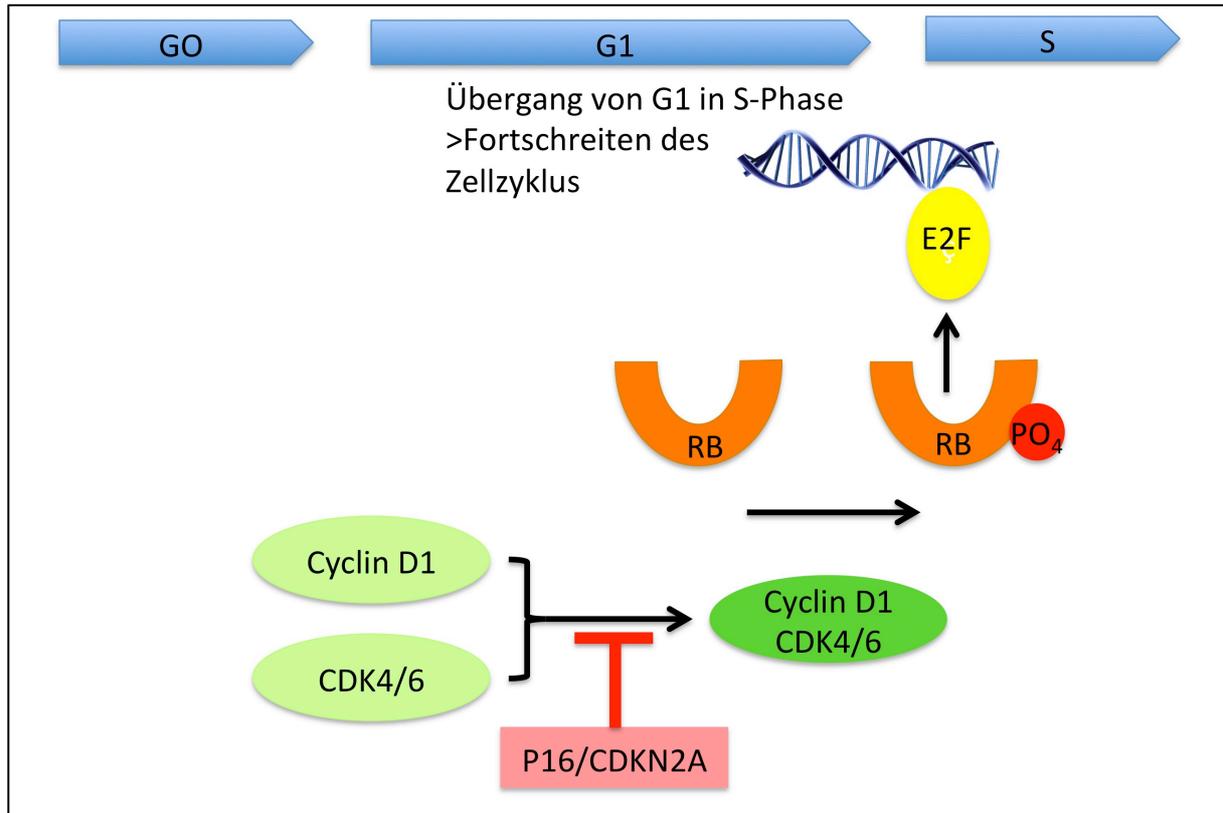


Abbildung 5: Molekularer Mechanismus von P16/CDKN2A

P16/CDKN2A verhindert die Komplexbildung der Proteine CDK4 und CDK6 mit D-Cyclinen. Durch Phosphorylierung des Komplexes wird dieser aktiviert. Daraus resultiert die Inaktivierung von RB und Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, was den Übergang des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase und die vermehrte Zellteilung einleitet. (Lazzerini Denchi, Attwooll et al. 2005, Rayess, Wang et al. 2012).

2.4.2.3 Funktion von SMAD4

Das Gen *SMAD4* wird auf Chromosom 18q21.1 codiert und steht für "*SMAD family member 4.*" Die Proteine der SMAD Familie dienen als interzelluläre Mediatoren des Signalweges über den transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β). Der Signalprozess beginnt mit der Bindung eines TGF- β Zytokins oder eines verwandten Liganden an einen Membran-gebundenen Serin-Tyrosin Kinase Rezeptor auf der

Zelloberfläche. Dies resultiert in einer Phosphorylierung der Rezeptor-regulierten SMAD Proteine SMAD1-3. Die phosphorylierten SMAD Proteine bilden heteromere Komplexe mit SMAD4, welche in den Kern translokalisieren. Dort bindet SMAD4 an eine spezifische DNA Sequenz, das SMAD-bindende Element (SBE), welche als Transkriptions-Faktor fungiert (Lagna, Hata et al. 1996, Derynck and Feng 1997).

TGF- β spielt eine komplexe Rolle in der Tumorgenese. In frühen Stadien unterdrückt es die Karzinogenese, während es in späten Stadien als Tumorpromotor fungiert. TGF- β ist ein potenter Inhibitor des epithelialen Zellwachstums, da über die SMAD4 Signalkaskade Funktionen wie Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest gesteuert werden. Durch Verlust von SMAD4 wird diese Inhibition gestört (Schwarte-Waldhoff, Volpert et al. 2000).

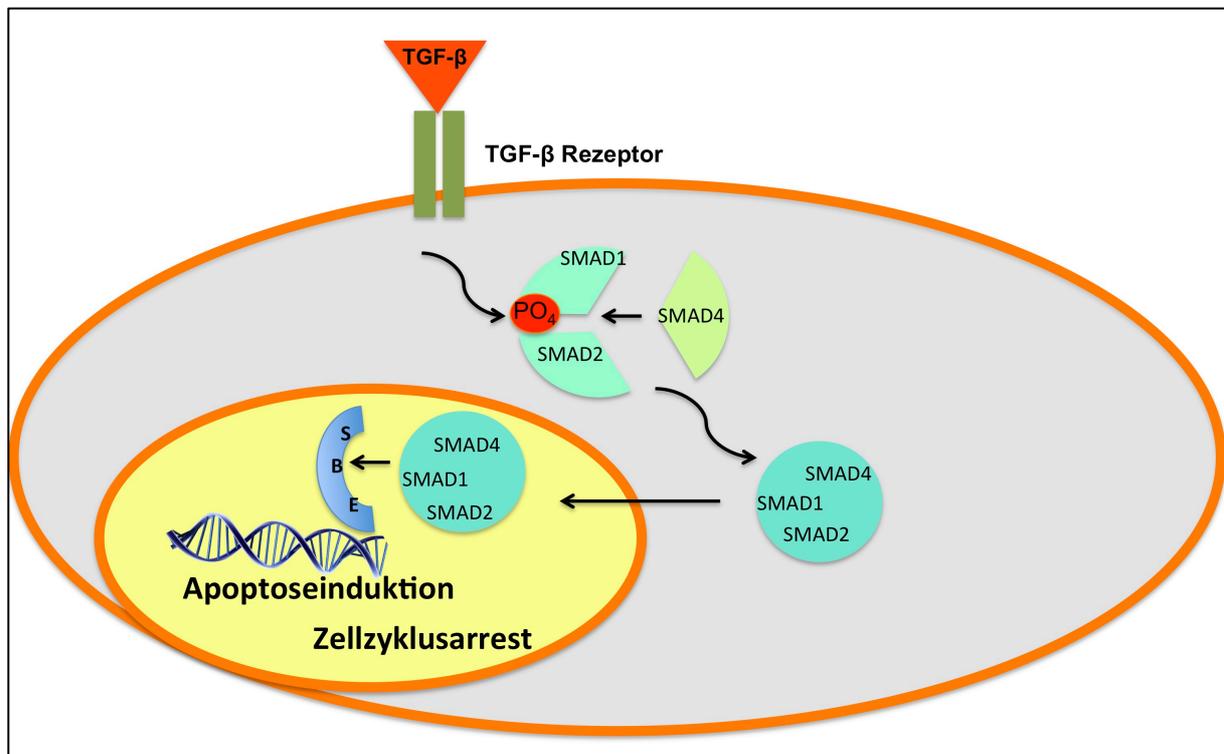


Abbildung 6: Molekularer Mechanismus von SMAD4

TGF- β bewirkt über einen Membran-gebundenen Serin-Tyrosin Kinase Rezeptor die Phosphorylierung der SMAD Proteine SMAD1-3. Diese bilden heteromere Komplexe mit SMAD4, translokalisieren in den Kern und binden dort das SBE als Transkriptions-Faktor (Lagna, Hata et al. 1996, Derynck and Feng 1997). Dieser Mechanismus dient der Inhibition des epithelialen Zellwachstums, wie Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest (Schwarte-Waldhoff, Volpert et al. 2000).

2.4.2.4 Funktion von TP53

Das *TP53* Tumorsuppressorgen liegt auf Chromosom 17p13.1 und kodiert für das TP53 Protein. Dieses Protein fungiert als Transkriptionsfaktor im Kern der Zelle, wo es direkt an die DNA binden kann (Vogelstein, Lane et al. 2000). Es wird als Reaktion auf

verschiedene Formen von zellulärem Stress aktiviert und übt diverse antiproliferative Funktionen aus. Es ist für den Erhalt der genetischen Stabilität verantwortlich und kann bei Schäden der DNA deren Reparatur oder aber die Einleitung der Apoptose der Zelle auslösen (Vogelstein, Lane et al. 2000). Als Reaktion auf zellulären Stress führt die DNA- *Damage- Response* bei einem intakten *TP53* Gen über den ATM/ATR Kinase Signalweg zur Aktivierung von *TP53*, was die zelluläre Seneszenz durch die Expression von p21 und unter anderem durch die Transkription von Pro-Apoptose Proteinen durch die Transkription führt. Daher stellt die Aktivierung von *TP53* einen wichtigen Schritt in der Blockade der Proliferation der beschädigten Zelle dar, welche zu weiteren Schäden führen könnte. In Krebszellen mit inaktiviertem *TP53* führt die Akkumulation von DNA Schäden zur Induktion der zellulären Seneszenz durch ROS (*reactive oxygen species*) vermittelte Expression von p16. Einige Autoren beschreiben P16/*CDKN2A* daher als *backup* Tumor Supressor Gen für *TP53* (Rayess, Wang et al. 2012, Jiang, Hickman et al. 2015).

Somatische *TP53* Mutationen treten häufig bei verschiedenen humanen Krebsformen auf und Keimbahnmutationen sind für ein großes Spektrum an hereditären Krebsformen verantwortlich (Li-Fraumeni (LFS) und Li-Fraumeni-like-syndromes (LFLS)) (Hainaut and Hollstein 2000).

Die meisten Mutationen, die in menschlichen Krebszellen identifiziert wurden, sind *Missense*- Mutationen, welche durch Substitution einzelner Nukleotide entstehen und zu Veränderungen des Proteins in der DNA-bindenden Domäne führen (Hinds, Finlay et al. 1990). Diese mutierten Proteine akkumulieren häufig im Zellkern der Tumorzelle und können dort immunhistochemisch nachgewiesen werden (Sjogren, Inganas et al. 1996). Bei Deletionen, *Nonsense*- oder *Frameshift*- Mutationen ist das Protein p53 abwesend oder instabil und führt daher zu einem Ausfall der immunhistochemischen Reaktion (Wynford-Thomas 1992, Harris and Hollstein 1993, Yachida, White et al. 2012).

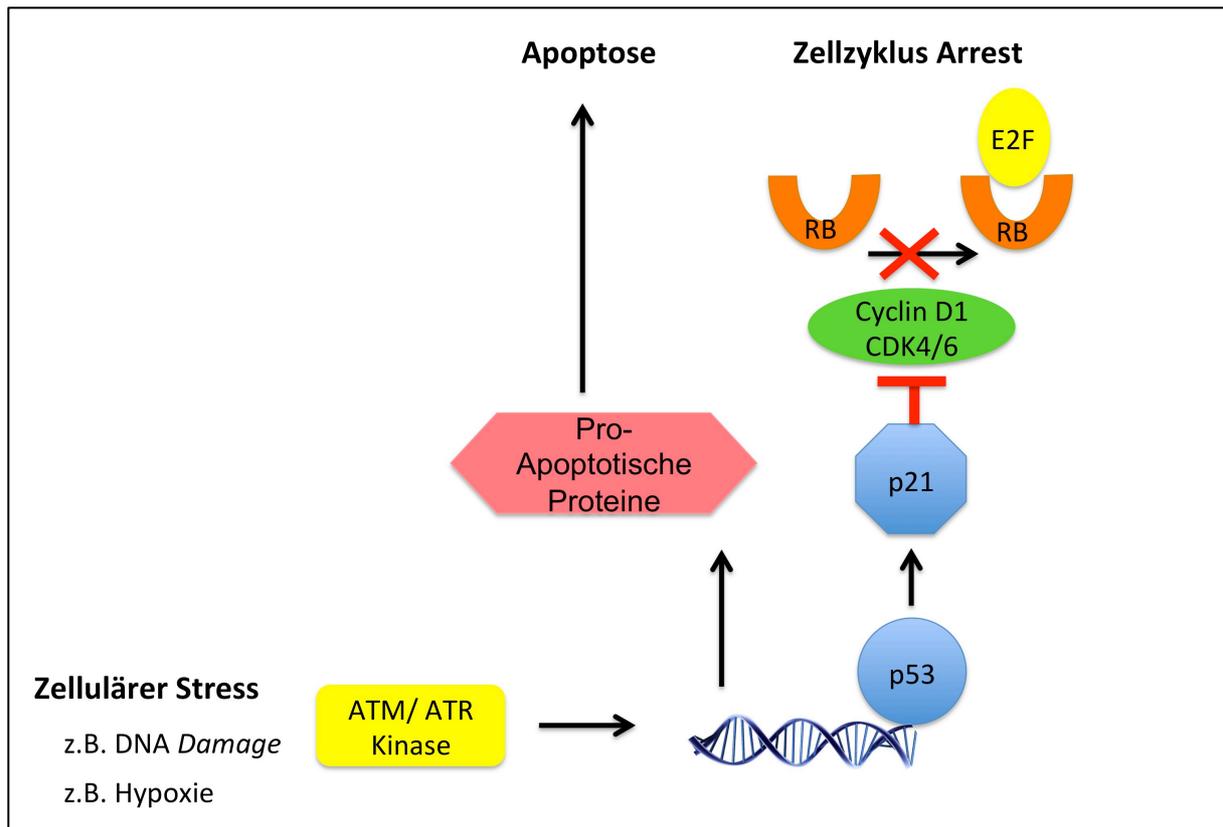


Abbildung 7: Molekularer Mechanismus von TP53

Zellulärer Stress führt über den ATM/ATR Kinase Signalweg zur Aktivierung von *TP53* und Transkription von p21 und Pro-Apoptose Proteinen. P21 inhibiert wiederum z.B die Komplexbildung von Cyclin- D1 und CDK4, verhindert so die Retinoblastom Phosphorylierung und führt zum Zellzyklusarrest. Bei irreperablen DNA Schäden kann alternativ die Apoptose eingeleitet werden.

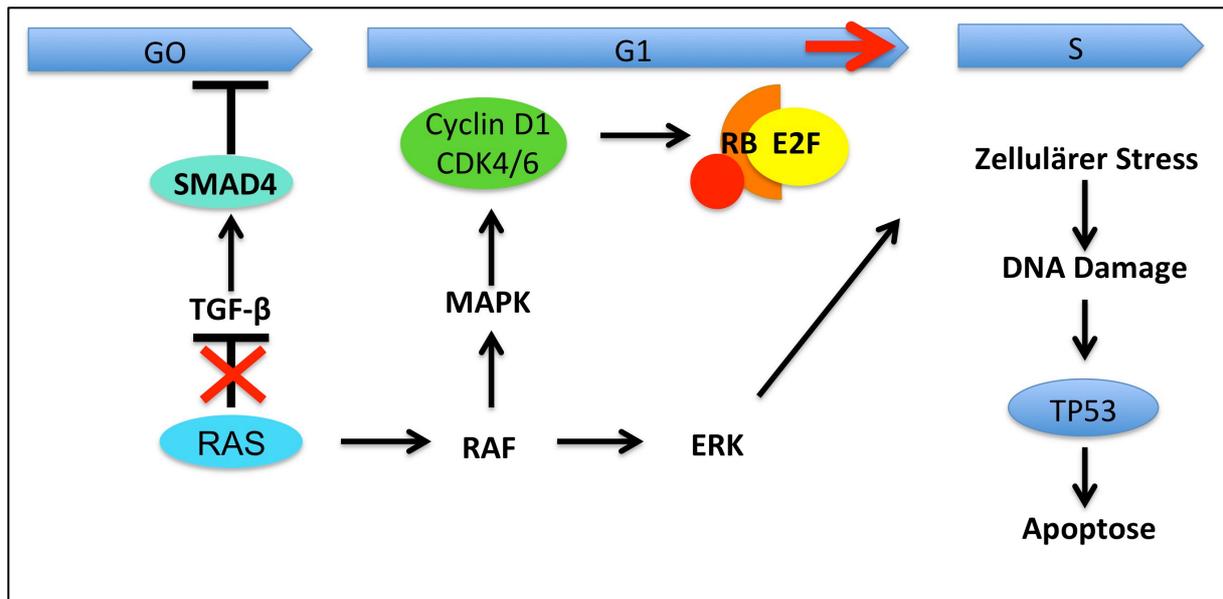


Abbildung 8: Zusammenfassung der Wirkung der vier Schlüsselmutationen

Das Onkogen RAS stimuliert den Austritt aus der G0-Phase des Zellzyklus, die Progression über die G1-Phase und schließlich den Übergang in die S-Phase. RAS induziert die Hochregulierung der Transkription von Wachstumsfaktoren und interferiert mit SMAD4-TGF- β Signalwegen durch die Inhibition der TGF- β Rezeptor Expression oder *downstream* Signalwegen durch die Herunterregulierung der Expression von SMAD3 und der nukleären Akkumulation von SMAD 2 und 3. RAS erhöht außerdem die Spiegel von Cyclin- D1, welches CDK4 und CDK6 aktiviert und damit die RB Phosphorylierung und Freisetzung des RB-E2F Transkriptionsfaktorkomplexes herbeiführt. Dadurch werden verschiedene Gene aktiviert, die zur Zellzyklusprogression und Hyperproliferation führen. Dadurch wird replikativer zellulärer Stress auf die Zelle ausgeübt und es kommt zu DNA Schäden. Die darauffolgende DNA-Damage- Response führt bei intaktem TP53 zu Apoptose und Zellzyklusarrest.

2.4.3 Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms und Bedeutung der Schlüsselmutationen

Durch langjährige Grundlagen- und klinische Forschung sowie die Entwicklung anspruchsvoller genetischer Mausmodelle, welche nahezu dem menschlichen Erkrankungsmodell entsprechen, hat sich unser Verständnis der genetischen Grundlagen und der Karzinogenese des PDACs weitreichend verändert (Esposito, Segler et al. 2015).

Die klassischen und gut charakterisierten Vorläuferläsionen des PDACs zeigen einen duktales Phänotyp, so dass bisher von einem duktales Ursprung dieser Tumoren ausgegangen wurde. Die häufigsten Vorläuferläsionen sind die intraepithelialen Neoplasien des Pankreas (PanIN), gefolgt von der intraduktales papillär-muzinösen Neoplasie (IPMN) und der muzinös zystischen Neoplasie (MCN) (Wood and Hruban 2012). Analog zum Vogelsteinschen Modell über die Adenom-Karzinom Sequenz in

Kolonkarzinomen wird davon ausgegangen, dass sich PanIN Läsionen in einem mehrstufigen Prozess von zunächst niedriggradiger, dann hochgradiger intraepithelialer Neoplasie schließlich zu invasiven Karzinomen entwickeln (Hruban, Goggins et al. 2000, Vogelstein, Papadopoulos et al. 2013). Diese histologische Progression wird von der Ansammlung genetischer Veränderungen begleitet. Mittels moderner Methoden wie Pyrosequenzierung und hochauflösender Schmelzkurven-Analysetechnologie (HRMA) konnte dabei nachgewiesen werden, dass in nahezu allen, selbst frühen Stadien (niedriggradige PanIN) bereits *KRAS* Mutationen vorkommen, gefolgt von *P16/CDKN2A* Mutationen. *SMAD4* und *TP53* Mutationen treten dagegen spät auf und sind auch in hochgradigen PanIN Läsionen selten, so dass ihr Auftreten mit invasivem Wachstum vergesellschaftet ist (mittelgradige und hochgradige intraepitheliale Neoplasien) (Sipos, Frank et al. 2009, Kanda, Matthaei et al. 2012, Zamboni, Hirabayashi et al. 2013, Hosoda, Chianchiano et al. 2017). Ähnlich den PanIN entwickeln sich auch IPMN und MCN zu invasiven PDACs, ebenfalls begleitet von einer stufenweisen molekularen Progression. Die verantwortlichen Gene sind dabei ähnlich bis identisch. In IPMN sind *KRAS* Mutationen ebenfalls frühe Veränderungen. Ihre Anwesenheit korreliert mit dem Grad der Dysplasie und der Invasivität (Lubezky, Ben-Haim et al. 2011, Wood and Hruban 2012). IPMN enthalten zusätzlich noch weitere Mutationen, insbesondere in den Genen *GNAS* oder *RNF43*, durch welche sie sich von PDACs ohne IPMN unterscheiden (Wu, Jiao et al. 2011).

Neue Erkenntnisse aus der Forschung sowohl an Gewebe von Patienten mit familiär gehäuften PDAC als auch an Mausmodellen sprechen dafür, dass PDACs nicht nur aus duktalem Zellen über PanIN oder IPMN als Vorläuferläsionen entsteht, sondern auch aus azinären Zellen. Reife azinäre Zellen können sich über den Mechanismus der azinär-duktalem Metaplasie (ADM) in duktalem Zellen umwandeln (Aichler, Seiler et al. 2012, Esposito, Konukiewitz et al. 2012). So genannte atypische flache Läsionen (AFL) sind mikroskopisch kleine (< 5 mm), überwiegend nicht muzinöse, tubuläre Strukturen, die in Regionen mit lobulozentraler Atrophie in Assoziation mit ADM entstehen und ebenfalls oft Veränderungen in *KRAS* und *P16/CDKN2A* enthalten (Aichler, Seiler et al. 2012, Esposito, Konukiewitz et al. 2012). Diese Entdeckung stützt die Theorie, dass AFL eine weitere Vorläuferläsion des PDACs sind und somit das Bindeglied zwischen ADM und Karzinogenese darstellen.

In der Entwicklung des PDACs aus seinen Vorläuferläsionen spielen also *KRAS*, *P16/CDKN2A*, *SMAD4* und *TP53* eine herausragende Rolle und werden daher auch als Schlüsselmutationen bezeichnet.

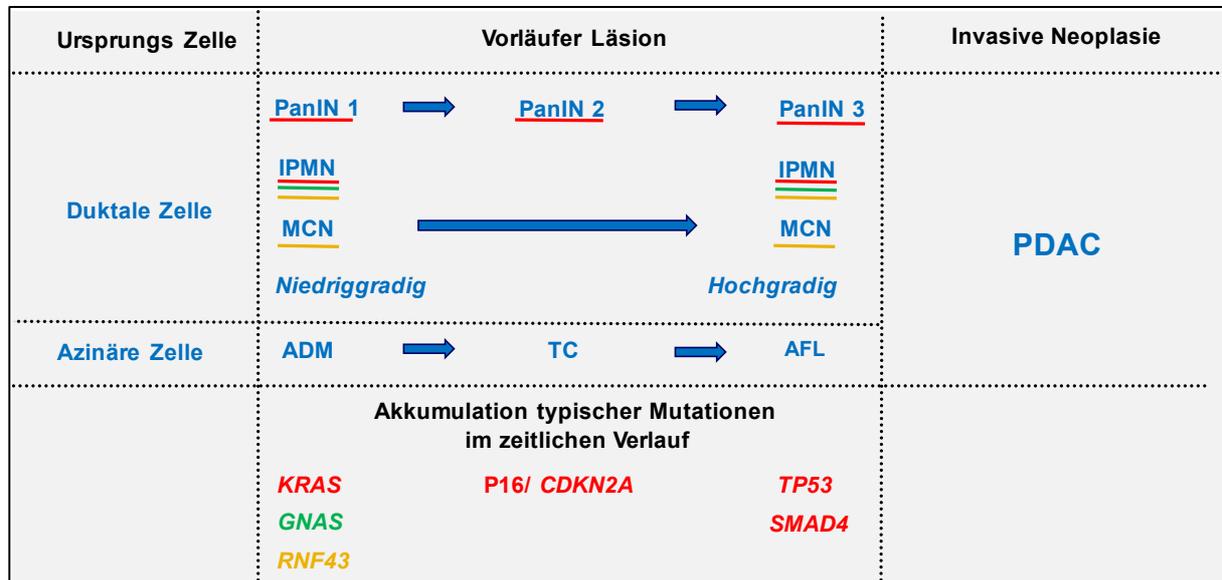


Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung der Entwicklungswege des PDACs über Ursprungszellen und Vorläuferläsionen

Mehrstufige Entwicklung des PDACs aus dukталen Ursprungszellen über die klassischen gut charakterisierten Vorläuferläsionen (PanIN, IPMN, MCN), sowie aus azinären Ursprungszellen über die azinär-duktales Metaplasie und tubuläre Komplexe. Analog zum Vogelsteinschen Modell über die Adenom-Karzinom Sequenz erfolgt die Entwicklung über niedrig- zu hochgradigen Dysplasien bis zur invasiven Neoplasie, welche von der Akkumulation bestimmter Mutationen begleitet wird. Die häufigsten Mutationen sind dargestellt und farbig markiert.

Abbildung nach Informationen aus Hruban, Goggins et al. 2000, Sipos, Frank et al. 2009, Lubezky, Ben-Haim et al. 2011, Wu, Jiao et al. 2011, Aichler, Seiler et al. 2012, Esposito, Konukiewicz et al. 2012, Wood and Hruban 2012.

2.4.4 Schlüsselmutationen in Mausmodellen

Weitere Belege für die Bedeutung dieser Mutationen stammen aus der Forschung an genetischen Mausmodellen. Die Relevanz von *KRAS* als erster Schritt auf dem Weg zur Entartung wurde in Mausmodellen ausführlich dargelegt (Mazur and Siveke 2012, di Magliano and Logsdon 2013). So gelang es hier durch gezielte Veränderung von *KRAS* (p.G12D und p.G12V) ADM, PanINs, IPMNs und AFLs zu erzeugen, welche sich nach langer Latenzzeit zu invasiven Karzinomen entwickelten, was dem menschlichen Erkrankungsmodell damit sehr nahe kommt (Hingorani, Petricoin et al. 2003, Guerra, Schuhmacher et al. 2007, Seidler, Schmidt et al. 2008, Morris, Wang et al. 2010, Pylayeva-Gupta, Grabocka et al. 2011).

Allerdings weist die geringe Häufigkeit der spontanen Progression darauf hin, dass ergänzende genetische Aberrationen benötigt werden (Morris, Wang et al. 2010). In der Tat kann die Entstehung von PanIN und PDACs in *Kras* gesteuerten Mausmodellen durch die gezielte Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *P16/CDKN2A*, *SMAD4* und *TP53* ausgelöst werden, (Jones, Zhang et al. 2008, Morris, Wang et al. 2010, Biankin, Waddell et al. 2012). Kürzlich entwickelte Mausmodelle, in denen mutiertes *Kras* an- und ausgeschaltet werden kann, haben außerdem beeindruckend bewiesen, dass kontinuierliche *Kras* Signale essentiell sowohl für das Wachstum und den Erhalt von invasiven duktalem Pankreaskarzinomen sind (Collins, Bednar et al. 2012, Collins, Brisset et al. 2012, Ying, Kimmelman et al. 2012).

Im induzierbaren *KRAS* **TP53*^{+/-} PDAC- Mausmodell, bei dem es zu einer induzierbaren und reversiblen, gewebespezifischen Expression der *KRAS* Mutation in Kombination mit dem Verlust des Tumor Supressor Gens *TP53* (Collins, Brisset et al. 2012) kommen kann, konnte weiterhin gezeigt werden, dass Pankreaskarzinome nach *Kras* Inaktivierung lange ruhen können, aber nach Reaktivierung zur rapiden Krankheitsprogression neigen und quasi abhängig von *Kras* als Onkogen für die Proliferation erscheinen (Collins, Brisset et al. 2012, Zimmermann, Papke et al. 2013). Erkenntnisse aus diesem Modell machen *KRAS* zu einem führenden und besonders interessanten Zielgen für therapeutische und diagnostische Zwecke.

3 Problemstellung

Das PDAC bleibt trotz intensiver Bemühungen auf dem Gebiet der Pankreasforschung und moderner Therapiekonzepte eine komplexe Erkrankung mit extrem schlechter Prognose. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch die Analyse morphologischer, genetischer und klinischer Daten die Komplexität des Pankreaskarzinoms zu adressieren. Durch die Kombination dieser Daten sollen Informationen über deren Bedeutung für das Pankreaskarzinom gewonnen werden und relevante Zusammenhänge aufgedeckt werden. Im Speziellen sollen dabei vier Fragestellungen bearbeitet werden, die im Folgenden detailliert erörtert werden.

3.1 Existieren für das PDAC Marker mit prognostischer Relevanz?

Das Pankreaskarzinom ist eine aggressive Erkrankung, welche von hohen Metastasierungsraten und häufigen Resistenzen gegen die Chemotherapie geprägt ist (Paulson, Tran Cao et al. 2013, Spath, Nitsche et al. 2015). Die chirurgische Resektion stellt nach wie vor die einzige kurative Therapieoption dar. Dieser Eingriff ist mit perioperativen Risiken behaftet. Die Mortalität beträgt selbst an spezialisierten Zentren 2%. Außerdem leiden 30-40% der Patienten an Komplikationen wie pankreatischen Fisteln oder verzögerter Magenentleerung (DGE) (Hartwig, Vollmer et al. 2014, Donahue and Reber 2015).

In dieser Studie wurden 177 Patienten mit chirurgisch resezierten PDACs eingeschlossen. Auch nach erfolgreicher chirurgischer Resektion verstarben fast 2/3 der Patienten innerhalb von 24 Monaten, wie das in Abbildung 10 dargestellte Gesamtüberleben der hier untersuchten Patientenkohorte aus dem Klinikum rechts der Isar zeigt (Abbildung 10). In anderen Studien ist dieser Wert teilweise noch höher (Jemal, Siegel et al. 2009, Spath, Nitsche et al. 2015). Diese Patienten profitieren somit kaum von den extensiven Therapiemaßnahmen. Dabei befanden sich die Patienten initial alle in einem resektablen Stadium. Ihre Erkrankung war also im Vergleich zu anderen Patienten, die nicht operiert wurden, sogar noch weniger weit fortgeschritten.

Andererseits zeigt die Analyse der Überlebensdaten aber auch, dass es durchaus einen Anteil an Patienten gibt, die durch die Operation länger als 5 Jahre überleben. Derzeit existiert kein prädiktives System, um solche Patienten zu erkennen, obwohl ein solches für Patienten, Ärzte und nicht zuletzt das Gesundheitssystem von großer Bedeutung wäre. Diese Promotionsarbeit soll dazu beitragen, molekulare und morphologische Marker zu finden, die zukünftig prognostische Vorhersagen und somit die Früherkennung von Patienten ermöglichen, die von der chirurgischen Resektion profitieren. Dazu sollen prognostisch relevante Subtypen definiert werden.

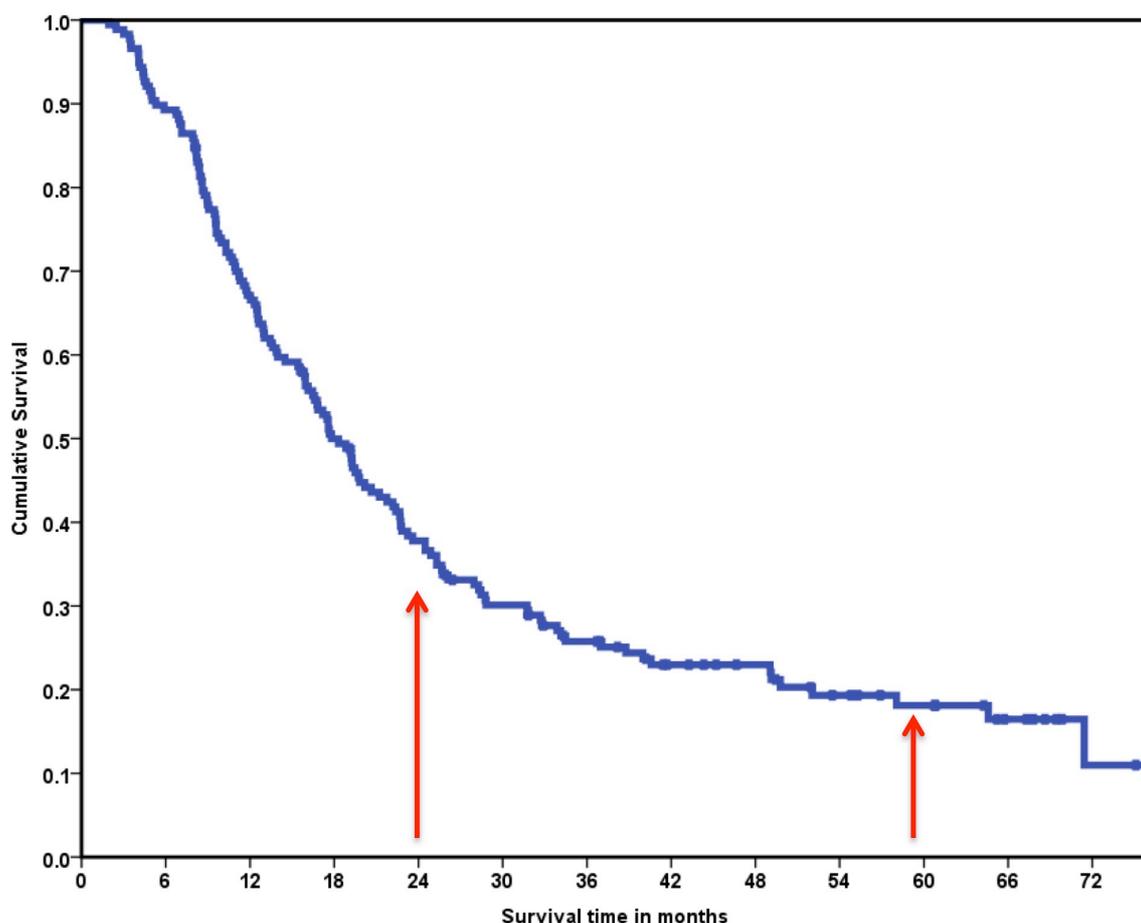


Abbildung 10: Postoperatives Gesamtüberleben von PDAC Patienten nach chirurgischer Resektion am Beispiel der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenkohorte

Postoperatives Überleben der 177 in die Studie eingeschlossenen Patienten. Diese unterzogen sich zwischen 07/2007 und 07/2011 einer chirurgischen Resektion am Klinikum Rechts der Isar. Nach 24 Monaten sind ca. 2/3 verstorben, während andere Patienten deutlich länger überleben.

3.2 Existieren neben den bekannten Varianten des PDACs morphologische Subtypen mit prognostischer Relevanz?

Unter dem Mikroskop betrachtet ist das PDAC von einem heterogenen morphologischen Erscheinungsbild geprägt. Bei 90% der PDACs handelt es sich um duktale Adenokarzinome, die hauptsächlich auch das klassische duktale Wachstumsmuster ausbilden. Jedoch bestehen zahlreiche Wachstumskomponenten, darunter klarzellige, kribriforme, papilläre oder solide Wachstumsformen. Nur 10% der PDACs sind sogenannte Varianten, die sich deutlich von klassischen PDACs unterscheiden (Solcia, Capella et al. 1997). In bestimmten Varianten, wie dem hepatoiden oder adenosquamösen Karzinom, können sich die Zellen teilweise in völlig andere Gewebe umdifferenzieren. Obwohl die Varianten teilweise extrem selten sind, ist die Abgrenzung vom klassischen PDAC wichtig, da sie häufig mit einer unterschiedlichen Prognose assoziiert sind. So haben z.B. das medulläre oder das kolloidale Karzinom als Varianten des PDACs eine deutlich bessere Prognose, während undifferenzierte oder adenosquamöse Karzinome aggressiver wachsen und somit die Prognose negativ beeinflussen (Wilentz, Goggins et al. 2000, Adsay, Pierson et al. 2001, Bosman, Carneiro et al. 2010). Bisher ist nicht bekannt, ob Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Wachstumskomponenten des klassischen duktales Adenokarzinoms und des klinischen Verlaufs der Patienten bestehen. Dabei wird die Morphologie bei der pathologischen Beurteilung der Resektate nach der Operation ohnehin beurteilt und die so gewonnenen Informationen könnten ohne großen Aufwand genutzt werden.

3.3 Welche Rolle spielen die Schlüsselmutationen für das PDAC und bestätigen sich die bekannten Zusammenhänge in dieser Arbeit?

Das PDAC ist eine genetisch komplexe Erkrankung, die im Schnitt 63 verschiedene Mutationen pro individuellem Tumor aufweist (Jones, Zhang et al. 2008). Aus der Vielzahl dieser Veränderungen jene heraus zu filtern, welche relevant für die Erkrankung sind, ist keine leichte Aufgabe. Es hat sich gezeigt, dass die vier

Schlüsselmuationen *KRAS*, *P16/CDKN2A*, *TP53* und *SMAD4* eine besondere Rolle für die Erkrankung spielen. Denn sie stellen den genetischen Fingerabdruck des PDACs dar und sind maßgeblich an der Karzinogenese der Erkrankung beteiligt (Rozenblum, Schutte et al. 1997) (siehe Abschnitt 2.4.3 Vorläuferläsionen des duktaalen Pankreaskarzinoms und Bedeutung der Schlüsselmuationen). Neue Studien belegen sogar, dass Zusammenhänge zwischen den Schlüsselmuationen und dem klinischen Verlauf der Erkrankung bestehen (Lee, Jang et al. 2007, Ogura, Yamao et al. 2013, Shin, Kim et al. 2013, Sinn, Striefler et al. 2014). Dennoch kommen diese Studien teilweise zu uneinheitlichen Ergebnissen und sie betonen die Komplexität des PDACs. In dieser Arbeit erfolgte die molekulare Subtypisierung der PDACs und der Vergleich mit den klinischen Daten der Patientenkohorte. Ziel war es, sowohl neue Zusammenhänge aufzudecken, als auch bestehende Aussagen aus anderen Studien an einer morphologisch und klinisch gut dokumentierten Patientenkohorte zu überprüfen. Es stellt sich die Frage, ob sich die führende Rolle der Schlüsselmuationen für die Tumorbilogie bestätigen lässt und ob diese tatsächlich klinische Relevanz haben, obwohl diese vier Veränderungen nur einen Bruchteil der genetischen Veränderungen innerhalb des durchschnittlichen PDACs ausmachen. Es ist noch anzumerken, dass in dieser Arbeit die immunhistochemische Expression von *SMAD4* als Surrogatmarker des Genstatus getestet wurde, jedoch abschnittsweise kursiv geschrieben wird, wenn es sich um das Gen *SMAD4* handelt.

Interessant ist auch die Verteilung der Mutationen über die Kohorte. Für die Treibermutationen *KRAS*, *P16/CDKN2A*, *TP53* und *SMAD4* werden insgesamt hohe Mutationsraten erwartet. Hinsichtlich der Modelle der Karzinogenese müssten aber nahezu 100% der Karzinome eine *KRAS* Mutation tragen, da diese als sogenannte *First-Hit* Mutation nach dem aktuellen Verständnis quasi Voraussetzung für die Entstehung der Erkrankung ist (Sipos, Frank et al. 2009, Lubezky, Ben-Haim et al. 2011, Kanda, Matthaei et al. 2012). Sollte diese Arbeit wie andere aktuelle Studien eine geringere Mutationsrate errechnen, stellt sich die Frage, ob die Mechanismen der Karzinogenese vollständig verstanden sind und ob ggf. *KRAS* unabhängige Karzinogenesewege existieren (Lee, Jang et al. 2007, Yachida, White et al. 2012, Ogura, Yamao et al. 2013, Oshima, Okano et al. 2013, Shin, Kim et al. 2013, Sinn, Striefler et al. 2014).

3.4 In welchem Zusammenhang stehen Morphologie und Genetik des PDACs?

Sowohl die genetische als auch morphologische Heterogenität des PDACs ist ein bekanntes Phänomen der Erkrankung. Aktuelle Studien befassen sich intensiv mit der genetischen Heterogenität des PDACs und versuchen, Hauptsignalwege sowie klinisch relevante molekulare Marker zu definieren (Collisson, Sadanandam et al. 2011, Yachida, White et al. 2012, Oshima, Okano et al. 2013). Jedoch wurde in all diesen Studien das molekulare Profil des PDACs nicht oder zumindest kaum mit der individuellen Morphologie des Tumors korreliert.

Es bleibt die Frage, ob bestimmte Mutationen mit bestimmten Wachstumsmustern in Zusammenhang stehen und somit andersherum Rückschlüsse schon von der Morphologie auf die Mutationen gezogen werden können. Wenn man davon ausgeht, dass bestimmte Mutationen einen Einfluss auf die Prognose und die Tumorbiologie haben, und wiederum mit bestimmten Wachstumsmustern assoziiert wären, könnte zukünftig die morphologische Beurteilung der Wachstumskomponenten von noch größerer Bedeutung sein. In diesem Projekt wurde von allen Fällen eine detaillierte morphologische Analyse an die Genotypisierung angeschlossen, um Zusammenhänge aufzudecken.

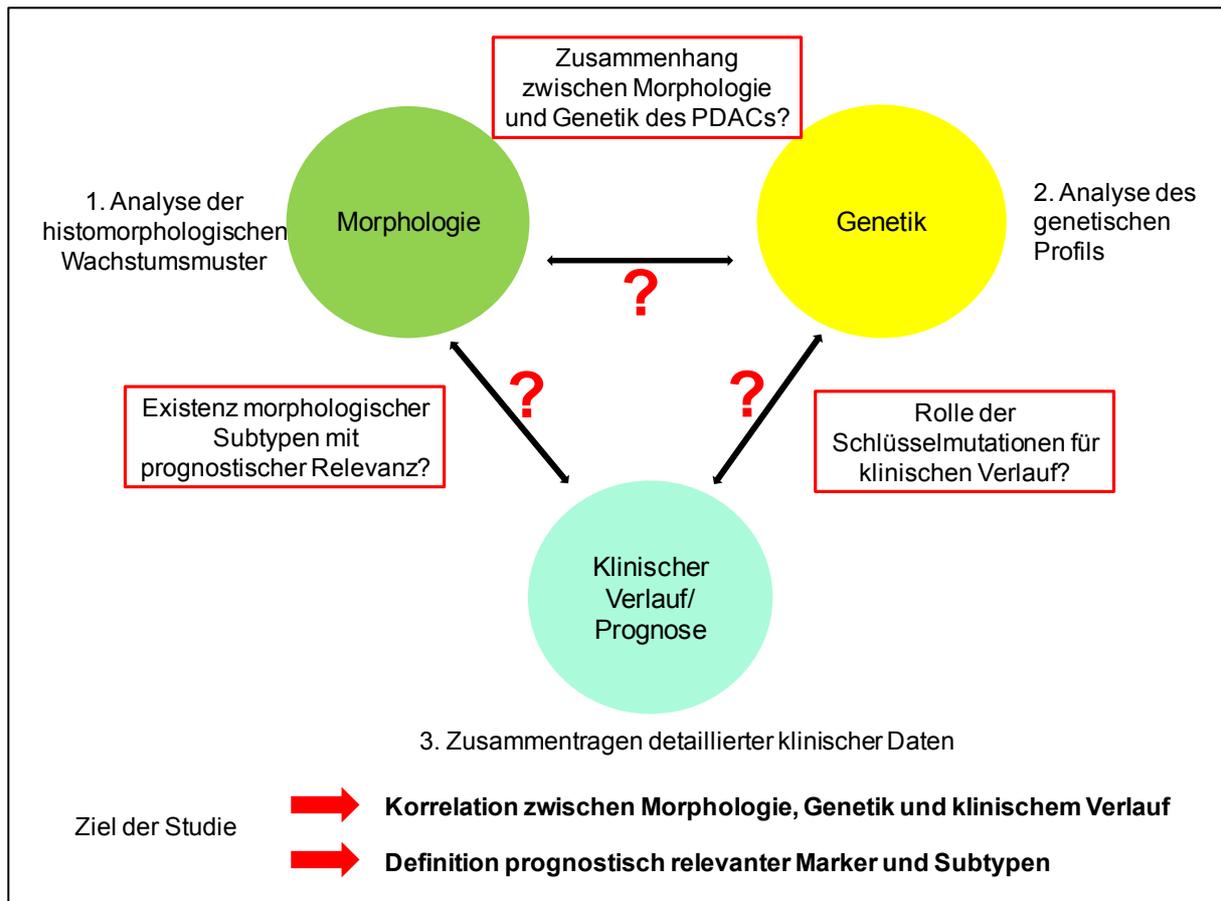


Abbildung 11: Übersicht über die Fragestellungen und Ziele der vorliegenden Studie zur Adressierung der komplexen Tumorbologie des PDACs.

Durch die Analyse morphologischer (1.), genetischer (2.) und klinischer Daten (3.) soll die Komplexität des Pankreaskarzinoms adressiert werden. Dazu wurden die gewonnenen histomorphologischen und genetischen Daten mit dem klinischen Verlauf korreliert mit dem Ziel, prognostisch relevante Subtypen und Marker zu definieren. Im speziellen sollen dabei verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden, die sich mit den Zusammenhängen zwischen den drei Modalitäten (Morphologie, Genetik und klinischer Verlauf) befassen. Die Fragestellungen sind in der Grafik durch rote Kästen markiert.

4 Material und Methodik

4.1 Aufbau des Projektes

Für das Projekt wurden 200 Patienten mit PDAC identifiziert, die sich zwischen 2007 und 2011 einer elektiven chirurgischen Resektion unterzogen haben. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München (München, Deutschland) genehmigte die prospektive Sammlung von Daten und Gewebe, welche die Voraussetzung für dieses Projekt darstellte. Die hier vorgestellte Arbeit erfolgte in interdisziplinärer Kooperation mit zahlreichen beteiligten Wissenschaftlern zwischen dem Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München und der Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Klinikums rechts der Isar, wo die klinischen Daten zusammengetragen und die Patienten betreut wurden (Carsten Jäger, Dr. med. Christoph Michalski). Das Gewebe wurde am Institut für Pathologie untersucht. Die statistischen Analysen wurden gemeinsam durchgeführt.

Dabei standen neben der Histomorphologie vier Schlüsselmutationen im Fokus der Arbeit: *KRAS*, *P16/CDKN2A*, *SMAD4* und *TP53*. Für dieses Projekt wurde das gesamte Material der 200 Patienten erneut von erfahrenen Pathologen und der Doktorandin selbst begutachtet (Prof. Dr. Irene Esposito, Dr. Anna Melissa Schlitter, Dr. Björn Konukiewitz, Angela Segler). TNM Klassifikation und Grading erfolgten nach der WHO Klassifikation (Bosman, Carneiro et al. 2010) und der zum Zeitpunkt der Untersuchungen aktuellen TNM Klassifikation der UICC (7. Auflage) (Sobin, Gospodarowicz et al. 2009). Für 177 dieser Patienten war ausreichend und qualitativ hochwertiges invasives Karzinomgewebe für die genetischen Analysen vorhanden. Pro Fall wurde ein repräsentativer Gewebeblock mit Tumorgewebe ausgewählt, an dem alle nachfolgenden histologischen und genetischen Analysen durchgeführt wurden.

Im Rahmen der vorliegenden Promotion wurden die histomorphologische Analysen, Immunhistochemie, Mikrodissektion, DNA Extraktion, Sequenzierungen nach Sanger, *real-time* PCR und hochauflösende Schmelzkurvenanalysen (HRMA) eigenständig durchgeführt und nach einer Einarbeitung eigenständig ausgewertet. Die Methode der histomorphologischen Analyse wurde dabei selbständig ausgearbeitet und anschließend nochmals mit zwei beteiligten Pathologen (PD Dr. med. Anna Melissa

Schlitter und Prof. Dr. med. Günter Klöppel) diskutiert. Die molekularpathologischen Analysen wurden nach am Institut bereits etablierten Protokollen selbständig durchgeführt und eigenständig ausgewertet. Insgesamt wurden dabei eigenständig insgesamt mehr als 2000 Sequenzen und 700 Schnitte ausgewertet. Unterstützt und angeleitet wurde die Doktorandin durch verschiedene erfahrene Wissenschaftler und Pathologen des Institutes (Prof. Dr. med. Irene Esposito, Prof. Dr. med. Günter Klöppel, PD Dr. med. Anna Melissa Schlitter, Dr. med. Björn Konukiewitz, Dr. vet. med. Katja Steiger, Dr. rer. nat. Marcus Bettstetter). Die Analyse der P16/CDKN2A Heterozygotie erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Ivonne Regel. Die *Next- Generation* Sequenzierung erfolgte durch Herrn Dr. Volker Endris und Frau Nicole Pfarr.

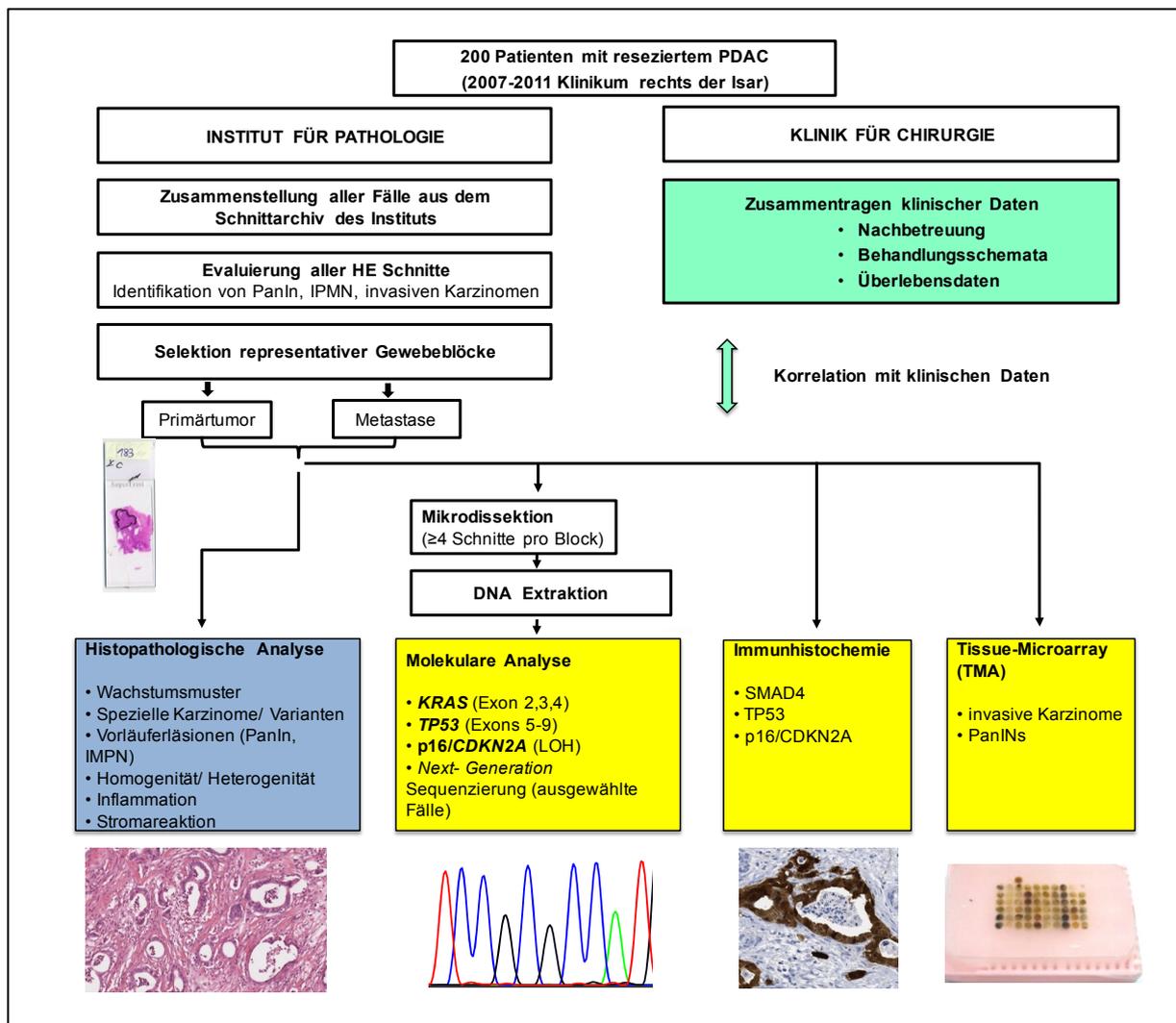


Abbildung 12: Detaillierte Beschreibung der durchgeführten Untersuchungen des hier vorgestellten Projektes.

Übersicht und schematische Darstellung über den Projektaufbau, die Aufgabenverteilung und durchgeführten Untersuchungen. Verschiedene durchgeführte Analysen sind farbig abgegrenzt (hellblau: morphologische Analysen, gelb: genetische Analysen, türkis: Überlebensanalysen (durchgeführt von Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Klinikums rechts der Isar)

4.2 Patientenkohorte

Auf der Basis einer prospektiven Datenbank wurden zwischen Juli 2007 und Juli 2011 200 Patienten mit PDAC identifiziert, bei denen in der Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Klinikums rechts der Isar ein duktales Adenokarzinom des Pankreas elektiv reseziert wurde.

Die Datenbank umfasste klinische, demografische Patientendaten sowie Daten zur Nachsorge. Die *Follow-Up* Daten wurden entweder direkt aus den internen oder externen medizinischen Akten, aus dem Tumorregister oder über direkten Kontakt zu den Patienten selbst oder ihren Verwandten erhoben. Patienten mit Organmetastasen/ UICC Stadium IV (n=11), neoadjuvanter Vorbehandlung (n=11), arterieller Resektion (n=4), perioperativem Tod (n=1) und Rezidivoperationen (n=1) wurden für die Überlebensanalysen ausgeschlossen. Drei Patienten konnten klinisch nicht nachverfolgt werden.

4.3 Histologische Analysen

4.3.1 Material:

- HE (Hämataoxylin und Eosin) gefärbte Schnitte
- Mikroskop

4.3.2 Methodik:

Die Aufbereitung und Diagnostik des Gewebes erfolgte nach bewährten Richtlinien im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München an 3-5 µm dicken Schnitten von in 4% Formaldehyd fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe, sowie mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbtem Gewebe.

Die histologische Analyse der PDACs erfolgte mit konventioneller Mikroskopie an HE-Schnitten des repräsentativen Gewebeblocks. Die Begutachtung der Fälle erfolgte durch die Doktorandin selbst und wurde durch verschiedene erfahrene Pathologen und Mitarbeiter unterstützt (Prof. Dr. Günter Klöppel, PD Dr. Anna Melissa Schlitter, Dr. Katja Steiger). Es wurden sowohl Vorläuferläsionen (PanIN, IPMN) als auch Areale mit invasivem Tumor markiert, wobei die Betreuung und Qualitätskontrolle der Arbeit der Doktorandin durch die drei erfahrenen Pathologen erfolgte. Die Methodik der histologischen Analyse wurde von der Doktorandin selbst mit Unterstützung und

Betreuung der oben genannten Mitarbeiter speziell für diese Arbeit entwickelt und ausgearbeitet, da es bisher keine Arbeiten gibt, welche eine gleichwertige Analyse mit klar definierten morphologischen Definitionen durchgeführt haben. Zur Beschreibung der histologischen Merkmale wurden die in der WHO Klassifikation verwendeten und bewährten Termini verwendet und zum Teil ergänzt (Bosman, Carneiro et al. 2010). Die Zuteilung zu den einzelnen Untergruppen erfolgte nach festgelegten Kriterien.

Die dargebotenen Wachstumsmuster wurden qualitativ nach ihrer Morphologie gemäß der WHO Klassifikation (Bosman, Carneiro et al. 2010) oder in Anlehnung an diese und quantitativ nach ihrem prozentualen Anteil am gesamt Tumor des repräsentativen Schnittes bewertet. Anhand dieser Beurteilung wurden die Fälle entweder als konventionelles duktales Adenokarzinom, als kombiniertes duktales Adenokarzinom oder als Variante/ spezielles Karzinom eingeteilt. Letztere mussten entweder die Kriterien der WHO Klassifikation erfüllen oder ein homogenes, spezifisches Wachstumsmuster (>50% des Gesamttumors) ausprägen, das sich vom klassisch duktales unterschied. Den klassischen PDACs wurden dann weitere Wachstumskomponenten zugeteilt, wenn diese >30% des Gesamttumors ausmachten und sich vom klassisch duktales Wachstum unterschieden. Wenn also >30% des Gesamttumors aus einer bestimmten Wachstumskomponente konzipiert waren, wurde der Fall als kombiniertes PDAC bewertet. Neben den Wachstumsmustern wurden auch weitere Eigenschaften wie erhöhte Muzinproduktion oder inflammatorische Reaktionen vermerkt.

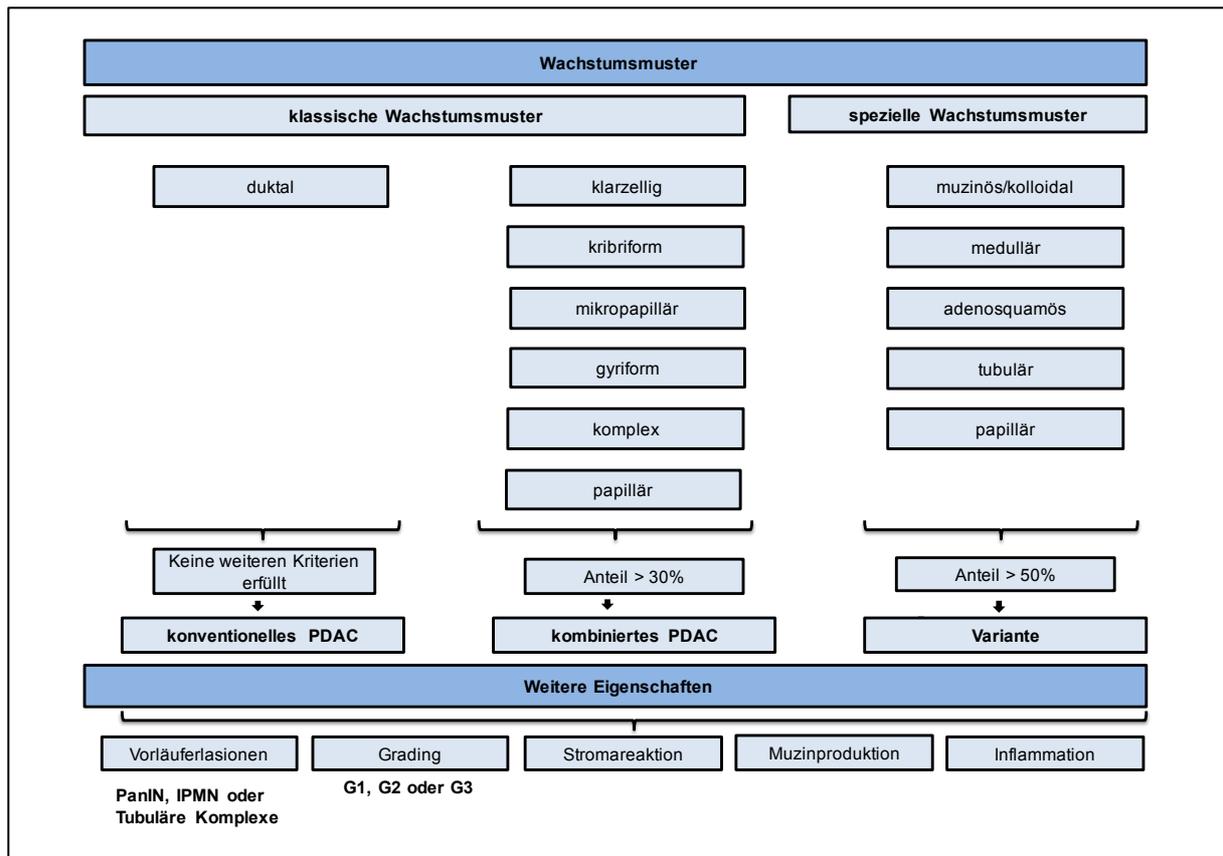


Abbildung 13: Schema der histomorphologischen Analyse

Systematik der Einteilung in morphologische Subgruppen nach Wachstumsmustern und Merkmalen.

4.4 Molekularpathologische Analysen

Die Analyse von *KRAS* erfolgte durch Kombination aus *Real-time* PCR mit hochauflösender Schmelzkurvenanalyse und Sequenzierung nach Sanger. Zunächst wurden alle Fälle auf Mutationen in Exon 2 und 3 mittels *Real-time* PCR und hochauflösender Schmelzkurvenanalyse untersucht. Alle Wildtyp Fälle wurden danach mittels *Real-time* PCR und hochauflösender Schmelzkurvenanalyse auf Mutationen im Exon 4 untersucht. Alle mutierten Fälle wurden nach Sanger sequenziert.

Die Analyse von *P16/CDKN2A* erfolgte durch eine Kombination aus Immunhistochemie und Analyse der Heterozygotie mittels *Real-time* PCR und relativer Quantifizierung. Die Immunhistochemie erfolgte dabei an TMA (Tissue-micro-arrays) oder ganzen Schnitten.

Die Analyse von *SMAD4* erfolgte durch Immunhistochemie an ganzen Schnitten. Es ist noch anzumerken, dass in dieser Arbeit die immunhistochemische Expression von *SMAD4* als Surrogatmarker des Genstatus getestet wurde, jedoch abschnittsweise kursiv geschrieben wird, wenn es sich um das Gen *SMAD4* handelt.

Die Analyse von *TP53* erfolgte durch Kombination von Immunhistochemie und Sequenzierung nach Sanger. Es wurden zwei Mutationstypen unterschieden. Als Mutationstyp 1 wurde die robuste nukleäre Akkumulation immunhistochemisch gefärbter Proteine in $\geq 25\%$ oder eine *Missense*- Mutation in der Sequenzierung definiert; als Mutationstyp 2 der komplette Verlust der immunhistochemischen Färbung der neoplastischen Drüsenvollständige oder in der Sequenzierung eine intragenetische Deletion, *Nonsense*-, *Frameshift*- oder *Splice site*- Mutation. (Melhem, Law et al. 1995, Sjogren, Inganas et al. 1996, Obata, Eura et al. 2000).

4.4.1 Immunohistochemische Analysen

4.4.1.1 Material:

- **Mikrotom HM 335E**, Microm GmbH (Walldorf, Deutschland)
- **Superfrost Plus® Objektträger**
Süsse (Gudensberg, Deutschland)
- **Easy Prep® Puffer zur Entparaffinierung**
Ventana Medical Systems (Roche, Mannheim, Deutschland)
- **Ventana**
- **UltraVIEW Universal DAB Detection Kit®**
Ventana Medical Systems (Roche, Mannheim, Deutschland)
 - **Inhibitor (3% H₂O₂; Verdünnung 1:3)**
 - **Sekundärantikörper**
 - **Diaminobenzidin (DAB)**
 - **H₂O₂ (0,04%)**
 - **Copper ((CuSo₄; 5g/l)**
- **Bluing Agent**
Ventana Medical Systems (Roche, Mannheim, Deutschland)
- **Hämalaun**
4,75 ml Hämalaun nach Mayer (Apotheke des MRI) + 4,75 ml Hämalaun nach Harris (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) +8,5 ml Essigsäure (Eisessig) (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 9ml Aqua dest.)
- **Reaktionspuffer: Tris-gepufferte Kochsalzlösung pH 7,6**
Ventana Medical Systems (Roche, Mannheim, Deutschland)
- **EDTA Puffer**
EDTA 186g + 800ml H₂O bei pH8,0

— **Citratpuffer**Zitronensäuremonohydrat 42g+ 800ml H₂O**Tabelle 2: Primärantikörper**

Protein/ Gen	Klon	Herrsteller
P16/CDKN2A	E6H4	MTM Laboratories AG, Heidelberg, Deutschland
SMAD4	B8	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
TP53	DO-7	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Ki-67	MIB-1	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

4.4.1.2 Protokolle

1. Entparaffinierung

- Inkubation bei 76°C für 4 Minuten
- Waschen mit „easy prep“ Puffer
- Inkubation bei 76°C für 4 Minuten

2. Vorbehandlung

- Auftragen des **Cell Conditioners** (siehe Tabelle 4)
- Inkubation bei 95°C für 30 Minuten
- Spülen mit Reaktionspuffer

3. Färbung

- Auftragen von 1 Tropfen **Inhibitor**
- Inkubation für 4 Minuten bei 37°C
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Auftragen von 1 Tropfen **Primärantikörper** (siehe Tabelle 2)

- Inkubation für X Minuten bei 37°C („X“ siehe Tabelle 3)
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Auftragen von 1 Tropfen **Sekundärantikörper**
- Inkubation für 8 Minuten bei 37°C
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Auftragen von 1 Tropfen **DAB** und 1 Tropfen **H₂O₂**
- Inkubation für 8 Minuten bei 37°C
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Auftragen von 1 Tropfen **Copper**
- Inkubation für 4 Minuten bei 37°C
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Auftragen von 1 Tropfen **Hämalaun**
- Inkubation für 8 Minuten bei 37°C
- Spülen mit Reaktionspuffer
- Auftragen von 1 Tropfen **Bluing Agent**
- Inkubation für 8 Minuten bei 37°C
- Spülen mit Reaktionspuffer

4. Nachbehandlung

- Spülen mit Reaktionspuffer
- Bad in der aufsteigenden Alkoholreihe
- Bad in Xylol
- Eindecken der Schnitte

Tabelle 3: Immunhistochemisches Protokoll

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit	Vorbehandlung	Detektion
P16/CDKN2A	<i>ready to use</i>	28 Minuten	B*	DAB
SMAD 4	1:25	32 Minuten	A*	DAB
TP53	1:200	20 Minuten	B*	DAB
Ki-67	1:50	20 Minuten	B*	DAB

Tabelle 4: Vorbehandlung

Art der Vorbehandlung	Verwendetes Reagenz
-----------------------	---------------------

Vorbehandlung A	Citrat pH 6
Vorbehandlung B	EDTA pH 8,0

4.4.1.3 Methodik:

Immunhistochemische Analysen erfolgten jeweils an in 4% Formaldehyd fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe des repräsentativen Tumorblocks mit 3-5 µm dicken Schnitten (SMAD4 und TP53) oder an TMA (*Tissue- micro-arrays*) mit 2-mm dicken Tumorstanzen (P16/*CDKN2A*). Bei uneindeutigem TMA Ergebnis wurden für P16/*CDKN2A* ebenfalls ganze Schnitte gefärbt.

Die immunhistochemischen Analysen wurden alle durch einen automatisiertes Färbegerät mit Detektions-Kit (UltraVIEW Universal DAB Detektions Kit, Ventana Medical Systems, Roche, Mannheim, Germany) nach dem Protokoll der Firma für offene Verfahren mit leichten Modifikationen (siehe Protokoll) durchgeführt. P16/*CDKN2A* wurde als intakt (hinweisend auf ein intaktes Gens) gewertet, wenn die neoplastischen Zellen nukleäre und zytoplasmatische Anhäufung markierter Proteine zeigten oder als verändert bei negativer Proteinexpression (Hinweisend auf eine Deletion, inaktivierende Mutation oder Promotor- Hypermethylierung) (Wilentz, Geradts et al. 1998, Geradts, Hruban et al. 2000). Bei SMAD4 wurde die Abwesenheit von nukleärer und zytoplasmatischer Expression in >90% als Verlust gewertet (als Surrogatmarker für eine Deletion oder inaktivierende Mutation des Gens) (Wilentz, Su et al. 2000). TP53 wurde als abnormal gewertet, wenn die neoplastischen Zellen entweder eine starke Anhäufung markierter Proteine (Mutationstyp 1) in mehr als 25% der neoplastischen Zellen oder einen totalen Verlust der Färbung (Mutationstyp 2) zeigten (hinweisend auf intragenetische Deletion, *Nonsense-*, *Frameshift-* oder *Splice site-* Mutation) (Melhem, Law et al. 1995, Sjogren, Inganas et al. 1996, Obata, Eura et al. 2000). Normale Inselzellen (P16/*CDKN2A*) und azinäre Zellen, Lymphozyten und Bindegewebe (TP53, SMAD4) dienten als interne Positivkontrollen.

4.4.2 Manuelle Mikrodissektion von Tumorgewebe

4.4.2.1 Material:

- **Objektträger Superfrost®**
Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
- **Mikrotom HM 335E**
Microm GmbH, Walldorf, Deutschland

- **Sterican Nadeln 0,9x40 mm**
B. Braun Medicals, Melsungen, Deutschland
- **Hämalaunlösung**
T865, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

4.4.2.2 Protokoll:

1. Entparaffinierung

- Inkubation der Schnitte über Nacht bei 37°C
- Inkubation der Schnitte bei 65°C für 20 Minuten
- Xylol Bad 1 für 10 Minuten
- Xylol Bad 2 für 10 Minuten
- Isopropanol Bad 1 für 5 Minuten
- Isopropanol Bad 2 für 5 Minuten
- Alkohol 96% Bad 1 für 2 Minuten
- Alkohol 96% Bad 2 für 2 Minuten
- Alkohol 70% Bad für 2 Minuten
- Spülen mit Aqua dest.

2. Färbung mit Hämalaun

- Hämalaun Bad für 10 Minuten
- Spülen mit lauwarmem Wasser
- Spülen mit Aqua dest.

4.4.2.3 Methodik:

Die manuelle Mikrodisektion erfolgte durch die Doktorandin selbst an 4 bis 10 jeweils 10 µm dicken Schnitten des in 4% Formaldehyd fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe des repräsentativen Tumorblocks. Dazu wurden die Schnitte zunächst gemäß Protokoll entparaffiniert und mit Hämalaun für 10 Minuten angefärbt. Die vorbereiteten Schnitte wurden in ein Aqua destillata Bad überführt und so feucht gehalten. Anschließend wurden Tumorareale unter dem Mikroskop manuell mit Hilfe einer Nadel abgekratzt und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Um die für die Mikrodisektion vorgesehenen Areale zweifelsfrei identifizieren zu können wurden die

Tumorareale mit Hilfe erfahrener Pathologen (Prof. Dr. med. Irene Esposito, Dr. med. Anna Melissa Schlitter, Dr. med. Björn Konukiewitz) auf einem HE Schnitt markiert, welcher zum Abgleich zur Hilfe genommen wurde. Für den späteren Vergleich und zur Qualitätskontrolle wurden die Schnitte nach der Mikrodissektion eingedeckt und aufgehoben.

4.4.3 DNA Extraktion aus mikrodissektiertem Material

4.4.3.1 Material:

— **QIAamp DNA FFPE Tissue Kit®**

QIAGEN, Limburg, Niederlande

- **ATL Puffer**
- **AL Puffer**
- **ATE Puffer**
- **Proteinase K**

— **Zentrifuge 5417R**

Eppendorf, Hamburg, Germany

— **1,5 ml Mikrozentrifugier Röhren (Safe Lock Tubes)**

— Eppendorf, Hamburg, Germany

— **Vortexer**

4.4.3.2 Protokoll:

1. Entfernung des überschüssigen Paraffins

- Zugabe von 1ml Xylol pro Eppendorf Röhren, 15 Sekunden vortexten, 4 Minuten bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand an Xylol abnehmen
- Zugabe von 1ml Ethanol pro Eppendorf Röhren, 15 Sekunden vortexten, 4 Minuten bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand an Xylol abnehmen

- 10 Minuten trocknen bei Raumtemperatur

2. DNA Extraktion

- Zugabe von 180 μ l ATL Puffer und 20 μ l Proteinase K, vortexten
- Inkubation bei 55 °C über Nacht
- Inkubation bei 95°C für 15 Minuten, Zentrifugation für 15s bei 13000 rpm
- Zugabe von 200 μ l AL Puffer, vortexten
- Zugabe von 200 μ l AL Puffer, vortexten
- Überführen der Probe auf Minisäule, Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 rpm
- Überführung der Minisäule in neues Sammelröhrchen
- Waschen mit 500 μ l AW1 Puffer durch Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 rpm, Überstand verwerfen
- Waschen mit 500 μ l AW2 Puffer durch Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 rpm, Überstand verwerfen
- Trocknung durch Zentrifugation für 3 Minute bei 14000 rpm
- Überführung der Minisäule auf frisches Eppendorf Röhrchen
- Elution der DNA durch Zugabe von 30 μ l ATE Puffer, Inkubation für 1 Minute und Zentrifugation für 1 Minute bei 14000 rpm

4.4.3.3 Methodik:

Die DNA Extraktion aus dem manuell mikrodisezierten Gewebe wurde durch die Doktorandin selbst mit einem Extraktionskit (QIAamp FFPE Tissue Kit®, QIAGEN, Limburg, Niederlande) nach dem Protokoll der Firma mit leichten Modifikationen durchgeführt (siehe Protokoll). Anschließend wurde die Konzentration der

gewonnenen DNA photometrisch bestimmt (NanoDrop 1000[®], Peqlab, Erlangen, Deutschland). Dabei wurde jeweils 1 μ l unverdünnter Probenlösung auf die Messvorrichtung aufgetragen. Die DNA Lösung wurde auf zwei Eppendorf Tubes in Vorrats- und Arbeitslösung aufgeteilt und eingefroren. Für die PCR und *Real-time* PCR wurden jeweils verdünnte DNA-Lösungen (10ng/ μ l) angesetzt.

4.4.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

4.4.4.1 Material

- Aqua dest.
- Puffer
- dNTP
- Primer
- AmpliTaq Gold DNA Polymerase[®]
Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA

4.4.4.2 Protokolle:

4.4.4.3 Ansatz der Reaktionen

Tabelle 5: Ansatz der Reaktionen für *KRAS*

Reagenz	Volumen
DNA (10ng/ μ l)	2,0 μ l
Primer Forward	0,25 μ l
Primer Reverse	0,25 μ l
Puffer xmM	8,5 μ l
dNTP	2,0 μ l
Aqua dest.	5,0 μ l
Taq	4,0 μ l

Tabelle 6: Ansatz der Reaktionen für TP53

Reagenz	Volumen
DNA (10ng/ µl)	2,0 µl
Primer Forward	0,25 µl
Primer Reverse	0,25 µl
Puffer x mM	8,5 µl
dNTP	2,0 µl
Aqua dest.	5,0 µl
Taq	4,0 µl

4.4.4.4 Ablauf der Reaktionen

Das Protokoll der Polymerasekettenreaktion beinhaltet drei Phasen:

1. Inkubation:

15 Minuten bei 95°C zur Denaturierung

2. Amplifikation:

15 Sekunden bei 95°C (Denaturierung)

25 Sekunden bei A/B°C (*Annealing*) (siehe

Tabelle 7)

10 Sekunden bei 72°C (*Elongation*)

Die Amplifikationsphase wurde zyklisch 43mal wiederholt.

3. Kühlphase:

Bei 25°C bis zur Entnahme der Proben

Tabelle 7: Primer Sequenzen und Annealing Temperatur

Gen	Exon			Annealing Temperatur
KRAS	2	<i>Forward</i>	GGT GGA GTA TTT GAT AGT GTA TTA	59°C
	2	<i>Reverse</i>	CCT CTA TTG TTG GAT CAT ATT CG	

	3	<i>Forward</i>	TGT GTT TCT CCC TTC TCA GGA	59°C
	3	<i>Reverse</i>	AAA CCC ACC TAT AAT GGT GAA	
TP53	5	<i>Forward</i>	ATC TGT TCA CTT GTG CCC TG	60°C
	5	<i>Reverse</i>	AAC CAG CCC TGT CGT CTC TC	
	6	<i>Forward</i>	AGG GTC CCC AGG CCT CTG AT	62°C
	6	<i>Reverse</i>	CAC CCT TAA CCC CTC CTC CC	
	7	<i>Forward</i>	CCA AGG CGC ACT GGC CTC ATC	65°C
	7	<i>Reverse</i>	CAG AGG CTG GGG CAC AGC AGG	
	8	<i>Forward</i>	TTC CTT ACT GCC TCT TGC TT	56°C
	8	<i>Reverse</i>	TGT CCT GCT TGC TTA CCT CG	
	9	<i>Forward</i>	AAG CAA GCA GGA CAA GAA GC	55°C
	9	<i>Reverse</i>	CCA CTT GAT AAG AGG TCC CA	

4.4.4.5 Methodik

Die PCR dient zur Amplifikation von DNA *in vitro*. Dabei wird durch die DNA-Polymerase als Schlüsselenzym ein DNA Einzelstrang durch Aneinanderreihung komplementärer Einzelnukleotide zu einem Doppelstrang ergänzt. Dieses Enzym benötigt als Startpunkt einen kurzen Abschnitt eines doppelsträngigen DNA Abschnitts (Mullis and Faloona 1987). Daher werden synthetische Oligonukleotide (Primer) verwendet, die komplementär zum Anfang und zum Ende des zu amplifizierenden Bereichs sind. Drei Schnitte werden in zyklischen Wiederholungen durchlaufen. Zunächst wird bei der Denaturierung die doppelsträngige DNA der Probe durch Erhitzen auf 95°C in die Einzelstänge aufgetrennt. Anschließend erfolgt beim Annealing die Abkühlung der Probe auf eine Temperatur, die für die Hybridisierung der Primer an ihrer Zielsequenz optimal ist. Die darauffolgende Temperaturerhöhung auf 72°C schafft optimale Bedingungen für die Amplifikation der DNA durch die hitzestabile Polymerase (Elongation). Die zyklische Wiederholung dieser Schritte (Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation) führt zu einer exponentiellen Vermehrung der Ziel-DNA.

Die PCR Protokolle für *KRAS* Exon 2 und 3 sowie *TP53* Exon 5 bis 9 sind in der Tabelle 7 ausführlich dargestellt. Sämtliche PCR Reaktionen wurden mit einer Negativkontrolle (Reaktionsansatz ohne Probenmaterial) durchgeführt. Es wurde

jeweils 20ng DNA (2µl x 10ng/µl) beigefügt. Um Verunreinigungen mit fremder DNA zu vermeiden, erfolgte die Lagerung der Materialien und Vorbereitung der PCR Ansätze in einem gesonderten Raum. Die DNA-Lösung wurde in einem getrennten Raum den vorbereiteten Tubes beigefügt.

4.4.5 Agarose- Gelelektrophorese

4.4.5.1 Material:

— **Agarose**

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

— **Ethidiumbromid**

Amresco, Solon, OH, USA

— **Tris-borate EDTA (TBE) Puffer**

Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA

— **Blue Juice Gel Loading Puffer**

Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA

— **E-Box VX2**

Vilber, Eberhardzell, Deutschland

4.4.5.2 Protokoll:

Herstellung des Agarosegels (2%)

- 2g Agarose in 100ml 1x TBE-Puffer im Erlenmeyerkolben
- Erhitzen in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung der Agarose
- Abkühlen lassen des Kolbens auf ca. 60°C unter ständigem rühren durch Magnetrührer (etwa 5 min)
- Zugabe von 1 Ethidiumbromid (10%)
- Gießen des Gels in Laufkammer mit Kamm unter Vermeidung von Luftblasen
- Ziehen des Kamms nach Abkühlen des Gels

4.4.5.3 Methodik

Bei der Agarose- Gelelektrophorese werden Nukleinsäure Stränge durch Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Agarosepulver wird durch einen Laufpuffer gelöst und aufgekocht. Anschließend entsteht ein Agarosegel mit durch Wasserstoffbrücken quervernetzten, kettenförmigen Molekülen. Es wird ein mit

anionischen Farbstoffen versetzter Probenpuffer zugegeben und anschließend eine Spannung angelegt. Durch das entstehende elektrische Feld wanden die negativ geladenen Nukleinsäuren- Moleküle entlang des Feldes und werden dabei durch die Maschen im Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt (Adkins and Burmeister 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde 2% Agarosegel verwendet und der Laufpuffer TBE (1x). Die angelegte Spannung lag bei 200V über 25 Minuten pro Lauf. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe von Ethidiumbromid als interkalierender Substanz unter UV-Licht am Gerät E-Box VX2® (Vilber, Eberhardzell, Deutschland).

4.4.6 Aufreinigung des PCR Produktes

4.4.6.1 Material:

- **QIAquick PCR Purification Kit®**
QIAGEN, Limburg, Niederlande
 - **Minisäule**
 - **Auffanggefäß**
 - **PB Puffer**
 - **PE Puffer**
 - **EB Puffer**
- **Zentrifuge 5417R**
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- **Pipetten**
Research Plus®, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- **Pippetenspitzen**
DeckWorks®, Corning, Amsterdam, Niederlande

4.4.6.2 Protokoll:

- Zugabe von 5x PB Puffer auf 1 Volumen Amplifikat pro Probe
- Überführung der Probe auf QIAquick-Minisäule mit Auffanggefäß
- Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 rpm, Durchfluss verwerfen
- Waschen der Säule mit 750 µl PE-Puffer
- Zetrifugation für 1 Minute bei 13000 rpm, Durchfluss verwerfen

- Trocknen durch Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 rpm
- Überführung der Minisäule auf frisches Eppendorf Röhrchen
- Elution durch Zugabe von 50 µl EB Puffer
- Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 rpm

4.4.6.3 Methodik:

Nach erfolgreicher PCR erfolgte die Aufreinigung des Amplifikats, um überschüssige Primer und nicht gebundene Desoxynukleotidtriphosphate zu entfernen. Verwendet wurde hierfür das QIAquick PCR Purification Kit® (QIAGEN, Limburg, Niederlande) nach dem Protokoll der Firma mit leichten Modifikationen (siehe Protokoll). Dieses Kit ermöglicht die Aufreinigung von einzel- und doppelsträngiger DNA mit einer Größe von 100 bp bis 10 kbp über eine Minisäule. Dabei wird die selektive Bindung von DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und bei neutralem pH-Wert an eine Silika-Gel-Membran genutzt. Primer, Nukleotide, Salze und Polymerasen können die Membran ungehindert passieren und werden durch mehrere aufeinanderfolgende Wasch- und Zentrifugationsschritte (siehe Protokoll) entfernt. Die gereinigte DNA wird mit Elutionspuffer eluiert.

Die Bindungskapazität einer Minisäule beträgt bis zu 10 µg DNA je Säule. Für die Aufreinigung wurde der gesamte PCR-Reaktionsansatz mit dem fünffachen Volumen an PB-Puffer gemischt.

4.4.7 Sequenzier-PCR

4.4.7.1 Material

- **BigDye®**, Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit
Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA
 - **Dye-Terminator**
 - **Sequenzier- Puffer**
- **Aqua dest.**

Primer (siehe

- **Tabelle 7)**
- **AmpliTa^q Gold DNA Polymerase[®],**
Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA

4.4.7.2 Protokolle**Tabelle 8: Ansatz der Sequenzier- PCR**

Reagenz	Volumen
PCR Amplifikat	4,0 µl
Primer <i>Forward</i>	0,25 µl
Primer <i>Reverse</i>	0,25 µl
Sequenzier-Puffer	8,5 µl
dNTP	2,0 µl
Aqua dest.	2,0 µl
Taq	4,0 µl

Ablauf der Reaktion

Das Protokoll der Polymerasekettenreaktion beinhaltete drei Phasen:

1. Inkubation:

1 Minute bei 95°C zur Denaturierung

2. Amplifikation:

10 Sekunden bei 95°C (Denaturierung)

5 Sekunden bei jeweiliger *Annealing* Temperatur °C (siehe

Tabelle 7)

4 Minuten bei 60°C (*Elongation*)

Die Amplifikationsphase wurde zyklisch 25mal wiederholt.

3. Kühlphase:

Bei 10°C bis zur Entnahme der Proben

4.4.7.3 Methodik

Die Sequenzier-PCR dient zur Vervielfältigung des zu sequenzierenden Abschnitts, bei der es durch zusätzliche Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP), den sogenannten „Dye-Terminatoren“, zum sequenzspezifischen Kettenabbruch kommt. Dabei wurden jeweils nur der Vorwärts oder der *Reverse* Primer zugegeben, so dass nur einzelsträngige DNA-Matrizen für das spätere Ablesen der Sequenz entstehen.

4.4.8 Aufreinigung des Sequenzier-PCR Produktes

4.4.8.1 Material

- Zentrifuge (5417R, Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Pipetten
- QIAGEN Dye Ex 2.0 Spin Kit®, (QIAGEN, Limburg, Niederlande)
 - Gelsäulen
 - Auffangbehälter
- 1,5 ml Mikrozentrifugier-Röhrchen (Safe Lock Tubes) (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Vortexter

4.4.8.2 Protokoll

- Gel-Säulen vortexten
- Deckel lockern und das Ende abbrechen
- Gelsäule in 2ml Auffangbehälter geben und Zentrifugation für 3 Minuten bei 2700 rpm
- Auffangbehälter verwerfen, Gelsäulen in Eppendorf Röhrchen überführen
- Überführung der PCR Produkte auf die Gelsäule
- Zentrifugierung für 3 Minuten bei 2700 rpm

4.4.8.3 Methodik

In einem weiteren Schritt wurden mit Hilfe des Dye Ex Spin Kits® (QIAGEN) die überschüssigen Dye Terminatoren aus der Sequenzierungs PCR entfernt. Dazu wurden die Proben dem Protokoll der Firma zu Folge auf spezielle Gelsäulen aufgetragen. Diese binden beim Durchlauf überschüssige Dye-Terminatoren, Primer und freie Nukleotide. Die gereinigten Proben waren nach dem Durchlauf der Gelsäule bereit für die eigentliche Sequenzierung.

4.4.9 Sequenzierung

4.4.9.1 Material

— **3130 Genetic Analyzer**

Applied Biosystems, Waltham, MA, USA

4.4.9.2 Methodik:

Die DNA wurde nach dem von Sanger beschriebenen Verfahren mittels 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) sequenziert (Sanger, Donelson et al. 1974). Durch die Sequenzier- PCR unter Verwendung der Dye-Terminatoren entstehen DNA Matrizen mit unterschiedlichen, sequenzspezifischen Längen. Innerhalb einer Matrix im elektrischen Feld werden die verschiedenen Reaktionsprodukte nach Größe aufgetrennt und durch Laserlicht zur Emission fluoreszenter Strahlen angeregt. Dadurch ist es möglich, die jeweils letzte Base eines synthetischen Strangs eindeutig zu identifizieren. Die Position der einzelnen Basen gibt dabei nach der Elektrophorese die Position innerhalb des DNA Strangs an, so dass ein mit Hilfe des Computers auswertbares Sequenzmuster entsteht.

4.4.10 Genanalyse mittels *Real-time* PCR und hochdurchflösender Schmelzkurvenanalyse (HRMA)

4.4.10.1 Material

— **Aqua dest.**

— **LC 480 HRM Master**

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

- LC 480 HRM Master Mix
- MgCl₂

— Primer

Tabelle 9: Primersequenzen der Real-time PCR und HRMA

Gen	Exon	Richtung	Primer Sequenz	Primer
KRAS	Exon 2	<i>Forward</i>	cag gaa aca gct atg acc TGA AAA	M13r
	Exon 2	<i>Reverse</i>	CTG AAT TAG CTG TAT CGT CAA	
KRAS	Exon 3	<i>KRAS 3F</i>	cag gaa aca gct atg acc GAC TGT	M13r
	Exon 3	<i>Reverse</i>	CCA GTC CTC ATG TAC TGG TCC	
KRAS	Exon 4	<i>Forward</i>	taa tac gac tca cta tag gGT TAA GGA	T7r
	Exon 4	<i>Reverse</i>	GTC CTG AGC CTG TTT TGT GTC T	
KRAS	Exon 4	<i>Forward</i>	taa tac gac tca cta tag gAC AGG CTC	T7r
	Exon 4	<i>Reverse</i>	TTT CAG TGT TAC TTA CCT GTC	

4.4.10.2 Protokoll

Tabelle 10: Ansatz der Real-time PCR und HRMA

Reagenz	Volumen
DNA (10ng/ µl)	2,0 µl
Primer <i>Forward</i>	0,25 µl
Primer <i>Reverse</i>	0,25 µl
LC 480 HRM Master Mix	8,5 µl
MgCl ₂	2,0 µl
Aqua dest.	4,0 µl

4.4.10.3 Ablauf der Reaktion

Das Protokoll der Polymerasekettenreaktion beinhaltete vier Phasen:

1. Inkubation:

15 Minuten bei 95°C zur Denaturierung

2. Amplifikation:

15 Sekunden bei 95°C (Denaturierung)

25 Sekunden bei 62°C (*Annealing*)

10 Sekunden bei 72°C (*Elongation*)

Die Amplifikationsphase wurde zyklisch 43mal wiederholt.

3. Schmelzphase:

60 Sekunden bei 96°C (Denaturierung)

30 Sekunden bei 36°C (*Annealing*)

25 Sekunden bei 66°C (*Elongation*)

60 Sekunden bei 95°C

4. Kühlphase:

Bei 25°C bis zur Entnahme der Proben aus dem LightCycler.

4.4.10.4 Methodik:

Zur Detektion von *KRAS* Mutationen (Exon 2-4) wurde die Kombination von *Real-time* PCR und hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (HRMA) durch das das LightCycler 480®-System (Roche Diagnostics, Mannheim) als Screeningmethode verwendet (Wittwer, Reed et al. 2003). Nur mutierte oder unklare Fälle wurden anschließend sequenziert. Für *KRAS* Exon 4 ergab sich in der HRMA kein Hinweis auf Mutationen, so dass keine weitere PCR oder Sequenzierung erfolgte.

Zunächst wird bei dieser Methode der zu untersuchende Abschnitt der DNA mittels *Real-time* PCR und amplifiziert. Den genspezifischen Primern wurden wahlweise M13 (*KRAS*, Exon 2-3) oder T7 (*KRAS*, Exon 4) Sequenzen angehängt um die Amplifizierung zu erleichtern. Die *Real-time* PCR ist eine Variante der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen, die mit der doppelsträngigen DNA interkalieren. Durch die Bindung an die doppelsträngige DNA wird die Fluoreszenz dieser Farbstoffe erhöht, so dass die Zunahme der Amplifikate mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus quantitativ korreliert. Die Bestimmung der Signale des fluoreszierenden Reporterfarbstoffs ermöglicht daher die direkte Messung der Konzentration des Produktes (Huggett, Dheda et al. 2005).

Anschließend an die *Real-time* PCR erfolgt die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (High-Resolution Melting Analyse/ HRM). Durch die *Real-time* PCR liegen nun viele Kopien des zu untersuchenden DNA Abschnitts vor, der als amplicon bezeichnet wird. Durch die präzise Erwärmung des amplicon DNA von 50°C bis 95°C werden die Doppelstränge aufgespalten oder „geschmolzen“. Der Aufschmelzpunkt einer DNA-Sequenz ist beeinflusst von ihrer Sequenz, Länge und somit auch von Basenpaarungen oder –fehlpaarungen. Somit hat jede Sequenz einen spezifischen Aufschmelzpunkt, der durch die Fluoreszenzänderung während des Prozesses detektiert werden kann. Die Schmelzkurven werden durch das LightCycler 480® System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) nach Fluoreszenz-Normalisierung, Temperaturverschiebung und Differenzanalyse (Vergleich mit einer Referenzkurve) graphisch dargestellt und nachfolgend mittels einer automatischen Gruppierungsfunktion der Software des LightCycler® 480-Systems entsprechend ihrer Form geordnet.

4.4.11 Analyse der P16/CDKN2A Heterozygotie mittels *Real-time* PCR und relativer Quantifizierung

4.4.11.1 Methodik

Die Methode wurde durch wissenschaftliche Kooperationspartner durchgeführt (Dr. Ivonne Regel) und ausgewertet. Daher wird in dieser Arbeit nicht näher darauf eingegangen.

Der Verlust der p16 Heterozygotie wurde durch *Real-time* PCR und anschließende relative Quantifizierung der PCR Effektivität bestimmt (Schlitter, Kloppel et al. 2013, Schlitter, Jang et al. 2015) Dabei wurde die relative Häufigkeit des p16 Chromosomen Lokus (Chromosom 19q21) mit dem PAX5 Lokus (Chromosom 9; nahe des Zentromers) verglichen. DNA von normalen Muskelzellkolonien diente zur Kalibrierung für eine balancierte p16/PAX5 Ratio (zu erwartende normal Ratio: p16/PAX5=1). Ratios von p16/PAX5 < 0.7 wurden als Verlust der Heterozygotie des p16 Lokus bewertet.

Tabelle 11: Primersequenzen LOH Analyse

Gen	Richtung	Sequenz
p16	<i>Forward</i>	GGACCTGGCTGAGGAGCTG

p16	<i>Reverse</i>	CATCTATGCGGGCATGGTTAC
PAX5	<i>Forward</i>	ATCTGTTTCAGGACATGGAGGA
PAX5	<i>Reverse</i>	CACTATCCTCTGGCGGACTACA

4.4.12 *Next-Generation* Sequenzierung

4.4.12.1 Methodik

Die Methode wurde von Kooperationspartnern im pathologischen Institut der Universität Heidelberg und der Technischen Universität München durchgeführt und ausgewertet (Dr. Volker Endris, Nicole Pfarr). Daher wird in dieser Arbeit nicht näher auf die Methodik eingegangen. Während die Schlüsselmutationen *KRAS*, *P16/CDKN2A*, *SMAD4* und *TP53* typisch für das PDAC sind, finden sich noch zahlreiche andere genetische Veränderungen, welche aber deutlich seltener sind (Jones, Zhang et al. 2008, Iacobuzio-Donahue, Velculescu et al. 2012). Das pathologische Institut der Universität Heidelberg hat ein spezielles Genpanel entwickelt, das die 40 häufigsten Mutationen des PDACs beinhaltet.

Bei insgesamt 3 Fällen wurde selektiv ergänzend zur Sequenzierung nach Sanger eine *Next-Generation* Sequenzierung mit diesem Panel angewendet (siehe Abschnitt 5.3.7).

4.5 Statistische Auswertung

Kategoriale Variablen wurden anhand von Häufigkeitstabellen in den beiden Kohorten und Prozentzahlen dargestellt. Zur Überprüfung statistisch signifikanter Unterschiede wurden der exakte Test nach Fischer bzw. der Chi-Quadrat-Test nach Pearson angewandt. Für stetige Variablen wurde der Median mit Spannweite (Minimum-Maximum) angegeben; der Unterschied wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft.

Überlebensanalysen wurden mittels der Kaplan-Meier Methode durchgeführt. Unterschiede wurden mit dem Log-rank Test berechnet. Ein multivariablen Cox *proportional Hazard* Modell wurde genutzt um mittels *Hazard ratio* die prognostischen Parameter zu schätzen. Hierbei wurden univariat signifikante Variablen eingeschlossen. Für alle Auswertungen wurde das Signifikanzniveau auf 5% festgelegt, sodass alle Ergebnisse mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen

werden können. Die erhobenen Daten wurden mit IBM inc., SPSS Statistics Version 22 (IBM Inc., Armonk, NY, USA) ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Klinisch-pathologische Daten (Deskriptive Statistik)

In Tabelle 12 sind die im Folgenden beschriebenen klinisch pathologischen Daten zusammengefasst.

Tabelle 12: Klinisch pathologische Daten

	N	%
Gesamtanzahl	177	100
Allgemeine Informationen und präoperativer Allgemeinzustand		
Geschlecht		
männlich	96	54,2%
weiblich	81	45,8%
Alter (Jahre. Median. min.-max.)	68,1 (31,1-88,3)	
ASA-Score		
1	12	6,8%
2	105	59,3%
3	59	33,3%
4	1	0,6%
Erkrankungsspezifische Informationen		
UICC-Stadium (7. Auflage 2009)		
1	8	4,5%
2a	39	22,0%
2b	100	56,5%
3	19	10,7%
4	11	6,2%
pT		
1	4	2,3%
2	11	6,2%
3	142	80,2%
4	20	11,3%
pN		
0	52	29,4%
1	125	70,6%
Grading		
1	11	6,2%
2	74	41,8%

3	92	52,0%
Resektionsstatus		
0	90	50,8%
1	61	34,5%
2	2	1,1%
x	24	13,6%
Durchgeführte Therapien		
Art der Operation		
Pylorus erhaltende Pankreatikoduodenektomie (pp- Whipple)	98	55,4%
Whipple, klassisch	16	9,0%
Pankreaslinksresektion	33	18,6%
Totale Pankreatektomie	30	17,0%
Adjuvante Chemotherapie		
nein	23	15,8%
ja	123	84,2%
Neoadjuvante Chemotherapie		
nein	166	93,8%
ja	11	6,2%
Klinischer Verlauf		
Überleben	146	
Überlebt	33	22,6%
Verstorben	113	77,4%
Überlebenszeit		
Überlebt (Monate. Median. min.-max.)	49,4 (25,9-75,1)	
Verstorben (Monate. Median. min.-max.)	16,5 (2,5-71,4)	
Medianes Überleben		
Komplette Kohorte	17,8	
Überlebensanalysen-Kohorte *	19,8 Monate	
1-Jahres Überleben	71,9%	
3-Jahres Überleben	28,9%	
5-Jahres Überleben	20,5%	
*ausgeschlossen für Überlebensanalyse	31	17,5%
Ausschlusskriterien für Überlebensanalysen		
M1-Status	11	6,2%
Neoadjuvante CTx	11	6,2%
Arterielle Resektion	4	2,3%
Lost to <i>Follow-Up</i>	3	1,7%

Perioperativ verstorben	1	0,6%
Rezidiv OP	1	0,6%

5.1.1 Alter, Geschlecht und präoperativer Allgemeinzustand

In die Studie wurden 177 Patienten mit PDACs eingeschlossen, welche sich zwischen 2007 und 2011 einer chirurgischen Resektion unterzogen hatten. Es handelte sich um 45,8% (81/177) weibliche und 54,2% (96/177) männliche Patienten im Alter von 31,1-88,3 Jahren mit einem medianen Alter von 68,1 Jahren.

Nach der Klassifikation der American Society of Anaesthesiologists (ASA) zur Einschätzung des präoperativen Allgemeinzustandes wurden 6,8% (12/177) ASA 1, 59,6% (105/177) ASA 2, 33,3% (59/177) ASA 3 und 0,6% (1/177) ASA 4 zugeordnet.

5.1.2 Erkrankungsspezifische Informationen

Nach der UICC-Klassifikation des Pankreaskarzinoms befand sich die Mehrheit der Patienten mit 78% im Stadium IIA (39 Patienten, 22%) und IIB (100 Patienten, 56%), gefolgt von weiteren 16,9% im Stadium III und IV, während sich nur eine Minderheit der Patienten in einem sehr frühen Stadium befand (Stadium I: 4,5%) (Sobin, Gospodarowicz et al. 2009).

Zur Beschreibung der Tumorausdehnung wurde der T-Status nach der 7. Auflage der UICC-TNM-Klassifikation verwendet (Sobin, Gospodarowicz et al. 2009). Es zeigt sich, dass bei Diagnose der Erkrankung die meisten Patienten bereits einen fortgeschrittenen Befund mit pT3 (80,2%, 142/177) und pT4 Status (11,3%, 20/177) aufwiesen. Weiter wiesen nur 2,3% (4/177) einen pT1-Status und 6,2% (11/177) einen pT2-Status auf.

Auch der Lymphknotenbefall wurde bei einer Mehrheit von 70,6% (125/177) nachgewiesen, bei 29,4% (52/177) lagen keine Lymphknotenmetastasen vor.

Nur 6,2% (11/177) der Patienten hatten ein gut differenziertes Pankreaskarzinom (G1), bei 41,8% lag ein mäßig differenziertes (G2) Pankreaskarzinom und bei 52,0% (92/177) ein schlecht differenziertes (G3) Pankreaskarzinom vor.

Eine vollständige chirurgische Resektion (R0) wurde im Kollektiv bei 50,8% (90/177) erreicht, bei 34,5% (61/177) waren mikroskopisch Tumorzellen im Absetzungsrand

sichtbar (R1). Bei 13,6% (24/177) war die Resektionsgrenze nicht beurteilbar (RX). Bei zwei Patienten (1,1%, (2/177)) lag eine R2-Situation vor.

5.1.3 Durchgeführte Therapien

Zur chirurgischen Resektion wurden verschiedene Operationsmethoden angewendet. Mit 55,4% (98/177) wurde am häufigsten eine Pylorus-erhaltende Pankreatoduodenektomie (pp-Whipple) Operation durchgeführt, bei 18,6% (33/177) erfolgte eine Pankreaslinksresektion, bei 17,0% (30/177) erfolgte die totale Pankreatektomie und bei 9% (16/177) erfolgte eine klassische Whipple-Operation.

In einzelnen Fällen (bei 6,2% (11/177) der Patienten) wurde präoperativ eine neoadjuvante Therapie durchgeführt. Bei 93,8% (166/177) wurde keine neoadjuvante Therapie durchgeführt. Die neoadjuvante Therapie wurde nicht einheitlich durchgeführt (siehe Tabelle 13). 84,2% (123/177) der Patienten erhielten eine adjuvante Chemotherapie, bei 15,8% (23/177) wurde keine adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Patienten mit neoadjuvanter Therapie wurden von den Überlebensanalysen ausgeschlossen.

Tabelle 13: Behandlungsschemata der Patienten mit neoadjuvanter Therapie

ID	Therapie	Dauer/ Dosis	Zyklen	Überleben (Monate)
# 5	Gemcitabine/ Erlotinib	4 Monate	4	17,8
	Gemcitabine	2 Monate	2	
# 15	Radiotherapy	30 Gy		11,7
	5-Fluorouracil	1 Monat		
# 19	Gemcitabine/Cisplatin/Tarceva	9 Monate	9	77,7
	Oxaliplatin	4 Monate	4	
	Radiotherapy plus 5-Fu	36 Gy	3	
# 26	Gemcitabine	7 Monate	7	11,0
# 36	Epirubecin/Oxaliplatin/Xeloda	6 Monate	6	8,1
# 37	Gemcitabine/ Oxaliplatin	5 Monate		13,0
	Gemcitabine/ Oxaliplatin	2 Monate		
# 48	Radiotherapy	36 Gy		49,8
	5-Fluorouracil	1 Monat		
# 61	Gemcitabine/ Oxaliplatin	6 Monate	12	5,9
# 102	Gemcitabine/ Erlotinib	4 Monate	4	3,5

# 128	Gemcitabine/ Erlotinib	2 Monate	2	13,6
# 142	Cisplatin	1 Monat		4,5
# 152	Gemcitabine/ Oxaliplatin	3 Monate	3	4,1
# 185	Gemcitabine	4 Monate	4	24,5
# 188	Gemcitabine/ Oxaliplatin	6 Monate	10	8,4

Klinischer Verlauf

Für die Überlebensanalysen wurden 17,5% (31/177) der Patienten ausgeschlossen, um ein einheitliches Kollektiv zusammenszustellen. Als Ausschlusskriterien für die Überlebensanalysen wurden Fernmetastasen/ UICC Stadium IV (6,2% (11/177)), neoadjuvante Vorbehandlung (6,2% (11/177)), arterielle Resektion (2,3% (4/177)), perioperativer Tod (0,6% (1/177)) und Rezidivoperationen (0,6% (1/177)) definiert.

Zum Zeitpunkt der Überlebensanalysen waren 33 von 146 Patienten (22,6%) am Leben mit einem medianen Überleben von 49,9 Monaten und einer Spannweite von 25,9 bis 75,1 Monaten. 77,5% (133/146) der Patienten verstarben vor Ende der Studie mit einem medianen Überleben von 16,5 Monaten und einer Spannweite von 2,5 bis 71,4 Monaten. Das mediane Gesamtüberleben betrug 19,8 Monate. In der gesamten Patientenkohorte (vor Anwendung der Ausschlusskriterien) betrug das mediane Überleben nur 17,8 Monate. Die Gesamtüberlebensraten ergaben 71,9% für ein Jahr, 28,9% für drei Jahre und 20,5% für fünf Jahre. Die mediane Nachbetreuungszeit (*Follow-up*) betrug 19,8 Monate (2,5-75,1 Monate) und die mediane Nachbetreuungszeit für Patienten, die noch am Leben waren, betrug 49,4 Monate (25,9-75,1 Monate).

5.2 Histomorphologische Analyse

Histologisch sind PDACs neben dem klassischen duktalem Wachstum durch die zusätzliche Ausbildung zahlreicher verschiedener Wachstumsmuster charakterisiert, so dass sich bei der histomorphologischen Analyse der Fälle ein heterogenes Bild ergab. Die Fälle wurden in drei Gruppen unterteilt, zum einen die konventionellen PDACs mit einem rein duktalem Wachstumsmuster, zum anderen die kombinierten PDACs mit einer weiteren dominanten Wachstumskomponente neben dem duktalem Muster und des Weiteren die homogenen Varianten/ speziellen Karzinome (Tabelle 14). Bei den konventionellen und den kombinierten PDACs handelt es sich um

„klassische“ PDACs, welche also in unterschiedlichen Anteilen das klassisch duktales Wachstumsmuster ausprägen.

Die Mehrheit der Fälle, nämlich 92,1%, (163/177), wurden als konventionell oder kombiniert duktales Adenokarzinome (PDAC) klassifiziert.

Im Detail wurde etwa die Hälfte der Fälle als konventionelle PDACs bewertet (51,4%, 91/177), da sie ein homogenes Bild zeigten und keine weiteren Wachstumskomponenten aufwiesen. Überwiegend fand sich ein Grading von G2 (44%) oder G3 (48%). Weitere 41% (72/177) der Fälle wurden als kombinierte PDACs bewertet, da sich noch weitere Wachstumskomponenten wie kribriiforme (17/177), klarzellige (16/177), papilläre (17/177), mikropapilläre (2/177), komplexe (12/177) und gyriform (8/177) aufwiesen. Überwiegend fand sich ein Grading von G2 (37%) oder G3 (61%). Im Detail handelte es sich bei allen Fällen mit kribriiformen und klarzelligen Wachstumskomponenten um G2 Tumore, während sich innerhalb der Fälle mit gyriformen, papillären, mikropapillären und komplexen Wachstumskomponenten mehrheitlich G3 Tumore (90%) fanden.

Zwei der konventionellen PDACs wurden von einem kleinen IPMN des gastrischen Typs begleitet und in vier Fällen zeigten sich Retentionszysten. Ein PDAC mit klarzelliger Wachstumskomponente und ein PDAC mit komplexer Wachstumskomponente waren jeweils mit einem IPMN vom pankreatobiliären Typ assoziiert.

Eine Minderheit von 7,9% (14/177) der untersuchten Tumoren klassifizierten sich als homogene Varianten und spezielle Pankreaskarzinome (siehe Abbildung 15). Es zeigten sich zum einen die in der WHO Klassifikation beschriebenen Wachstumsvarianten, davon zwei adenosquamöse, ein medulläres und zwei muzinöse/kolloidale Karzinome. Eine der muzinöse/kolloidale Karzinome ging dabei aus einem IPMN hervor. Beim zweiten Fall konnte keine Assoziation zu einem IPMN nachgewiesen werden.

Es fanden sich auch sechs Fälle mit rein papillärer Wuchsform, welche als papilläre Karzinomvariante bewertet wurden und als G2 Tumore eingestuft wurden. Vier dieser Karzinome waren mit IPMNs assoziiert, entweder vom gastrischen (1/6), intestinalen (1/6) oder pankreatobiliären Typ (2/6).

Drei Karzinome wurden als tubuläre Karzinome klassifiziert. Diese Variante ist eine neue Variante des PDACs, welche bisher noch nicht beschrieben wurde und somit

nicht in der WHO Klassifikation aufgenommen ist. Die drei tubulären Karzinome bestanden aus gut differenzierten, offenen Tubuli, welche das Stroma infiltrierten. Die Tubuli wiesen ovale, runde oder winkelförmige Formen auf und wurden von einer einfachen Schicht mehrheitlich kuboidaler Zellen ausgekleidet, welche kaum Pleomorphismen oder mitotische Figuren und unverdächtige Nukleoli zeigten (siehe Abbildung 16). Die Tubuli sind ungeordnet über das Gewebe verteilt und sind von reichlich zellarmem, desmoplastischem Stroma umgeben.

Insgesamt zeigten sich im Vergleich der Gruppen in der Kreuztabelle Unterschiede im Bezug auf das Grading. Die Varianten und speziellen Karzinome wiesen ein signifikant besseres Grading als die konventionellen oder kombinierten PDACs (klassische PDACs) auf ($p < 0,001$) (Tabelle 15).

Tabelle 14: Histologische Typen des duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC): Häufigkeit und Überlebenszeiten

Tumortyp	N	%	Assoziierte IMPN	Medianes Überleben (Monate)
Klassische PDACs	163	92,1%	4	
Konventionelle PDACs	91	51,4%	2 gastrisch	22,7
Kombinierte PDACs	72	40,6%	2 pankreatobiliär	15,5
mit papillärer Komponente	17	9,6%		13,9
mit kribriformer Komponente	17	9,6%		28,7
Mit klarzelliger Komponente	16	9,0%	1 pankreatobiliär	17,6
mit komplexer Komponente	12	6,7%	1 pankreatobiliär	10,7
mit gyriformer Komponente	8	4,5%		12,5
mit mikropapillärer Komponente	2	1,1%		16,1
Varianten und spezielle Karzinome	14	7,3%	5	34,1
Adenosquamöses Karzinom	2	1,1%		4,1
Kolloidales/Muzinöses Karzinom	2	1,1%	1 intestinal	>64,3
Tubuläres Karzinom	3	1,7%		>75,1
Medulläres Karzinom	1	0,5%		>55,3
Papilläres Karzinom	6	3,4%	2 pankreatobiliär, 1 intestinal, 1 gastrisch	>20,6

Tabelle 15: Zusammenhang zwischen Morphologischem Subtyp und Grading

Phänotyp	N	Grading			p- Wert
		G1	G2	G3	
A: klassische PDACs					
A1: Konventionelle PDACs	91	7	4	44	
A2: Kombinierte PDACs	72	1	27	44	A1 vs A2 0,08
B: homogene Varianten	14	5	6	3	A vs B <0,001

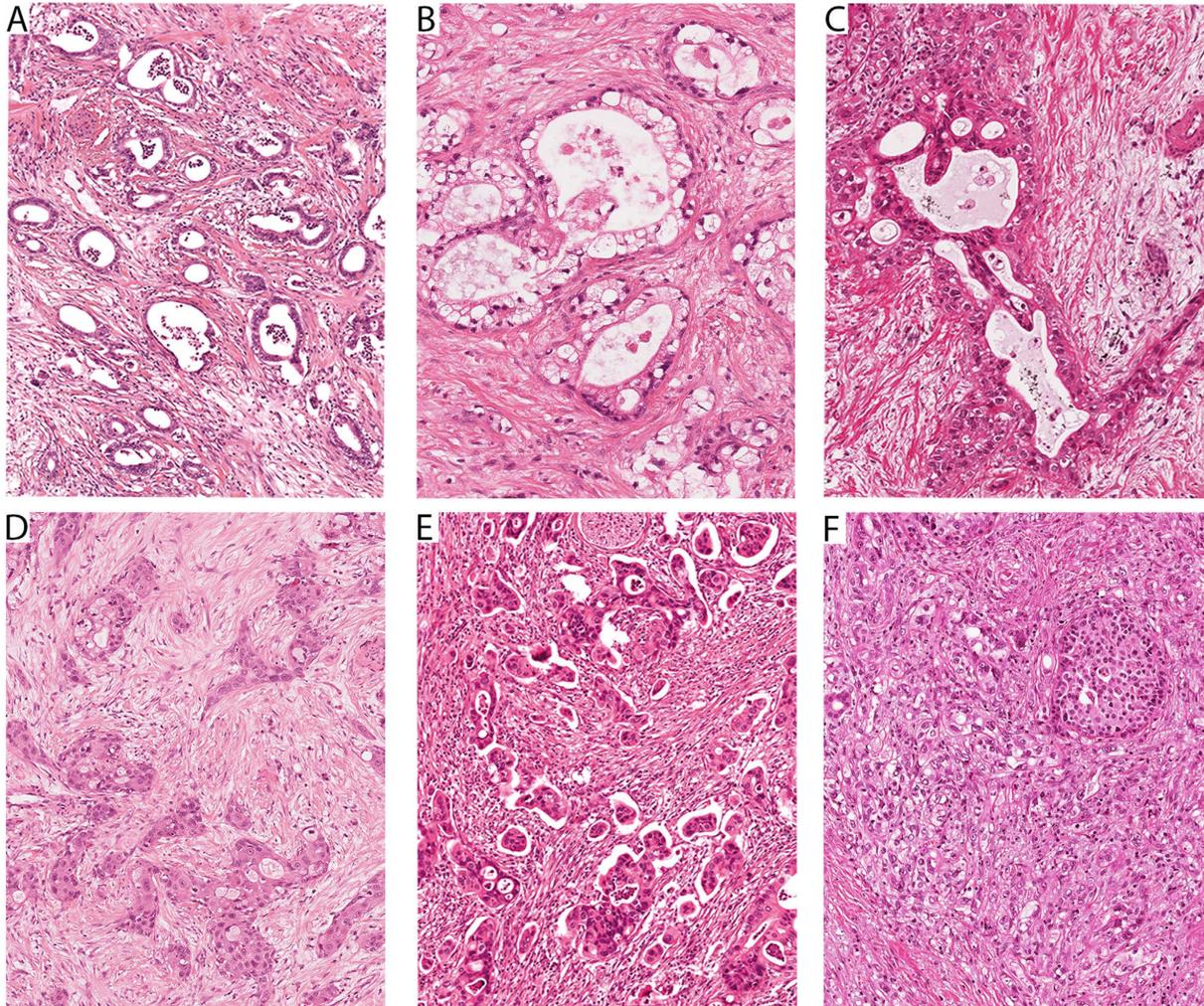


Abbildung 14: Wachstumskomponenten des klassisch duktales Adenokarzinoms des Pankreas in Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten

Originalabbildung aus Schlitter, Segler et al. 2017. A. Konventionelles duktales Adenokarzinom ohne weitere Wachstumskomponenten. **B-F.** Kombiniertes duktales Adenokarzinom mit dominanter Wachstumskomponente. **B.** klarzellige Wachstumskomponente. **C.** Kribriforme Wachstumskomponente. **D.** Gyriforme Wachstumskomponente. **E.** Mikropapilläre Wachstumskomponente. **F.** Komplexe Wachstumskomponente.

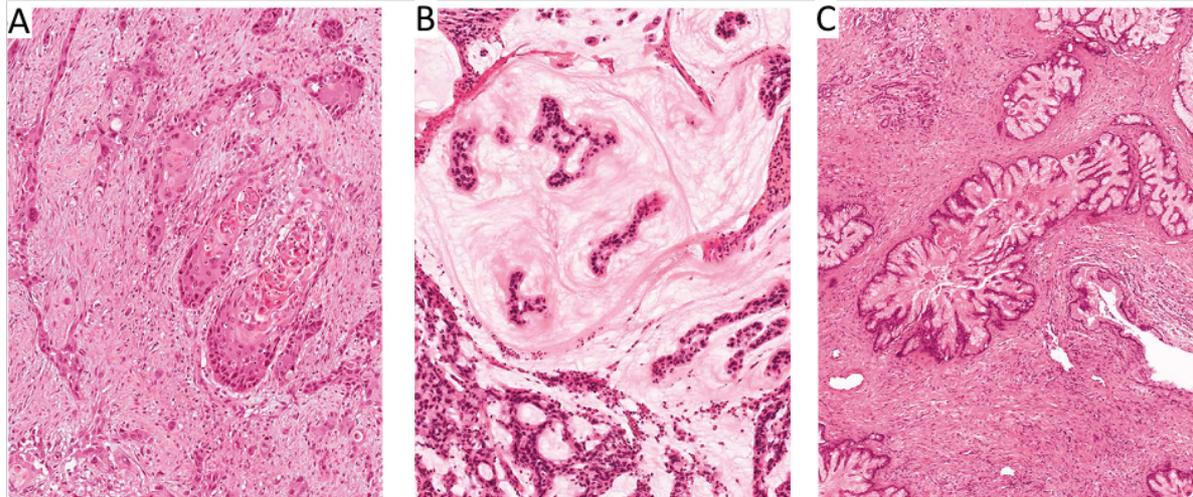


Abbildung 15: Varianten des duktales Adenokarzinoms des Pankreas in Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten

Originalabbildung aus Schlitter, Segler et al. 2017. A. Adenosquamöses Karzinom des Pankreas. **B.** Kolloidales Karzinom des Pankreas. **Medulläres Karzinom des Pankreas.** **C.** Papilläres Karzinom des Pankreas. (Nicht gezeigt: Tubuläres Karzinom des Pankreas, siehe Abbildung 16).

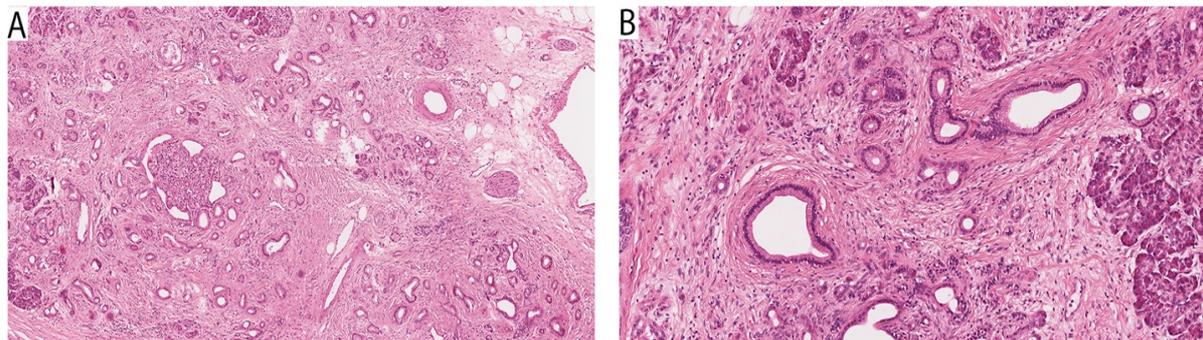


Abbildung 16: Tubuläres Karzinom des Pankreas in Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten

Originalabbildung aus Schlitter, Segler et al. 2017. A. Gruppen gut differenzierter infiltrierender Tubuli eingebettet in ein desmoplastisches Stroma. **B.** Infiltrierende gut differenzierte neoplastische Drüsen, die normale Gänge imitieren.

5.3 Molekulare Analysen

5.3.1 Übersicht

In Tabelle 16 sind die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse der molekularen Analyse zusammengefasst.

Tabelle 16: Ergebnisse der molekularen Analysen

Mutation	Status	Anzahl	%
KRAS			
	intakt	13	8,5%
	verändert	164	91,5%
	Exon 2	149	90,9%
	Exon 3	14	8,5%
	Exon 2 + 3	1	0,6%
	Exon 4	0	0%
P16/CDKN2A			
	intakt	43	26,6%
	verändert	133	72,9%
	n.a.	1	0,6%
TP53			
	intakt	38	21,5%
	verändert	139	78,5%
	Exon 5	35	34,3%
	Exon 6	27	26,5%
	Exon 7	21	20,6%
	Exon 8	19	18,6%
	Mut Typ 1*	92	52,0%
	Mut Typ 2*	47	26,6%
SMAD4			
	positiv	112	62,7%
	negativ	65	37,3%

*TP53 Mutationstyp 1: robuste nukleäre Akkumulation immunhistochemisch gefärbter Proteine in \geq 25% oder *Missense*- Mutation

*TP53 Mutationstyp 2: kompletter Verlust der immunhistochemischen Färbung der neoplastischen Drüsenvollständige oder intragenetische Deletion, *Nonsense*-, *Frameshift*- oder *Splice site*- Mutation

5.3.2 KRAS

Insgesamt wurden in 91,5% (164/177) der untersuchten PDACs Mutationen im *KRAS* Gen gefunden, während nur 8,5% (13/177) einen Wildtyp aufwiesen (siehe Tabelle 16).

Die Mutationen befanden sich mit 90,9% (149/164) überwiegend in Exon 2, davon trat in 3,0% (5/164) eine Doppelmutation in Exon 2 auf (p.G12D kombiniert mit p.G12V).

In Exon 3 befanden sich 8,5% (14/164) der Mutationen und in einem Fall (0,6%, 1/164) wurden Mutationen in beiden Exons detektiert.

Insgesamt wurden daher 170 Mutationen gefunden (siehe Tabelle 17). Diese verteilten sich mit 46,5% (79/170) am häufigsten auf p.G12D, gefolgt von p.G12V mit 28,9% (49/162), p.G12R mit 11,8% (20/162), p.G12C mit 1,8% (3/170) p.G12A mit 1,2% (2/170) und je mit 0,6% (1/170) p.G12F und p.G12L.

In Exon 3 befanden sich 8,9% (15/170) der Mutationen, davon mit 7,6% (13/170) p.Q61H und mit 1,8% (3/170) p.Q61R. In Exon 4 wurden keine Mutationen detektiert.

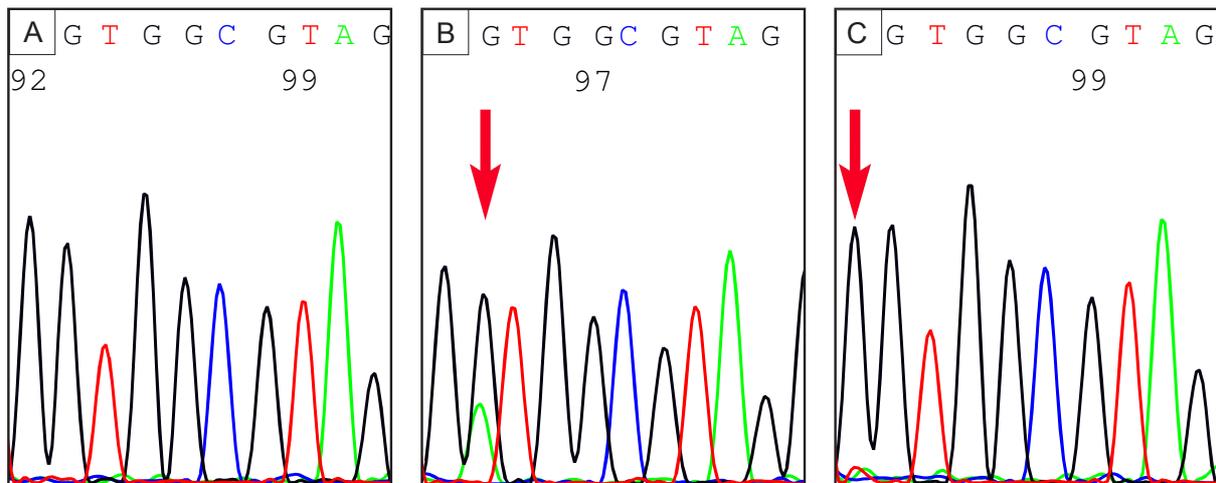


Abbildung 17: Ergebnisse der KRAS Sequenzierung

Originalabbildung aus Schlitter, Segler et al. 2017. Der KRAS Status wurde mit einer Kombination aus HRMA und Sanger Sequenzierung analysiert. Beispielhaft dargestellt ist hier die Sanger Sequenzierung von Kodon 12 auf Exon 2.

A. Hotspot of Exon 2 mit KRAS Wildtyp. **B.** Hotspot von Exon 2 mit KRAS Mutation (p.G12D) (roter Pfeil). **C.** Hotspot von Exon 2 mit KRAS Low level Mutation (p.G12C) (roter Pfeil, schwache rote Bande, mittels NGS bestätigt).

Tabelle 17: Verteilung der KRAS Mutationen

EXON 2				EXON 3			
Mutation	Mutationstyp	Anzahl	%	Mutation	Mutationstyp	Anzahl	%
p.G12D	<i>Missense</i>	79	46,5%	p. Q61H	<i>Missense</i>	12	7,1%
p.G12V	<i>Missense</i>	49	28,8%	p. Q61R	<i>Missense</i>	3	1,8%
p.G12R	<i>Missense</i>	20	11,8%				
p.G12C	<i>Missense</i>	3	1,8%				
p.G12A	<i>Missense</i>	2	1,2%				
p.G12F	<i>Missense</i>	1	0,6%				
p.G12L	<i>Missense</i>	1	0,6%				
Total	155				15		

5.3.3 P16/CDKN2A

In der Immunhistochemie zeigten sich in 72,9% (129/177) der Fälle einen Verlust von P16/CDKN2A, während eine positive Färbung und damit ein intaktes Protein in 26,0% (46/177) nachgewiesen wurden. In einem Fall gelang die Auswertung nicht (0,5% (1/177)).

Die Bewertung der Heterozygotie ergab in 65,5% (116/177) der Fälle einen normalen Wert, während in 32,8% (58/177) der Verlust der Heterozygotie nachgewiesen wurde. In 1,7% (3/177) gelang die Auswertung nicht.

Insgesamt wurde P16/CDKN2A als intakt gewertet, wenn die Immunhistochemie positiv und die Analyse der Heterozygotie normal waren. P16/CDKN2A wurde als verändert gewertet, wenn sich immunhistochemisch ein Verlust ergab oder der Verlust der Heterozygotie nachgewiesen wurde. Dadurch ergab sich ein intaktes P16/CDKN2A in 24,9% (44/177) der Fälle. Mit 75,1% (133/177) zeigte damit die deutliche Mehrheit der Fälle eine Veränderung in P16/CDKN2A. In einem Fall gelang die Auswertung nicht (0,6% (1/177)).

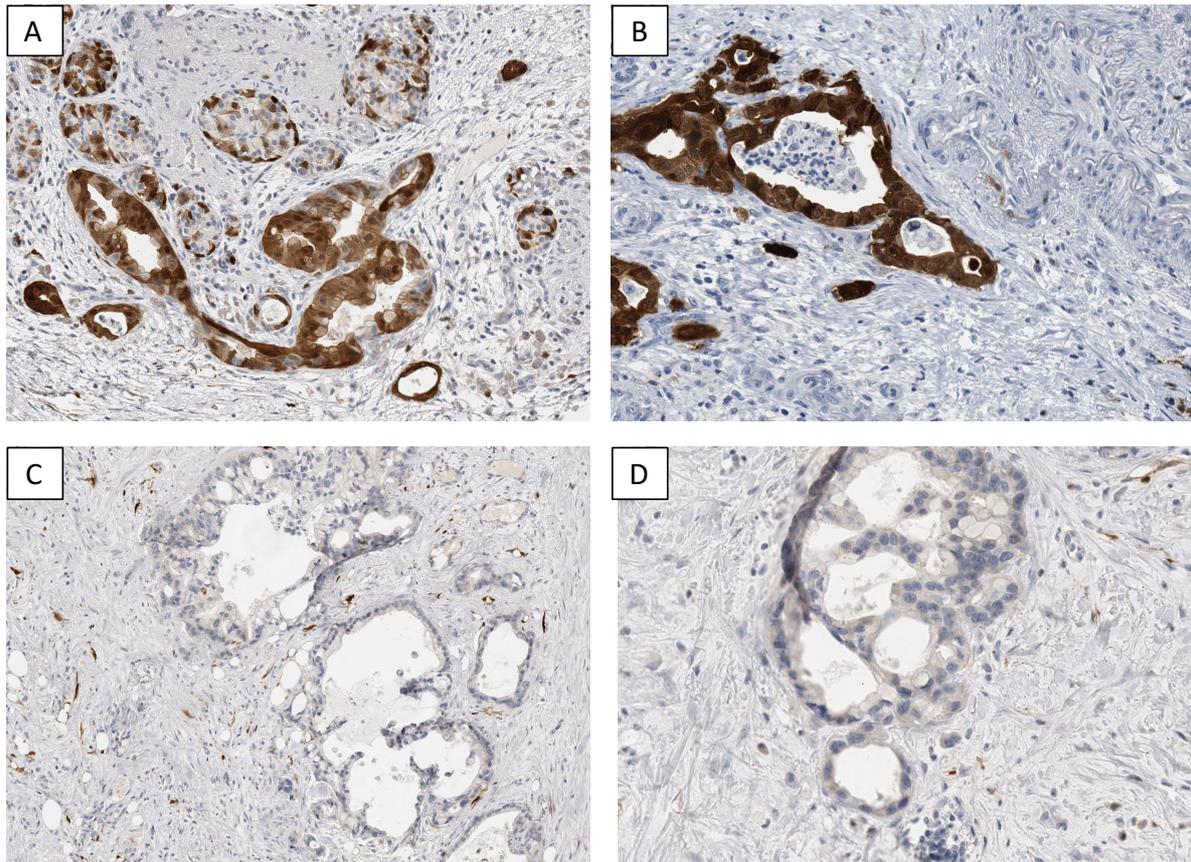


Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse des P16/CDKN2A Proteins

Abbildung in Anlehnung an Schlitter, Segler et al. 2017.

Unterschiedliche immunhistochemische P16/CDKN2A Markierungsmuster des PDACs.

A. Starke nukleäre und zytoplasmatische Anreicherung von P16/CDKN2A in neoplastischen Drüsen hinweisend auf ein intaktes Gen (10-fache Vergrößerung). **B.** Starke nukleäre und zytoplasmatische Anreicherung von P16/CDKN2A in neoplastischen Drüsen hinweisend auf ein intaktes Gen (20x). **C.** Fehlende immunhistochemische Markierung von P16/CDKN2A i in neoplastischen Drüsen hinweisend auf eine Deletion, inaktivierende Mutation oder Hypermethylierung (10x). **D.** Fehlende immunhistochemische Markierung von P16/CDKN2A i in neoplastischen Drüsen hinweisend auf eine Deletion, inaktivierende Mutation oder Hypermethylierung (20-fache Vergrößerung).

5.3.4 SMAD4

Insgesamt wurde der Verlust des SMAD4 Proteins in 37,3% (65/177) nachgewiesen. Mit 62,7% (112/177) zeigten die meisten Fälle eine deutliche Expression und SMAD4 wurden somit als intakt gewertet (siehe Abbildung 19).

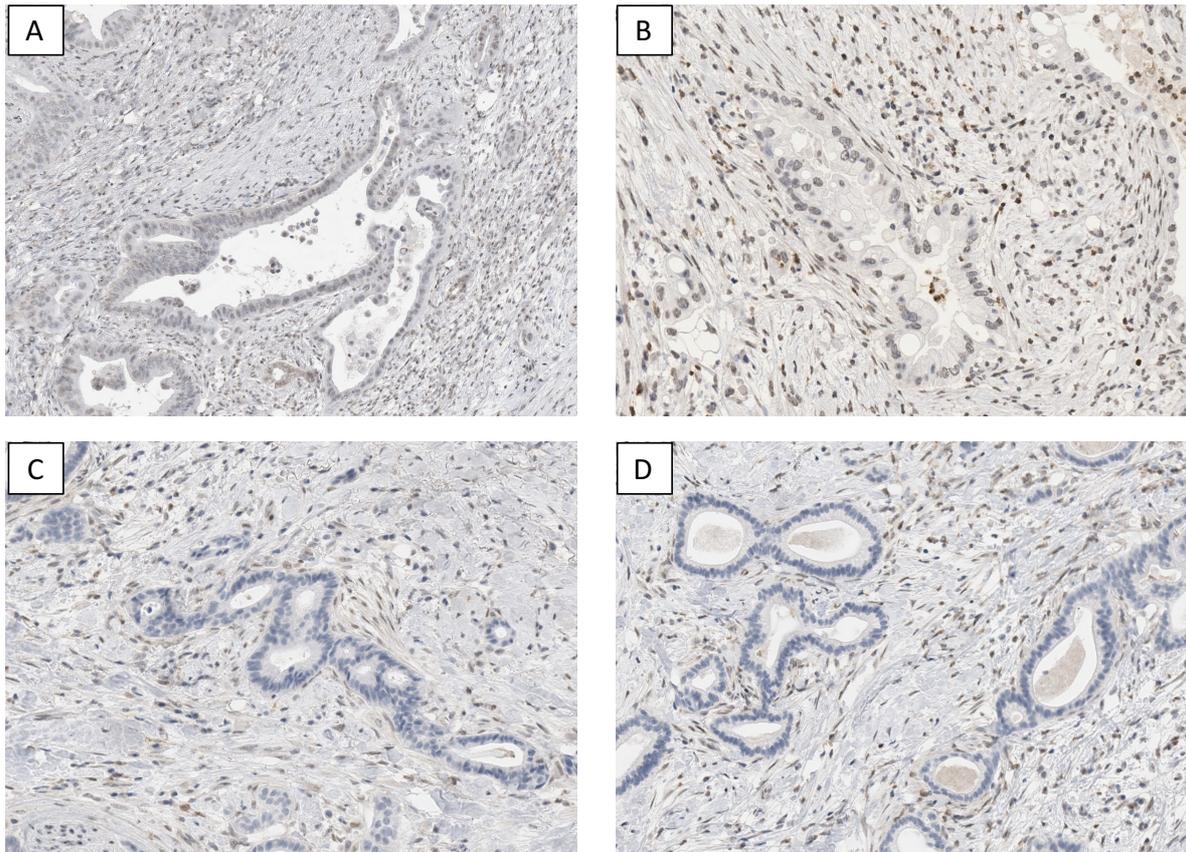


Abbildung 19: Immunhistochemische Analyse des SMAD4 Proteins

Abbildung in Anlehnung an Schlitter, Segler et al. 2017.

Unterschiedliche immunhistochemische SMAD4 Markierungsmuster des PDACs.

A. Starke nukleäre und zytoplasmatische Anreicherung von SMAD4 in neoplastischen Drüsen hinweisend auf ein intaktes Protein (10x). **B.** Starke nukleäre und zytoplasmatische Anreicherung von SMAD4 in neoplastischen Drüsen hinweisend auf ein intaktes Protein (20x). **C.** Fehlende immunhistochemische Markierung des SMAD4 Proteins in >90% der neoplastischen Zellen hinweisend auf eine Deletion oder inaktivierende Mutation des Gens (10x). **D.** Fehlende immunhistochemische Markierung des SMAD4 Proteins in >90% der neoplastischen Zellen hinweisend auf eine Deletion oder inaktivierende Mutation des Gens (20x).

5.3.5 TP53

Die Analyse von *TP53* erfolgte durch Kombination von Immunhistochemie und Sequenzierung nach Sanger.

Die Immunhistochemie wurde insgesamt in 76,8% (136/177) als auffällig gewertet. Davon zeigte sich in 50,8% (90/177) eine nukleäre Überexpression von TP53 während 26,0% (46/177) negativ waren. Beides wurde als auffällige Expression von TP53 gewertet. In 23,2% (41/177) der Fälle zeigte sich eine schwache basale TP53 Expression, die als intakt gewertet wurde.

Durch die Sequenzierung der Exone 5-9 wurden in 55,9% (99/177) Mutationen gefunden, während in 44,1% (78/177) in diesen Exonen eine Wildtyp-Sequenz

zeigten. Dabei traten in drei Fällen zwei Mutationen gleichzeitig auf, so dass sich die Gesamtzahl der detektierten Mutationen auf 102 belief. Davon befanden sich mit 34,3% (35/102) die meisten Mutationen in Exon 5, gefolgt von Exon 6 mit 26,5% (27/102), Exon 7 mit 20,6% (21/102) und Exon 8 mit 18,6% (19/102). In Exon 9 konnten keine Mutationen nachgewiesen werden. Die Verteilung der verschiedenen Mutationen auf die Exone ist in Tabelle 18 detailliert aufgeführt. Hierbei ist anzumerken, dass die meisten Mutationen einzeln verteilt über das Gen auftraten, während sich aber auch *Hotspots* mit häufig mutierten Genloci zeigten. Dazu zählten p.R175H mit 7,8% (8/102), p.R248Q und p.R273H mit je 5,9% (6/102), p.R213R und p.Y220C mit je 4,9% (5/102), sowie p.R213X mit 2,9% (3/102). Insgesamt war damit der häufigste Mutationstyp die *Missense*-Mutation mit 67,6% (69/102), des Weiteren verteilten sich die Mutationen auf 11,8% (12/102) *Nonsense*- Mutationen, 8,8% (9/102) *Silent*-Mutationen, 7,8% (8/102) *Frameshift*-Mutationen, 2,0% (2/102) *Splice site*-Mutationen und 1,0% (1/102) Deletion.

Insgesamt wurde *TP53* als mutiert gewertet, wenn die Immunhistochemie auffällig war und/oder sich eine Mutation in Exon 5-9 fand. Fälle mit *Silent*- Mutationen wurden als nicht mutiert gewertet. Von den untersuchten PDACs waren so insgesamt 78,5% (139/177) mutiert und 21,5% (38/177) zeigten eine Wildtyp-Sequenz. Dabei wurde zwischen zwei Mutationsvarianten unterschieden. Mutationsvariante 1 trat in 52,0% (92/177) der Fälle auf und zeigte eine immunhistochemische Überexpression oder eine *Missense*-Mutation, Mutationsvariante 2 machte 26,6% (47/177) aus und war durch einen kompletten Ausfall der immunhistochemischen TP53 Expression oder eine *Nonsense*-, *Frameshift* - oder *Splice site*-Mutation oder Deletion geprägt.

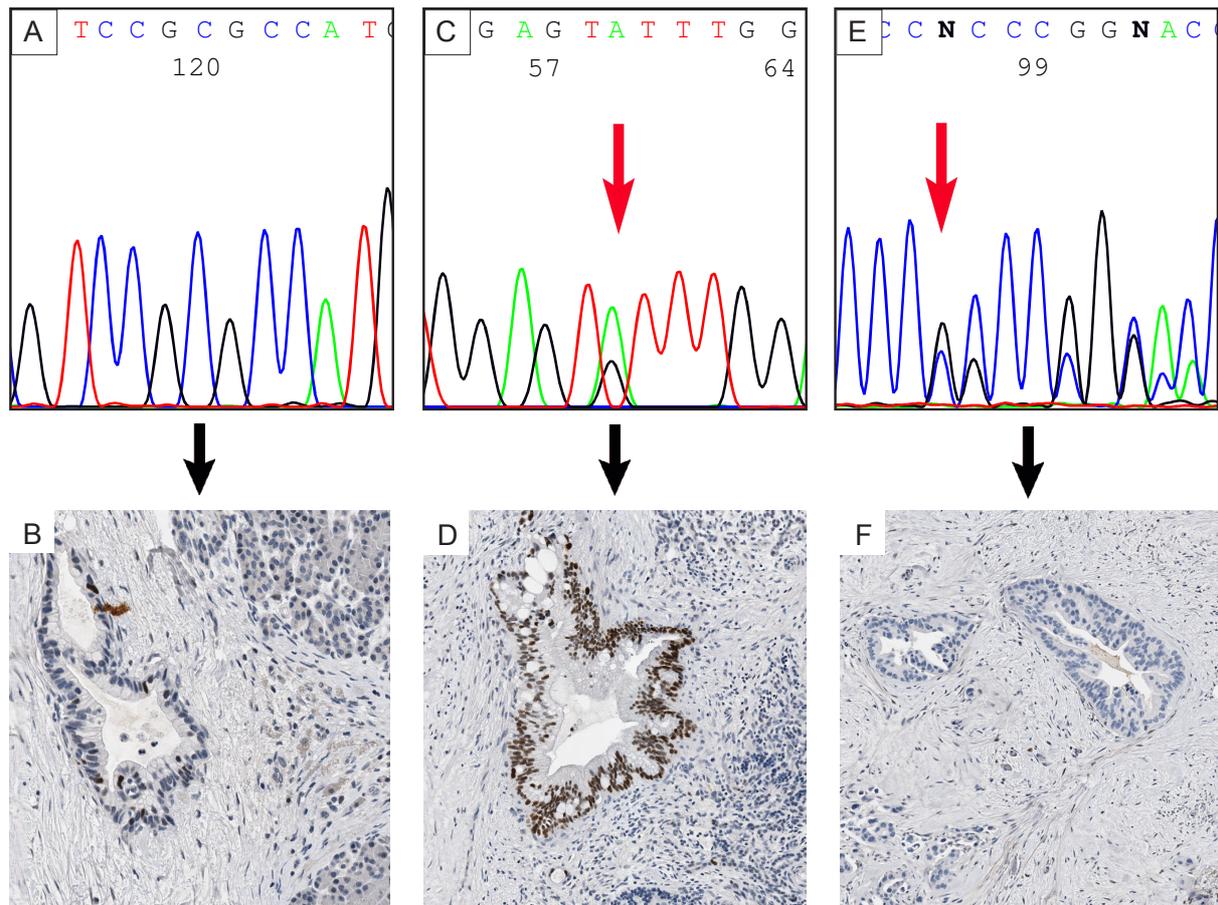


Abbildung 20: Verschiedene TP53 Mutationstypen in der Sangersequenzierung mit korrespondierender immunhistochemischer Expression von TP53

A. und B. TP53 Wildtyp: Sequenz ohne Mutation und moderate nukleäre Akkumulation von TP53 in etwa 10% der neoplastischen Zellen. **C. und D.** TP53 Mutation Typ 1: Sequenz mit *Missense*-Mutation (p.Y205C in Exon 6) und robuster nukleärer Akkumulation des immunhistochemisch gefärbten Proteins in 80%. **E. und F.** TP53 Mutation Typ 2: Intragenetische *Deletion*, *Nonsense*-, *Frameshift*- oder *Splice site*-Mutation (exemplarisch dargestellt: Insertion-*Frameshift*- Mutation p.P153*fs28 in Exon 5) und kompletter Verlust der immunhistochemischen Färbung der neoplastischen Drüsen.

Tabelle 18: Verteilung der TP53 Mutationen (N= 102)

EXON 5				EXON 6				EXON 7				EXON 8			
Mutation	Mutationstyp	N	%	Mutation	Mutations typ	N	%	Mutation	Mutations typ	N	%	Mutation	Mutations typ	N	%
p.A129V	Missense	1	1,0%	p.Q192X	Nonsense	1	1,0%	p.M237I	Missense	1	1,0%	p.R273C	Missense	1	1,0%
p.N131_P14 2del	Deletion	1	1,0%	p.H193R	Missense	1	1,0%	p.C238Y	Missense	2	2,0%	p.R273H	Missense	6	5,9%
p.V143L	Missense	1	1,0%	p.R196X	Nonsense	1	1,0%	p.S240F	Missense	1	1,0%	p.C275R	Missense	1	1,0%
p.Q144X	Nonsense	1	1,0%	p.L201X	Nonsense	1	1,0%	p.G244fs* 3	Frameshift	1	1,0%	p.A276G	Missense	1	1,0%
p.W146X	Nonsense	1	1,0%	p.V203fs*5	Frameshift	1	1,0%	p.G245S	Missense	2	2,0%	p.P278L	Missense	2	2,0%
p.S149fs*21	Frameshift	1	1,0%	p.E204X	Nonsense	1	1,0%	p.G245V	Missense	1	1,0%	p.P278R	Missense	1	1,0%
p.S149S	Silent	1	1,0%	p.Y205C	Missense	1	1,0%	p.M246V	Missense	1	1,0%	p.D281Y	Missense	1	1,0%
p.P151S	Missense	1	1,0%	p.R209fs*6	Frameshift	1	1,0%	p.R248Q	Missense	6	5,9%	p.R282W	Missense	2	2,0%
p.P152L	Missense	1	1,0%	p.R213X	Nonsense	3	2,9%	p.R248W	Missense	2	2,0%	p.R283P	Missense	1	1,0%
p.P152S	Missense	1	1,0%	p.R213R	Silent	5	4,9%	p.P250L	Missense	1	1,0%	p.E286K	Missense	1	1,0%
p.P153fs*28	Frameshift	2	2,0%	p.S215R	Missense	1	10%	p.L257Q	Missense	1	1,0%	p.N288fs*5 7	Frameshift	1	1,0%
p.P153L	Missense	1	1,0%	p.V216M	Missense	1	1,0%	p.E258X	Nonsense	2	2,0%	p.301*fs44	Frameshift	1	1,0%
p.G154S	Missense	1	1,0%	p.V216G	Missense	1	1,0%								
p.R156P	Missense	1	1,0%	p.Y220C	Missense	5	5,1%								
p.A159V	Missense	2	2,0%	p.Y220N	Missense	1	1,0%								
p.Y163C	Missense	1	1,0%	p.IVS7- 1G>T	Splice site	2	2,0%								
p.Y163N	Missense	1	1,0%												
p.Q165X	Nonsense	1	1,0%												
p.T170T	Silent	1	1,0%												
p.V173E	Missense	1	1,0%												
p.V173L	Missense	1	1,0%												
p.R175H	Missense	8	7,8%												
p.C176F	Missense	1	1,0%												
p.C176C	Silent	1	1,0%												
p.P177P	Silent	1	1,0%												
p.R181C	Missense	1	1,0%												
Total		35				27				21				19	

5.3.6 Mutationsanzahl

Die untersuchten PDACs zeigten insgesamt eine hohe Mutationsrate (Tabelle 19 und Abbildung 21). Etwa die Hälfte der Fälle wiesen Mutationen in drei der vier Genen (48,0% (85/177)) auf und jeder fünfte Fall wies sogar Veränderungen in allen vier untersuchten Genen auf (20,3% (36/177)). Weiter zeigten sich Veränderungen in zwei Genen in 26,6% (47/177). Nur eine geringe Anzahl der Tumoren zeigte Veränderungen in nur einem Gen (4,5% (8/177)) und in einem einzigen Fall war sogar keines der vier Gene verändert (0,6% (1/177)). Dieses Ergebnis wurde durch *Next-Generation Sequenzierung* bestätigt.

Tabelle 19: Verteilung der Mutationen

Mutationen	N	%
0/4	1	0,6%
1/4	8	4,5%
2/4	47	26,6%
3/4	85	48,0%
4/4	36	20,3%

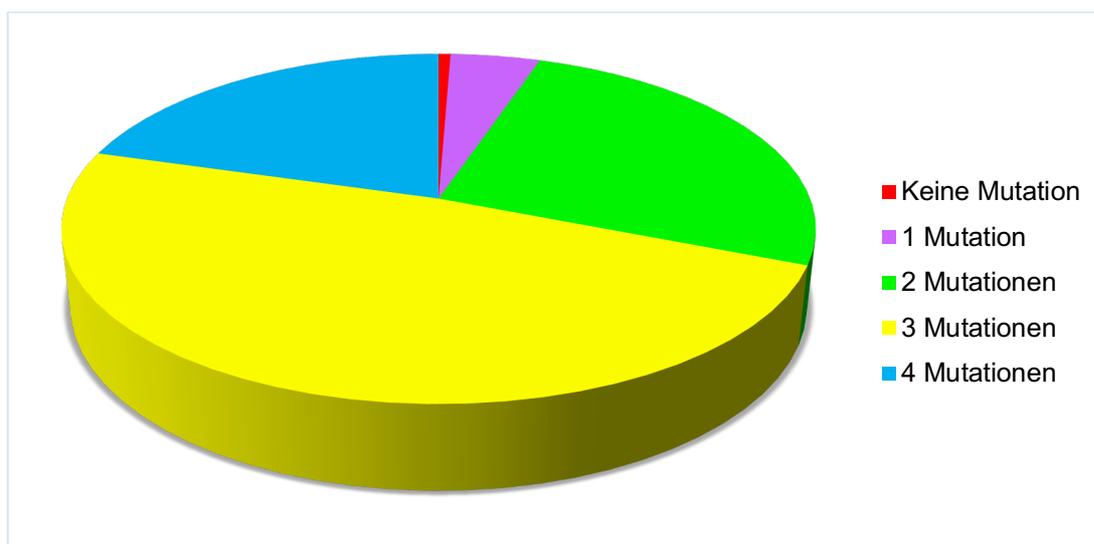


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Verteilung der Mutationen

Darstellung der Mutationszahl der vier untersuchten Schlüsselgene (KRAS, TP53, P16/CDKN2A, SMAD4) in den untersuchten PDACs.

5.3.7 Ergebnisse der *Next-Generation* Sequenzierung

In 3 Fällen wurde eine elektive *Next-Generation* Sequenzierung durchgeführt, da die Ergebnisse der molekularen Analyse bezüglich des *KRAS* Gens unklar waren (siehe Tabelle 20). In zwei Fällen (#5, #190) zeigten sich in der Sanger Sequenzierung sehr schwache Signale, die zunächst als Wildtyp gewertet wurden, so dass sich in einem Fall (#5) eine Diskrepanz zwischen der Metastase und dem Primärtumor ergab (siehe auch 5.3.8.). In der *Next-Generation* Sequenzierung zeigten sich dann jedoch zwei *low level* Mutationen von 3% (#5) und 6% (#190), so dass die schwachen Signale der Sanger Sequenzierung rückblickend als genetische Veränderungen gewertet werden konnten. In einem dritten Fall (#62) konnten mit den angewendeten Methoden in keinem der vier untersuchten Gene Veränderungen detektiert werden. Dies bestätigte sich in der *Next-Generation* Sequenzierung, für die eigens nochmals Tumor DNA extrahiert worden war. Somit widersprach die *Next-Generation* Sequenzierung in keinem der Fälle den Ergebnissen der konventionellen Untersuchungen.

5.3.8 Analyse der Metastasen

In der untersuchten Patientenkohorte wiesen insgesamt 11 Patienten zum Zeitpunkt der Operation Fernmetastasen auf, davon sechs in der Leber, vier Peritonealmetastasen und eine Lungenmetastase. In vier von 11 Fällen war ausreichend metastatisches Gewebe für molekulare Analysen vorhanden (drei Lebermetastasen und eine Peritonealmetastase). Es wurden Analysen nach den oben beschriebenen Protokollen durchgeführt. In allen vier untersuchten Fällen fand sich in der Metastase dieselbe *KRAS* Mutation wie im Primarius. Im Fall #5 war eine *low level* *KRAS* Mutation im Primärtumor (p.G12D, 3%) mit einer *high level* Mutation (p.G12D) in der Lebermetastase assoziiert. Im Fall #9 zeigte sich *TP53* im Primärtumor intakt, während sich in der Peritonealmetastase eine starke nukleäre Akkumulation (>90%) zeigte.

Tabelle 20: Ergebnisse der *Next-Generation* Sequenzierung

ID	Indikation für NGS	KRAS		P16/CDKN2A		TP53		SMAD4		Andere
		HRMA, Sanger Sequenzierung	NGS	IHC, LOH	NGS		NGS		NGS	NGS
# 5	Diskrepanz zwischen Primärtumor und Metastase	Primärtumor: wt Signal; Leber Metastase: p.G12D (<i>High level</i>)	Primärtumor: p.G12D (<i>Low level</i> , 3%)	intakt	p.A148T (polym.)	intakt	p.P72R (polym.)	intakt	intakt	keine
# 62	KRAS, P16/CDKN2A, SMAD4 und TP53 intakt	intakt	intakt	intakt	intakt	intakt	p.P72R (polym.)	intakt	intakt	keine
# 190	Schwaches Signal in Sanger Sequenzierung von KRAS	Schwaches Signal (siehe Abbildung 17)	p.G12C (<i>Low level</i> , 6%)	intakt	intakt	intakt	p.P72R (polym.)	intakt	intakt	RNF43: p.R117H; ERBB2: p.I655V

Tabelle 21: Vergleich des genetischen Profils von ausgewählten Primärtumoren und Fernmetastasen

ID		Sex	Alter	Überlebenszeit (Monate)	Neoadjuvante CTX	Grading	pT	pN	pM	SMAD4	TP53	KRAS	KRAS Detail	P16/CDKN2A	Morphologie	Kommentar
# 5	Primarius	M	68	17,8	ja	G2	T3	N0	M1	intakt	intakt	verändert	p.G12R (Low level Mut, 3%)	intakt	Konventionelles PDAC mit klarzelliger Komponente	IPMN (pankreatobiliärer Typ) assoziiert mit PDAC
	Leber Metastase									intakt	intakt	verändert	p.G12R	intakt		
# 9	Primarius	M	66	10,9	keine	G2	T3	N1	M1	verändert	intakt	verändert	p.G12R	verändert	Konventionelles PDAC	
	Peritoneal Metastase									verändert	Mut 1	n.a.	n.a.	intakt		
# 53	Primarius	M	57	12,3	keine	G2	T3	N1	M1	verändert	Mut 1	verändert	p.G12V	verändert	Konventionelles PDAC mit gyriformer Komponente	
	Leber Metastase									verändert	Mut 1	n.a.	n.a.	verändert		
# 70	Primarius	F	83	11,3	keine	G3	T3	N1	M1	intakt	Mut 2	verändert	p.G12V	intakt	Konventionelles PDAC duktal	
	Leber Metastase									intakt	Mut 2	verändert	p.G12V	intakt		

5.4 Korrelation von Morphologie und Genstatus

Insgesamt wiesen die PDACs sowohl morphologisch als auch genetisch ein heterogenes Bild auf.

Die kombinierten PDACs mit zusätzlicher Wachstumskomponente waren im Vergleich zu den konventionellen PDACs mit einer signifikant höheren P16/*CDKN2A* Mutationsrate assoziiert ($p=0,016$) (siehe Tabelle 22).

Im Vergleich zwischen den kombinierten mit den konventionellen PDACs zeigten sich keine signifikanten Auffälligkeiten bezüglich der Verteilung von *KRAS*, *TP53* und *SMAD4*.

Im Vergleich zwischen den kombinierten und konventionellen PDACs mit den homogenen Varianten, zeigte sich eine signifikant niedrigere *KRAS* Mutationsrate ($p=0,035$) als auch eine niedrigere Gesamtzahl an Mutationen bei den Varianten ($p=0,04$) (siehe Tabelle 23). Im Bezug auf die anderen untersuchten Gene ergaben sich keine Auffälligkeiten.

Des Weiteren waren alle papillären Karzinome mit einer *KRAS* sowie einer P16/*CDKN2A* Mutation assoziiert (6/6). Ebenso wurden in beiden adeosquamösen Karzinomen Veränderungen in *KRAS* und P16/*CDKN2A* detektiert (2/2).

Bei den tubulären Karzinomen wurde eine geringe Häufigkeit an genetischen Veränderungen festgestellt. Alle drei Karzinome (100% (3/3)) wiesen weder Veränderungen in *TP53* noch in *SMAD4* auf, 66,6% (2/3) der Patienten hatten eine *KRAS* Mutation und 33,3% (1/3) auch eine Veränderung in P16/*CDKN2A* (siehe Tabelle 23). Ein Fall (# 62) wies sogar keine der drei Veränderungen auf. Das Ergebnis wurde durch *Next-Generation* Sequenzierung bestätigt und es zeigten sich hierbei auch keine Mutation in anderen 40 häufige veränderter Gene des PDACs (siehe Tabelle 20).

Innerhalb aller P16/*CDKN2A* intakten Fälle handelte es sich mehrheitlich zu 65,9% (27/41) um konventionelle PDACs und zu 26,8% (11/41) um kombinierte PDACs mit klarzelligen (4/41), papillären (4/41), kribriformen (2/41) und gyriformen (1/41) Wachstumskomponenten. Zu den P16/*CDKN2A* negativen Fällen zählten außerdem ein kolloidales und zwei der tubulären Karzinome.

Innerhalb der kleinen Kohorte der Fälle mit intaktem *KRAS* handelte es sich ebenfalls mehrheitlich um konventionelle PDACs (10/13). Das medulläre, ein kolloidales/muzinöses, sowie einer der drei tubulären Karzinome waren ebenfalls *KRAS* Wildtyp.

Tabelle 22: Vergleich zwischen morphologischem Subtyp, Genotyp und Überleben

	N	Genotyp			P16/CDKN2A			Anzahl veränderter Gene							
		KRAS	Intakt	Verändert	p- Wert	Intakt	Verändert	p- Wert	p- Wert	0	1	2	3	4	p- Wert
A: klassische PDACs															
<i>A1: konventionelle PDAC</i>	91	7	84		29	62				0	5	30	40	16	
<i>A2: kombinierte PDACs</i>	72	3	69	A1 vs. A2 0,35	11	60	A1 vs. A2 0,016	A: 0,98	0	1	14	40	17	A1 vs. A2 0,09	
B: Homogene Varianten	14	3	11	A vs. B 0,035	3	11	A vs. B 0,78	B: 0,51	1	2	3	5	3	A vs. B 0,004	

Tabelle 23: Klinische, pathologische und molekulare Eigenschaften der tubulären Pankreaskarzinome

ID	Geschlecht	Alter	Überleben (Monate)	Lokalisation/ Größe	Grading	pT	pN	pM	KRAS	TP53	P16/CDKN2A	SMAD4
# 44	F	82,6	19,3	Kopf/ 4,2	G1	T3	N1	M0	Mut (p.G12V)	intakt	verändert	intakt
# 62	M	74,9	>68,6 noch am Leben	Kopf/ 3,8	G1	T3	N0	M0	wt	intakt	intakt	intakt
#190	M	50,0	>55,3 noch am Leben	Kopf/ 3,5	G1	T3	N1	M0	Mut (p.G12C <i>Low level</i> Mutation 6%)	intakt	intakt	intakt

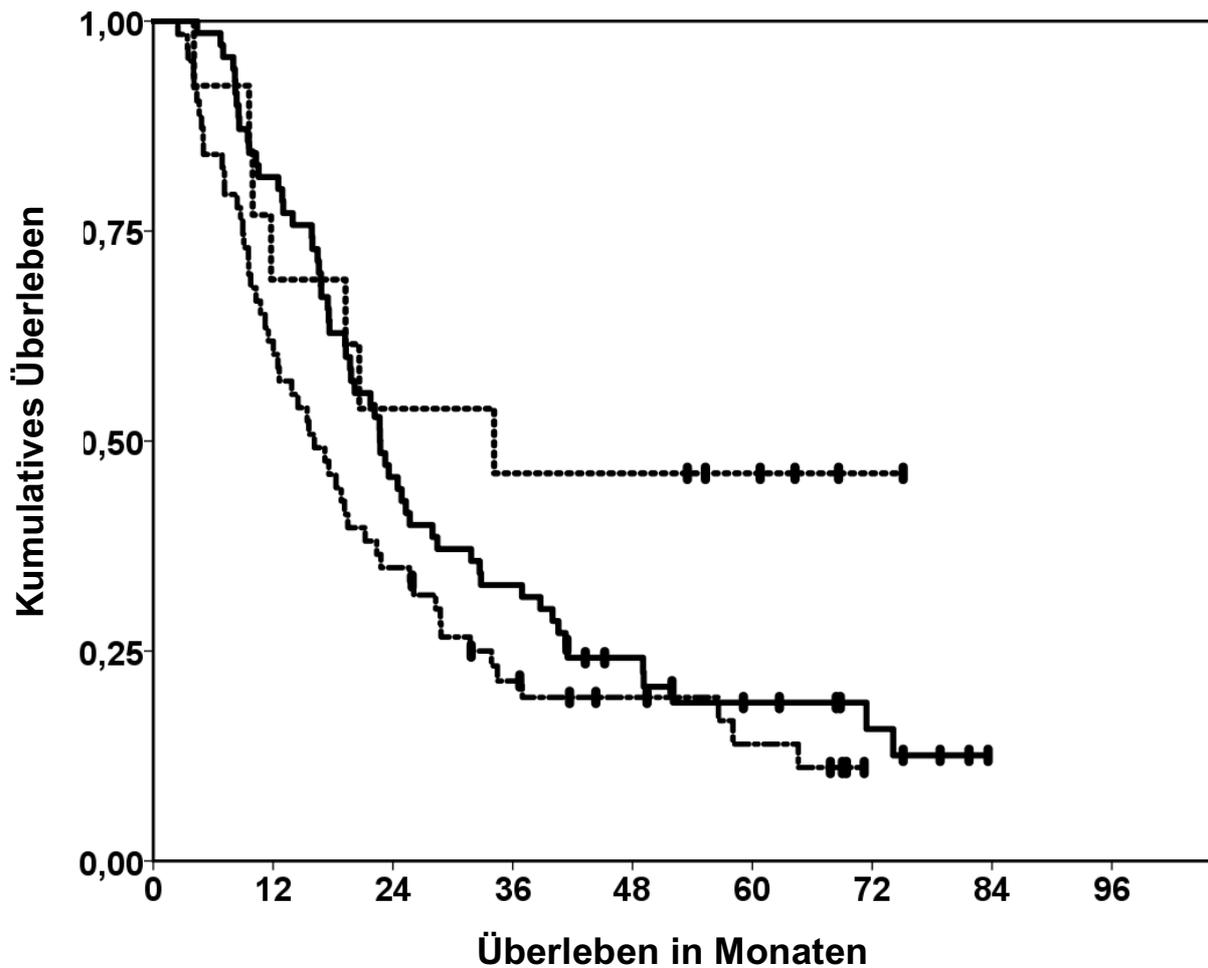
5.5 Klinisch-pathologische Korrelationen

Die morphologischen und molekularen Eigenschaften der Patienten wurden mit dem klinischen Verlauf korreliert. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchung wiedergegeben.

5.5.1 Korrelation von Morphologie und klinischem Verlauf

Beim Vergleich der morphologischen Subgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede im Überleben (Homogene Varianten >34,1 vs. konventionelle PDACs 22,7 vs. kombinierte PDACs 15,5 Monate, $p=0,035$) (siehe Tabelle 14 und Abbildung 22). Im Detail zeigten das medulläre sowie die zwei muzinösen/kolloidalen Karzinome ein längeres Überleben (>64,3 Monate, >75,1 Monate und >58,0 Monate) als die Patienten mit adenosquamösen PDACs (4,1 und 10,0 Monate) (siehe Tabelle 14). Zwei der drei Patienten mit tubulärem Karzinom waren außerdem bei Abschluss der Studie noch am Leben (>68,8 und 55,3 Monate). Der dritte Patient überlebte 19,3 Monate.

Innerhalb der konventionellen PDACs überlebten die Patienten mit konventionellen PDACs und Patienten mit einem kombinierten PDACs mit einer kribriformen Wachstumskomponente am besten (22,7 Monate und 28,7 Monate) (siehe Tabelle 14). Deutlich schlechter war die Prognose der Fälle mit gyriformen und komplexen Wachstumskomponenten (gyriform: 12,5 und komplex: 10,7 Monate, HR 4,3, $p<0,001$, KI 2,3-8,5) (siehe Tabelle 24).



..... Varianten (n=14) vs. ---- Konventionelle duktales Adenokarzinome (n=72) vs.
— Kombinierte duktales Adenokarzinome (n=91).

Medianes Überleben: >34,1 vs. 22,7 vs. 15,5 Monate
Log-rank Test 0,035

Abbildung 22: Überleben in Abhängigkeit von der morphologischen Subtypisierung.

Signifikante Korrelation zwischen dem medianen Überleben und dem morphologischen Subtyp.

Tabelle 24: Zusammenhänge zwischen Wachstumskomponenten des kombinierten PDACs und dem Überleben im Cox Regressions Modell

Wachstumskomponente	p- Wert	Risiko	KI
Mit klarzelliger Komponente	0,10	1,7	0,9-3,2
Mit papillärer Komponente	0,58	1,2	0,6-2,3
Mit kribriformer Komponente	0,78	0,9	0,5-1,7
Mit komplexer Komponente	<0,001	4,3	2,2-8,5
Mit gyriformer Komponente	0,26	1,7	0,7-4,3
Mit mikropapillärer Komponente	0,831	0,8	0,1-5,8

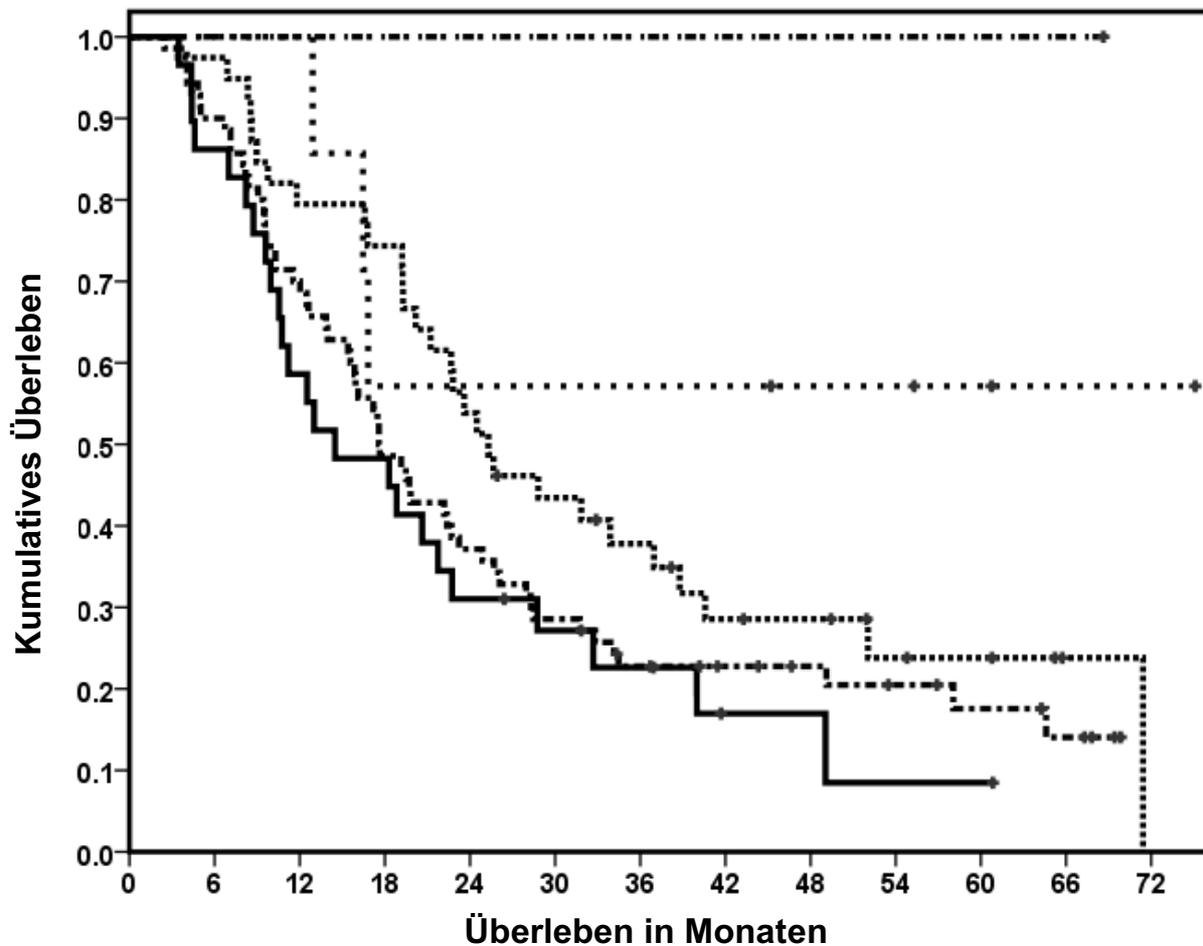
5.5.1.1 Klinik der tubulären Karzinome

Die Patienten mit tubulären Karzinomen zeigten insgesamt einen guten klinischen Verlauf mit bis zu >68,8 Monaten Überleben (siehe Abschnitt 5.5.1 und Tabelle 23).

5.5.2 Korrelation von Genetik und klinischem Verlauf

5.5.2.1 Anzahl der Genveränderungen

Das mediane Überleben der Patienten korrelierte signifikant mit der Anzahl der Veränderungen. Es zeigt sich eine Verschlechterung des Überlebens mit zunehmender Anzahl der Mutationen. Ein Patient ohne Mutation war zu Abschluss der Studie noch am Leben (mindestens 67 Monate), während Patienten mit nur einer Mutation mindestens 45 Monate, Patienten mit zwei Mutation mindestens 25,3 Monate, Patienten mit drei Mutationen mindestens 17,6 Monate und Patienten mit allen vier Mutationen jeweils nur mindestens 14,5 Monate überlebten ($p=0,04$).



-- -- Keine Mutation (n=1) vs. 1 Mutation (n=8) vs. ---- 2 Mutationen (n=47) vs. -.-.-.- 3 Mutationen (n=85) vs. — 4 Mutationen (n=36)

Medianes Überleben: >76 vs. 45,0 vs. 25,3 vs. 17,6 vs. 14,5 Monate
Log-rank Test 0,04

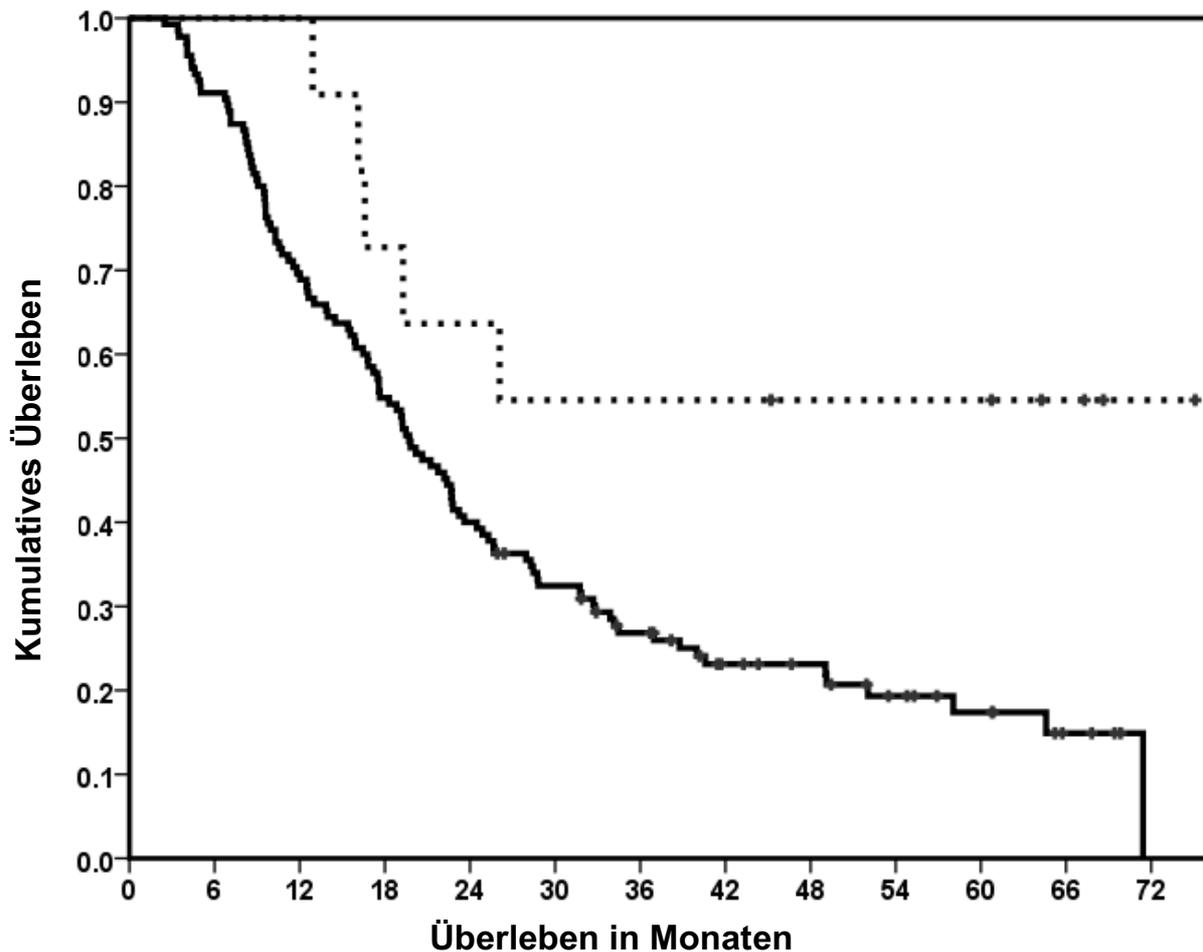
Abbildung 23: Überleben in Abhängigkeit von der Mutationsverteilung.

Signifikante Korrelation zwischen dem medianen Überleben der Patienten und der Anzahl der Mutationen.

5.5.2.2 KRAS

Patienten mit intaktem *KRAS* (Wildtyp) lebten deutlich länger als Patienten mit Mutation im *KRAS Gen*. Das mittlere Überleben unterschied sich mit mehr als >45 Monaten im Vergleich zu 19,7 Monaten deutlich. Der p-Wert des Log-rank Tests lag bei 0,01 und war damit signifikant. Die Gruppe der *KRAS* Wildtyp Patienten unterschied sich dabei nicht wesentlich in anderen Parametern, wie Tumorstadium, Lymphknotenbefall, Grading und Alter der Patienten, wie im Chi-Quadrat Test

nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 25). In dem multivariablen Cox *Regressions* Modell zeigte sich der *KRAS* Status insgesamt als unabhängiger prognostischer Faktor ($p=0,019$, HR 1,8).



---- Wildtyp (n=11) vs. — Mutiert (n=135)

Medianes Überleben >45 Monate vs. 19,7 Monate
Log-rank Test 0,01

1-Jahres Überleben 100% vs. 69,6%
3-Jahres Überleben 54,5% vs. 26,8%
5-Jahres Überleben >45% vs. 17,4%

Abbildung 24: Überleben in Abhängigkeit von *KRAS*.

Patienten mit *KRAS* Wildtyp überleben signifikant länger als Patienten mit *KRAS* Mutation.

Tabelle 25: Vergleich verschiedener Parameter von Patienten mit Wildtyp *KRAS* und mutiertem *KRAS*

	Mutiert		Wildtyp		Chi-Quadrat/ Exakter Test nach Fisher
	N	%	N	%	
KRAS	162	91,50%	13	8,50%	
Geschlecht					0,09
männlich	86	52,4%	10	76,9%	
weiblich	78	47,6%	3	23,1%	
Mutationen					<0,001
0	0	0,0%	1	7,7%	
1	4	2,4%	4	30,8%	
2	43	26,2%	4	30,8%	
3	81	49,4%	4	30,8%	
4	36	22,0%	0	0,0%	
P16/CDKN2A					0,31
intakt	38	23,2%	5	38,5%	
verändert	125	76,2%	8	61,5%	
n.a.	1	0,6%	0	0,0%	
TP53					0,88
intakt	35	21,3%	3	23,1%	
verändert	129	78,7%	10	76,9%	
Mut 1	88	53,7%	4	30,7%	
Mut 2	41	25,0%	6	46,2%	
SMAD4					0,46
positiv	105	64,0%	7	53,8%	
negativ	59	36,0%	6	46,2%	
pT					0,62
1	4	2,4%	0	0,0%	
2	10	6,1%	1	7,7%	
3	131	79,9%	12	92,3%	
4	19	11,6%	0	0,0%	
pN					0,94
0	49	29,9%	4	30,8%	
1	115	70,1%	9	69,2%	
UICC (2009; 7. Auflage)					0,63
1	8	4,9%	0	0,0%	
2a	36	22,0%	4	30,8%	
2b	92	56,1%	8	61,5%	
3	18	11,0%	0	0,0%	
4	10	6,1%	1	7,7%	
Grading					0,28
1	11	6,7%	0	0,0%	
2	67	40,9%	8	61,5%	
3	86	52,4%	5	38,5%	

5.5.2.3 P16/CDKN2A

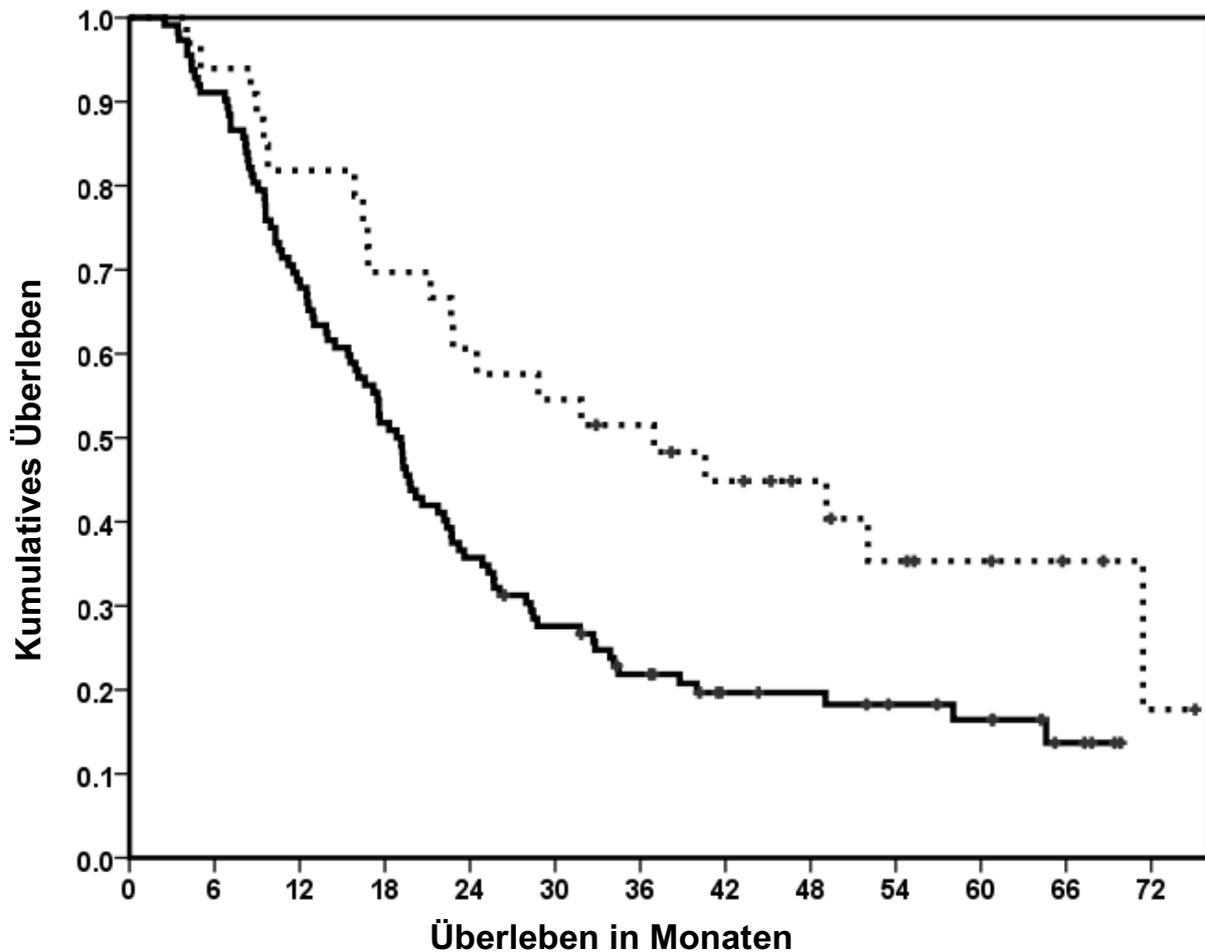
Patienten mit intaktem P16/CDKN2A lebten deutlich länger als Patienten mit detektierten Veränderungen in diesem Gen. Das mittlere Überleben in der Kaplan-Meier Methode unterschied sich mit 31,8 Monaten im Vergleich zu 18,8 Monaten deutlich (siehe Abbildung 25). Der p- Wert des Log-rank Tests lag bei 0,006 und war damit signifikant. Es zeigt sich aber keine Signifikanz im adjustierten Modell. Daher konnte P16/CDKN2A nicht als unabhängiger prognostischer Marker gewertet werden.

P16/CDKN2A zeigte sich außerdem signifikant mit einer höheren Rate an tumorpositiven Lymphknoten ($p= 0,02$) assoziiert (siehe

Tabelle 26).

Tabelle 26: Lymphknotenstatus und P16/CDKN2A

Gen	Status	N=177	%	Lymphknoten Status		
				N0	N1	p- Wert
P16/ CDKN2A	Intakt	43	24	19 (35,8%)	24 (19,5%)	0,02
	Verändert	133	75	34 (64,2%)	99 (80,5%)	
	n.a.	1	0,6			



---- Intakt (n=33) vs — Verändert (n=112)

Medianes Überleben 31,8 vs. 18,8 Monate

Log-rank Test 0,006

1-Jahres Überleben 81,8% vs. 68,8%

3-Jahres Überleben 51,5% vs. 21,9%

5-Jahres Überleben 35,3% vs. 16,4%

Abbildung 25: Überleben in Abhängigkeit von P16/CDKN2A

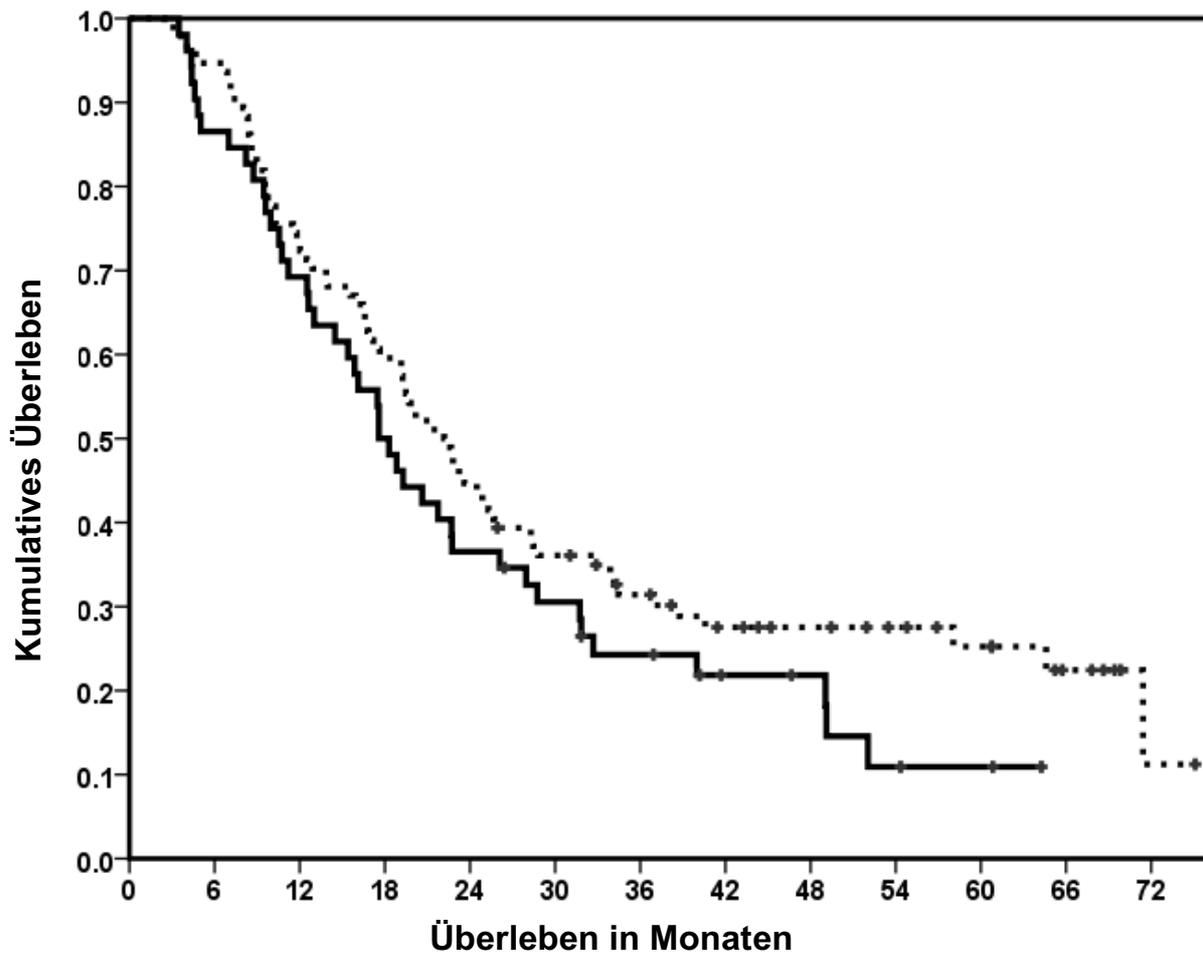
Patienten ohne Veränderungen in P16/CDKN2A überleben signifikant länger als Patienten mit Veränderungen in P16/CDKN2A.

5.5.2.4 SMAD4

Zwischen dem Überleben der Patienten mit intaktem SMAD4 und Verlust von SMAD4 zeigte sich ein leichter Unterschied, welcher jedoch nicht signifikant war (22,2 vs. 17,6 Monate, $p=0,15$).

Der Verlust von SMAD4 war mit einem lokal fortgeschritteneren Tumorstadium assoziiert (siehe

Tabelle 27).



---- intakt (n=94) vs. — Verlust (n=52)

Medianes Überleben: 22,2 vs. 17,6 Monate

Log-rank Test 0,15

1-Jahres Überleben 73,4% vs. 69,2%

3-Jahres Überleben 31,4% vs. 24,3%

5-Jahres Überleben 25,2% vs. 10,9%

Abbildung 26: Überleben in Abhängigkeit von SMAD4

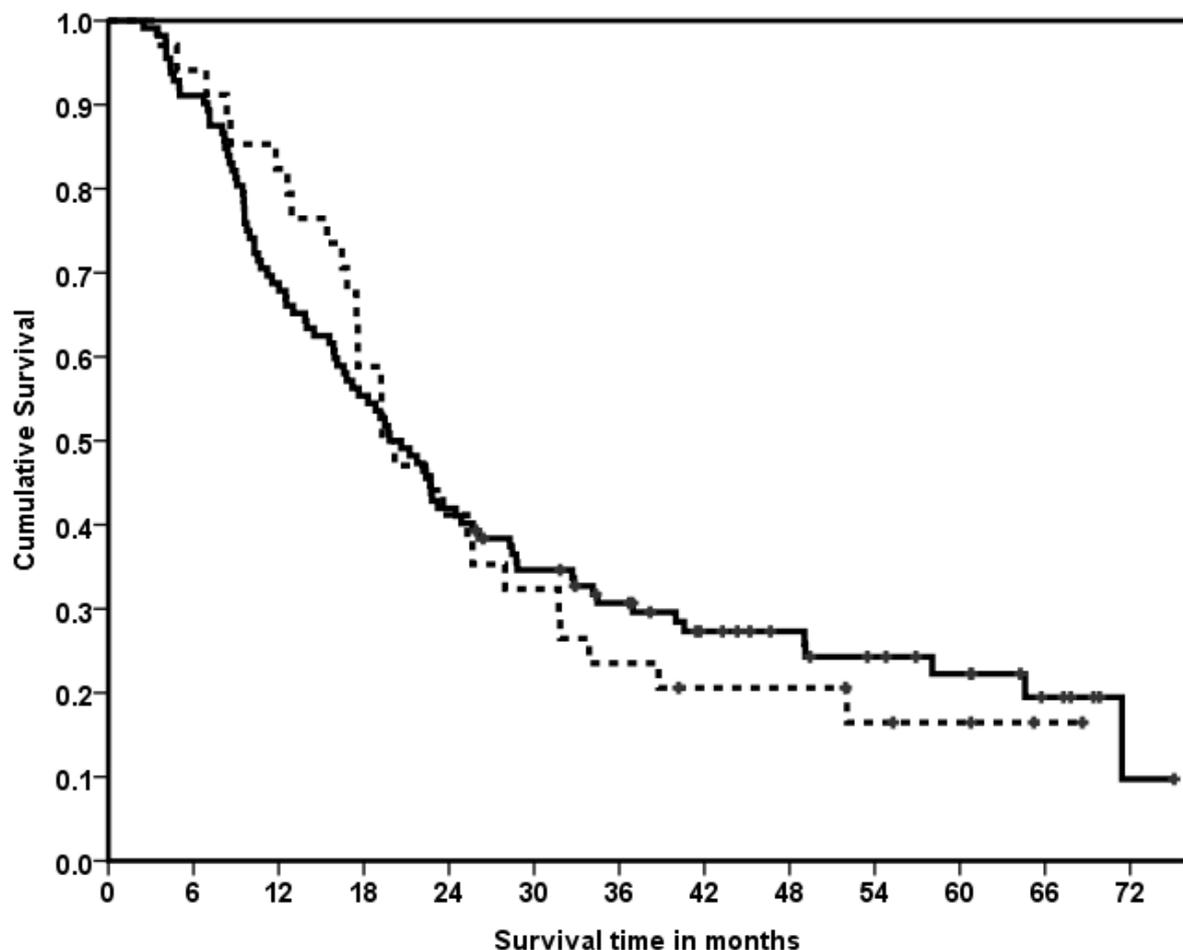
Der Verlust von SMAD4 korreliert nicht mit dem medianen Überleben der Patienten.

Tabelle 27: Kreuztabelle Tumorstadium und SMAD4 Status

SMAD4 Status		UICC					Total
		1	2a	2b	3	4	
verändert	Anzahl	1	11	38	9	6	65
	Erwartete Anzahl	2,9	14,7	36,7	6,6	4,0	65,0
	% innerhalb SMAD4	1,5%	16,9%	58,5%	13,8%	9,2%	100,0%
	% innerhalb UICC	12,5%	27,5%	38,0%	50,0%	54,5%	36,7%
intakt	Anzahl	7	29	62	9	5	112
	Erwartete Anzahl	5,1	25,3	63,3	11,4	7,0	112,0
	% innerhalb SMAD4	6,3%	25,9%	55,4%	8,0%	4,5%	100,0%
	% innerhalb UICC	87,5%	72,5%	62,0%	50,0%	45,5%	63,3%
total	Anzahl	8	40	100	18	11	177
	Erwartete Anzahl	8,0	40,0	100,0	18,0	11,0	177,0
	% innerhalb SMAD4	4,5%	22,6%	56,5%	10,2%	6,2%	100,0%
	% innerhalb UICC	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

5.5.2.5 TP53

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Überleben der Patienten mit *TP53* Mutationen im Vergleich zu den Patienten ohne Veränderungen in diesem Gen ($p=0,83$). Das mediane Überleben der einen Gruppe unterschied sich mit 19,2 Monaten kaum von dem der anderen Gruppe mit 19,8 Monaten.



----Intakt (n=34) vs. — Verändert (n=112)

Medianes Überleben 19,2 vs. 19,8 Monate

Log-rank Test 0,83

1-Jahres Überleben 82,4% vs. 68,8%

3-Jahres Überleben 23,5% vs. 30,7%

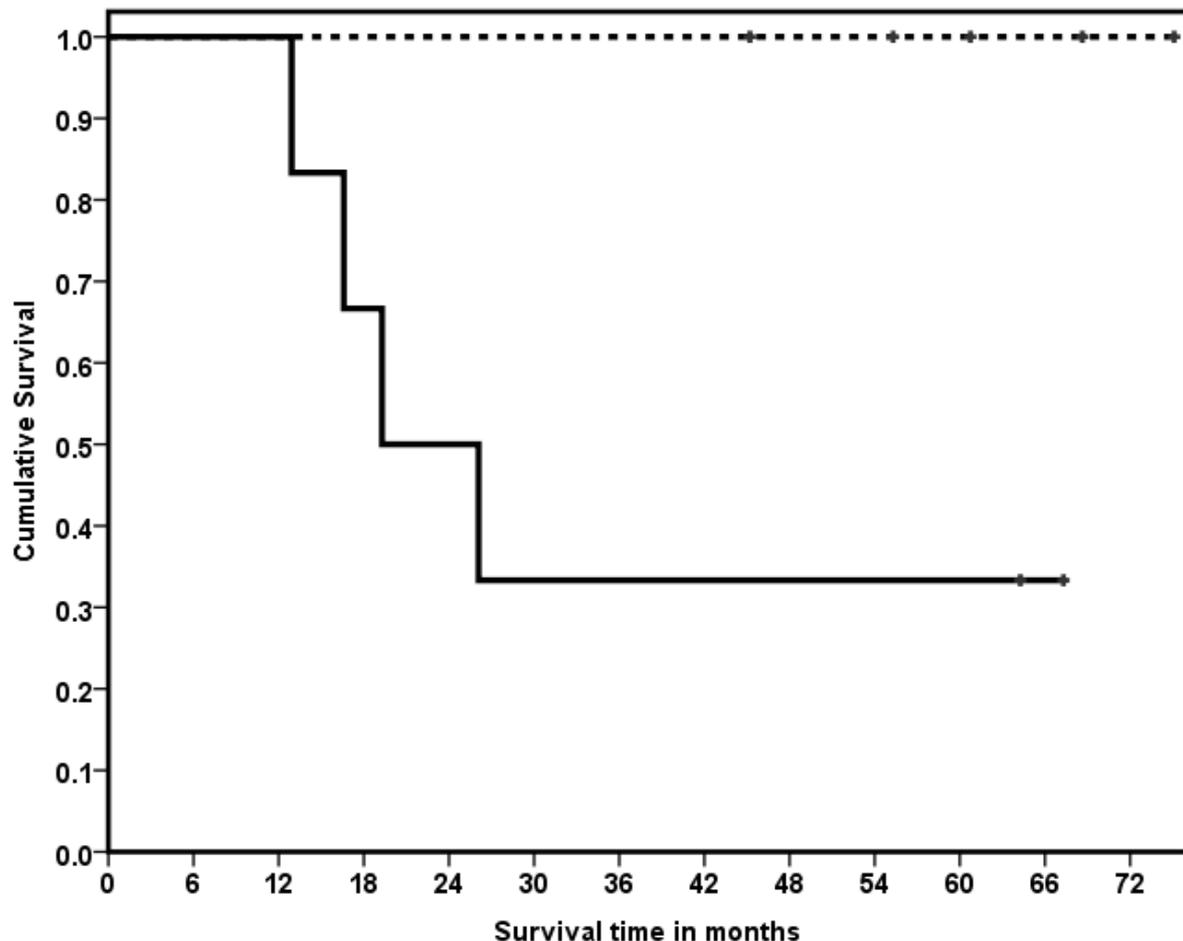
5-Jahres Überleben 16,5% vs. 22,3%

Abbildung 27: Überleben in Abhängigkeit von TP53

Veränderungen in TP53 korrelieren nicht mit dem medianen Überleben der Patienten.

5.5.2.6 Kombination von intaktem *KRAS* und *P16/CDKN2A*

Bei Kombination der Marker *KRAS* und *P16/CDKN2A* zeigte sich, dass Patienten mit intaktem *KRAS* und *P16/CDKN2A* deutlich besser überleben als Patienten mit Veränderungen in diesen Genen ($p = 0,017$). Die vier in die Überlebensanalysen eingeschlossenen Patienten ohne Veränderungen in diesen Genen waren bei Abschluss der Studie jeweils noch am Leben, so dass das mittlere Überleben nicht berechnet werden konnte.



---- KRAS und P16/CDKN2A intakt — KRAS und P16/CDKN2A verändert

Medianes Überleben: >45,3 vs. 21,1 Monate
Log-rank Test <0,001

Abbildung 28: Überleben von Patienten mit intaktem *KRAS* und intaktem *P16/CDKN2A*.

Alle Patienten ohne Veränderungen in *P16/CDKN2A* oder Mutationen in *KRAS* waren bei Abschluss der Studie noch am Leben.

5.5.3 Gesamtübersicht der signifikanten Parameter

Es zeigten sich im univariaten *Cox Regressions* Modell signifikante p- Werte für *KRAS*, *P16/CDKN2A*, die Anzahl der Mutationen, den Lymphknotenstatus und das Grading ($p= 0,018$; $0,006$; $<0,001$; $0,001$). Nur die *KRAS* Mutation ($p= 0,019$, HR: 2,77, 95%-KI: 1,11-6,9), der Lymphknotenstatus N1 ($p= <0,001$; HR 2,66, 59%-KI: 1,67-4,26) und das Grading G3 ($p= 0,001$, HR3,66, 59%-KI: 1,57-8,54) stellten sich

in einem multivariaten proportionalen *Cox Regressions* Modell als unabhängige Vorhersagewerte dar.

6 Diskussion

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist eine aggressive Erkrankung mit schlechter Prognose. Es stellt eine der tödlichsten soliden Krebserkrankungen in den Industrienationen dar (Siegel, Miller et al. 2015) und weist in Deutschland sogar die niedrigste Überlebensrate aller soliden Krebserkrankungen auf (Robert-Koch-Institut 2009/2010, Robert-Koch-Institut 2011/2012). Ursachen dafür sind zum einen die Verzögerung der Diagnosefindung durch späte und unspezifische Symptome. Zum anderen ist aber auch die aggressive Tumorbilogie, die durch frühes, invasives Wachstum und hohe Metastasierungsraten geprägt ist (Spath, Nitsche et al. 2015) für den schlechten Verlauf der Erkrankung entscheidend.

6.1 Individualisierte Medizin für das PDAC?

Während personalisierte Medizin für viele Krebserkrankungen, wie gastrointestinale Stromatumore, Mamma- oder Kolonkarzinome, bereits erfolgreich angewendet wird, stellt das individualisierte Management des PDACs nach wie vor eine große Herausforderung dar (Hortobagyi 2005, Tan and Du 2012, Tornillo 2014). Es fehlen verlässliche prognostische und prädiktive Marker für das PDAC, welche Rückschlüsse auf die Prognose oder das Ansprechen auf Medikamente zulassen. Die Definition von spezifischen Markern wird durch die Komplexität der Erkrankung erschwert, die sich durch ausgeprägte genetische Heterogenität auszeichnet. Pankreaskarzinome tragen im Schnitt 63 verschiedene Mutationen, die sich auf 12 Signalwege zurückführen lassen (Jones, Zhang et al. 2008). Dies verleiht den Tumoren eine große Plastizität und die Möglichkeit flexibel auf Einflüsse und Veränderungen zu reagieren. Im Rahmen spezifischer Therapien können die malignen Zellen beispielsweise die Blockade bestimmter Gene umgehen, indem sie auf andere *Down-stream targets* zurück greifen (Kulke, Blaszkowsky et al. 2007, da Cunha Santos, Dhani et al. 2010, Philip, Benedetti et al. 2010, Boeck, Jung et al. 2013).

6.1.1 Prognostische Marker für das PDAC

Verschiedene Studien haben bereits Zusammenhänge zwischen der Expression und dem Mutationsstatus der Schlüssel Suppressor- und Onkogene und dem Überleben der Patienten beschrieben, welche im Folgenden noch detaillierter erörtert werden (Yachida, White et al. 2012, Oshima, Okano et al. 2013). Aktuelle Studien belegen

deutlich, dass molekulare Subtypen mit prognostischer Relevanz existieren (Collisson, Sadanandam et al. 2011; Mirzoeva, Collisson et al. 2013). Collisson et al. gelang es durch die Kombination von Primärtumor-Analysen von PDACs sowie menschlichen und murinen Zelllinien molekulare Subtypen mit relevanten Unterschieden im klinischen Verlauf zu beschreiben.

6.1.2 Prädiktive Marker für das PDAC

Die durch die Arbeit von Collisson et al. beschriebenen Subtypen unterscheiden sich auch im Ansprechen auf Medikamente (Collisson, Sadanandam et al. 2011; Mirzoeva, Collisson et al. 2013). Weitere Studien, die diese Subtypen untersucht haben, bestätigen die Ergebnisse (Noll, Eisen et al. 2016). Beispielsweise waren Patienten mit Tumoren des exokrin-ähnlichen Subtyps therapieresistent für Tyrosinkinasaseinhibitoren und Paclitaxel. Dabei spielt möglicherweise die Expression und Induktion von Cytochrom P450 3A5 (CYP3A5) eine Rolle (Noll, Eisen et al. 2016).

Die Arbeiten von Collisson et al. und die daran anknüpfenden Arbeiten sind daher so wichtig, weil sie die Existenz prognostisch und prädiktiv relevanter Subtypen belegen. Bisher haben Ergebnisse dieser Studien kaum Einfluss auf das klinische Management. Aber wir wissen nun, dass die personalisierte Medizin für das PDAC grundsätzlich möglich ist (Collisson, Sadanandam et al. 2011; Mirzoeva, Collisson et al. 2013; Noll, Eisen et al. 2016). Entscheidend für die Entwicklung neuer individueller Therapieregime wird in Zukunft die genaue Definition relevanter Marker und der daraus resultierenden pharmakogenetischen Unterschiede sein. Die weitere Aufschlüsselung der heterogenen PDACs in bestimmte Subtypen mit präzisen Markern ist eine anspruchsvolle Aufgabe für die zukünftige Forschung. Durch das Verständnis der Heterogenität des PDACs können wir die Komplexität der Erkrankung überwinden und neue Angriffspunkte für die Klinik finden.

6.1.3 Existenz von Subtypen in dieser Studie?

In der vorliegenden im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführten Studie stellte sich das biologische Verhalten der Tumore sehr unterschiedlich dar, was die These der Existenz verschiedener Subtypen unterstützt. Der klinische Verlauf der 177 Patienten mit resektierten PDACs war wie erwartet insgesamt schlecht mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 20,5%. Allerdings wurde beobachtet, dass deutliche prognostische Unterschiede zwischen Patienten bestehen. Während 2/3 der Patienten

innerhalb der ersten 24 Monate verstarben, überlebten andere deutlich länger (siehe Abbildung 10). Einige Patienten in dieser Kohorte waren sogar nach vier oder mehr Jahren noch am Leben. Die entscheidende Frage ist nun aber, ob sich diese klinisch unterschiedlichen Fälle auch durch bestimmte Marker voneinander abgrenzen lassen. Und tatsächlich zeichneten sich einige Tumoren dieser Patienten durch eine spezielle Histologie und/ oder Molekularbiologie aus. Daraus können wiederum Rückschlüsse auf prognostisch relevante Marker und Merkmale gezogen werden

6.2 Existenz und Bedeutung morphologischer Subtypen des PDACs

In dieser Studie erfolgte die morphologische und molekulare Subtypisierung einer großen, gut charakterisierten Kohorte mit dem Ziel, prognostische Marker des PDACs zu definieren. Dabei wurde erstmals eine detaillierte morphologische Analyse in die Subtypisierung integriert, die eine relevante morphologische Heterogenität des PDAC zeigen konnte. Das Pankreaskarzinom ist also nicht nur von genetischer, sondern auch morphologischer Heterogenität geprägt.

Das duktales Adenokarzinom wird in der Literatur als invasive, maligne epitheliale Neoplasie mit glandulärer Differenzierung beschrieben (Solcia, Capella et al. 1997). Jedoch ist diese glanduläre Differenzierung zu gewissen Anteilen häufig aufgehoben oder verändert und die Erkrankung stellt sich unter dem Mikroskop sehr vielseitig dar. Das „klassische“ PDAC kann sich also facettenreich präsentieren und verschiedenste Wachstumsmuster ausprägen. Somit werden auch in der WHO zahlreiche Wachstumsmuster beschrieben, darunter klarzellige, kribriiforme, papilläre oder solide. Des Weiteren sind Varianten des PDACs beschrieben, welche einen geringeren Anteil (10%) ausmachen. Ihre Differenzierung von den klassischen PDACs ist sehr wichtig, da sie mit individuellen, signifikant besseren oder schlechteren, Prognosen einhergehen (Bosman, Carneiro et al. 2010). Es stellt sich die Frage, welche Bedeutung die histomorphologische Heterogenität des PDACs für die Erkrankung hat und ob neben den bekannten Varianten weitere morphologische Subtypen mit prognostischer Relevanz existieren (Wilentz, Goggins et al. 2000, Adsay, Pierson et al. 2001, Bosman, Carneiro et al. 2010).

Während sich zahlreiche Studien der Genetik des PDACs gewidmet und vielversprechende Ergebnisse erzielt haben, bleibt die Morphologie des PDACs ein

wenig erforschtes Gebiet. (Mirzoeva, Collisson et al. 2013; Collisson, Sadanandam et al. 2011; Jones, Zhang et al. 2008; Lee, Jang et al. 2007, Ogura, Yamao et al. 2013, Shin, Kim et al. 2013, Sinn, Striefler et al. 2014). Feakins et al. haben sich in einer Arbeit mit der Dokumentation und Beobachtung der verschiedenen histologischen Erscheinungsbilder des PDACs beschäftigt. Jedoch beschreibt auch diese Arbeit eher das Phänomen der morphologischen Heterogenität als es wirklich zu untersuchen (Feakins, Campbell et al. 2013). In einer weiteren Arbeit setzt sich Verbeke et al. mit der Frage auseinander, ob die Heterogenität des Pankreaskarzinoms relevant sei (Verbeke et al 2016). Sie stellt fest, dass der morphologischen Heterogenität als Marker für zu Grunde liegende genetische Veränderungen wenig Beachtung geschenkt werde, obwohl die Heterogenität des Pankreaskarzinoms zunehmend in Zusammenhang mit Ansprechen auf Therapien oder anderen Eigenschaften gesehen wird (Verbeke et al. 2016).

Die histopathologische Heterogenität des PDAC wurde bisher nicht detailliert untersucht und es fehlen genaue Definitionen. In dieser Arbeit wurde eine Systematik für die morphologische Subtypisierung entwickelt und die Pankreaskarzinome nach definierten Wachstumsmustern in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe beinhaltet die konventionellen PDACs, welche größtenteils aus gut bis moderat entwickelten glandulären Strukturen bestehen und wenig andere Strukturen zeigen. Die zweite Gruppe beinhaltet die kombinierten PDACs, welche sich durch eine weitere dominante histologische Komponente auszeichnen, die mindestens 30% des Tumorareals ausmacht. Darunter befinden sich Fälle mit klarzelligen, kribriformen, gyriformen, papillären, mikropapillären und komplexen Komponenten. Bei der dritten Gruppe handelt es sich um homogene Varianten des PDACs (z.B. das adenosquamöse Karzinom, das kolloidale Karzinom, das papilläre Karzinom) und spezielle Adenokarzinome wie das medulläre und das tubuläre Karzinom. Diese machen jedoch, wie oben beschrieben, nur einen geringen Anteil der Fälle aus. Durch die Analyse der Überlebensdaten der Patienten nach Zugehörigkeit zu einer morphologischen Subgruppe konnten wir belegen, dass zwischen den drei morphologischen Gruppen signifikante Unterschiede bestehen (Varianten >34,1 vs. konventionelle PDACs 22,7 vs. kombinierte PDACs 15,5 Monate, $p=0,035$). Im Detail zeigten kolloidale, medulläre und tubuläre Karzinome ein besseres Überleben als die konventionellen PDACs und besonders die adenosquamösen Karzinome. Am längsten lebten zwei der drei Patienten mit tubulären Karzinomen (>68,8 und >55,3

Monate). Für die bekannten Varianten stimmen damit die Daten unserer Studie mit den beschriebenen Eigenschaften dieser Varianten überein (siehe Abschnitt 6.2.1).

So sind zum Beispiel kolloidale und medulläre Karzinome mit einer besseren Prognose vergesellschaftet (Goggins, Offerhaus et al. 1998, Adsay, Pierson et al. 2001, Gorgoulis, Vassiliou et al. 2005), während es sich bei den adenosquamösen Karzinomen um extrem aggressive Tumoren handelt (Kardon, Thompson et al. 2001, Bosman, Carneiro et al. 2010, Trikudanathan and Dasanu 2010, Borazanci, Millis et al. 2015).

Im direkten Vergleich überlebten Patienten mit einem konventionellen PDAC signifikant länger als Patienten mit einem kombinierten PDAC ($p=0,008$). Dabei wiesen konventionelle PDACs und kombinierte PDACs mit einer kribriformen Wachstumskomponente die beste Prognose (22,7 und 28,7 Monate) auf, gefolgt von kombinierten PDACs mit einer klarzelligen und papillären Komponente (17,6 und 13,9 Monate), während gyriforme und komplexe Wachstumskomponenten mit einem schlechten Überleben assoziiert waren (12,5 und 10,7 Monate). Das Auftreten bestimmter Wachstumskomponenten kann außerdem die Prognose direkt beeinflussen. Das Sterberisiko vervielfachte sich um mehr als das vierfache bei Patienten mit einer komplexen Wachstumskomponente, welche sich durch kleine irreguläre Drüsen gemischt mit soliden oder kribriformen Zellverbänden und individuellen pleomorphen Zellen auszeichnet ($p<0,001$; HR: 4,3) (siehe Tabelle 24). Dies war statistisch nur univariat und nicht multivariat signifikant, was jedoch in erster Linie auf die geringe Fallzahl (12 Fälle) zurückzuführen ist. Es wäre daher für zukünftige Studien interessant, diesen Zusammenhang an einer größeren Kohorte zu reevaluieren.

Zusammenfassend öffnen sich mit der Integration der morphologischen Analyse neue Wege und Möglichkeiten für zukünftige Forschungsansätze und das klinische Management des PDACs. Die genaue morphologische Analyse und Bewertung der Wachstumsmuster des PDACs ist jedoch nicht einfach und bedarf pathologischer Fachkenntnisse, die ggf. nur in spezialisierten Zentren zur Verfügung stehen. Genetische Unterschiede zwischen den morphologischen Subtypen

Zwischen den morphologischen Subgruppen bestehen auch genetische Unterschiede, sie unterscheiden sich nicht nur in ihrem klinischen Verhalten. Die Patienten mit klassischen PDACs, also der Gruppe der konventionellen und kombinierten PDACs,

unterschieden sich signifikant von denen mit Varianten des PDACs durch eine signifikant höhere *KRAS* Mutationsrate ($p= 0,035$), eine höhere Anzahl an Gesamtmutationen ($p= 0,004$) und ein insgesamt schlechteres Grading ($p< 0,001$) (siehe Tabelle 15 und Tabelle 22). Im direkten Vergleich der konventionellen und kombinierten PDACs zeigten sich bei den kombinierten PDACs (60/71) deutlich häufiger Veränderungen in *P16/CDKN2A* als bei den konventionellen PDACs (29/91), das Auftreten einer weiteren Wachstumskomponente außer dem klassisch duktalem Wachstum war also mit einer höheren *P16/CDKN2A* Mutationsrate assoziiert.

Aus diesen Daten zeichnet sich ein Trend ab, dass eine größere morphologische Heterogenität mit einer komplexeren Genetik und einem schlechteren Grading assoziiert zu sein scheint.

6.2.1 Vergleich der Eigenschaften bekannter Varianten mit der Literatur

Für die beschriebenen Varianten des PDAC sind wie bereits erwähnt Zusammenhänge mit einer bestimmten Prognose und molekularen Charakteristiken bekannt (Bosman, Carneiro et al. 2010). Unsere Daten stimmen genau mit den daher erwarteten klinischen und molekularen Daten überein.

So sind zum Beispiel kolloidale und medulläre Karzinome mit einer besseren Prognose vergesellschaftet. Medulläre Karzinome sind häufig Mikrosatelliten instabil und zeigen einen Verlust der Mismatch-Reparatur Proteine MLH1 und MSH2 (Goggins, Offerhaus et al. 1998, Wilentz, Goggins et al. 2000, Adsay, Pierson et al. 2001). Hingegen zeigen sie meist keine Veränderungen im *KRAS* Gen, jedoch wurden *BRAF* Mutationen beobachtet (Goggins, Offerhaus et al. 1998, Wilentz, Goggins et al. 2000, Calhoun, Jones et al. 2003). In dieser Studie wurde ein medulläres Karzinom gefunden. Es wurde keine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen und wie erwartet zeigte der Patient ein gutes Überleben (>64,3 Monate). Kolloidale Karzinome, welche histomorphologisch aus Muzin produzierenden neoplastischen Zellen bestehen, die in extrazellulären Schleimseen flottieren, gehen mit einer guten Prognose einher und treten fast immer in Assoziation mit einem IPMN des intestinalen Typs auf (Adsay, Pierson et al. 2001, Seidel, Zahurak et al. 2002). In dieser Studie handelte es sich bei zwei Fällen um muzinöse/kolloidale Karzinome, wobei einer aus einem IPMN vom intestinalen Typ hervorgingen. Beide Fälle zeigten ein exzellentes Überleben (>53,5 and >75,1 Monate). Verglichen mit dem herkömmlichen duktalem Adenokarzinom

zeichnen sich kolloidale Karzinome durch geringere Prävalenz somatischer Mutationen in *KRAS* (ungefähr 30%) und *TP53* (ungefähr 50%) aus (Wu, Jiao et al. 2011). Sie sind dafür durch eine höhere Prävalenz von *GNAS* Mutationen geprägt, welche auch häufig in IPMN auftreten (Wu, Jiao et al. 2011). In diesem Projekt zeigten beide Fälle *TP53* Mutationen und ein intaktes SMAD4 Protein und je eins eine Veränderung von *KRAS* oder *P16/CDKN2A*. Adenosquamöse Karzinome hingegen sind extrem aggressive Varianten des duktales Adenokarzinoms mit häufigen genetische Veränderungen ähnlich denen des klassischen PDACs (Kardon, Thompson et al. 2001, Bosman, Carneiro et al. 2010, Trikudanathan and Dasanu 2010, Borazanci, Millis et al. 2015). Wie erwartet, zeigten die zwei adenosquamösen Karzinome auch in unserer Kohorte einen schlechten klinischen Verlauf (Überleben 4,1 und 10,0 Monate). Es wurden bei beiden Fällen Veränderungen in *KRAS*, *TP53* und *p16/CDKN2A* sowie in einem Fall in SMAD4 gefunden.

6.2.2 Das tubuläre Karzinom als neue Variante des PDACs

Neben den bekannten Varianten des PDACs wurden drei tubuläre Adenokarzinome gefunden, die bisher so für das Pankreas noch nicht beschrieben wurden und von unserer Arbeitsgruppe als neue eigenständige Variante vorgeschlagen wurden. Diese neue Variante verdient gesonderte Aufmerksamkeit, da sie sich genetisch und klinisch besonders interessant darstellt. Dieses spezielle Karzinom entspricht einem G1 Tumor (WHO 2010) und kann als PDAC mit ausnahmslos gut differenzierter tubulärer Differenzierung angesehen werden (Bosman, Carneiro et al. 2010). Es weist große Ähnlichkeiten im Bezug auf die Morphologie, geringe Anzahl an genetischen Veränderungen, seltene Mutationen und langen Überlebenszeiten zu dem tubulären Karzinom der Mamma auf, was seine Existenz weiterhin plausibel macht (Diab, Clark et al. 1999, Riener, Nikolopoulos et al. 2008, Rakha, Lee et al. 2010, Rakha, Pinder et al. 2012). Die Tubuli sind typischerweise mit flachem, einzelligem Epithel ausgekleidet, ungeordnet über das Gewebe verteilt und sind von reichlich zellarmem, desmoplastischem Stroma umgeben. Die Zellen zeigen nur geringe Kernpleomorphien, sowie unauffällige Nukleolen und kaum Mitosen. Während es sich beim tubulären Karzinom der Mamma um eine seltene Variante des invasiven Karzinoms handelt, die nur 2% der Fälle ausmacht (Diab, Clark et al. 1999), präsentierte sich das tubuläre Karzinom des Pankreas ebenfalls in nur 1,7% (3/177) der Fälle in dieser Studie. Wie typisch für das tubuläre Karzinom der Mamma wurde

auch eine geringe Häufigkeit an genetischen Veränderungen bei den tubulären Karzinomen des Pankreas festgestellt (Riener, Nikolopoulos et al. 2008, Rakha, Lee et al. 2010). In keinem der drei tubulären Karzinome wurden mehr als zwei Mutationen detektiert, dabei fanden sich in der gesamten Kohorte in der Mehrheit drei und vier Mutationen (68,3% (121/177), siehe Abbildung 21). Alle drei Karzinome wiesen weder Veränderungen in *TP53* noch in *SMAD4* auf, zwei (66,6% (2/3)) der Patienten hatten eine *KRAS* Mutation und nur ein Patient (33,3% (1/3)) hatte auch eine Veränderung in *P16/CDKN2A*. Damit trug ein Patient (# 62, siehe Tabelle 23) als einziger der Kohorte sogar keine einzige Mutation innerhalb der vier analysierten Schlüsselgene. Dieses Ergebnis wurde durch das anschließend durchgeführte *Next-Generation* Sequenzierung mit einem PDAC-Gen Panel, welches über 40 beim PDAC häufig mutierte Gene beinhaltet, bestätigt. Dabei wurden auch potentielle *Low-grade* Mutationen sowie Veränderungen in *Up-* und *Down-stream* Genen (z.B. *BRAF*, *EGFR*) untersucht.

Des Weiteren scheinen sowohl das tubuläre Karzinom der Mamma als auch das neu beschriebene tubuläre Karzinom des Pankreas mit einem Langzeitüberleben assoziiert (Rakha, Lee et al. 2010). Beim tubulären Mammakarzinom sind Rezidive nach chirurgischer Exzision selten. In dieser Studie waren zwei der drei Patienten mit tubulärem Karzinom des Pankreas nach mehr als vier Jahren bei Abschluss der Studie noch am Leben (>68,6 und 55,3 Monate). Der dritte Patient überlebte 19,3 Monate, was dem medianen Gesamtüberleben innerhalb der Kohorte nahekommt (19,8 Monate).

Diese Ergebnisse für die Existenz des tubulären Pankreaskarzinoms als weitere, bisher unbeschriebene Variante dieser Erkrankung in Anlehnung an das tubuläre Mammakarzinom. Die großen morphologischen, genetischen und klinischen Überschneidungen stützen diese These eindrucksvoll. Die Aufnahme dieser Karzinomvariante in die internationale Klassifikation der WHO sollte in Betracht gezogen und durch weitere Studien unterstützt werden.

6.3 Verteilung der Schlüsselmutationen und klinische Bedeutung für das PDAC

PDACs tragen typischerweise *KRAS* Mutationen, gefolgt von *P16/CDKN2A*, *SMAD4* und *TP53*. Diese Gene werden als Schlüsselmutationen des PDACs bezeichnet.

Zusätzlich kommen zahlreiche andere, jedoch deutlich seltenere, genetische Veränderungen vor, wie verschiedene *Whole-genome* Sequenzierungen zeigen konnten (Waddell, Pajic et al. 2015, Witkiewicz, McMillan et al. 2015). In unserer Kohorte wurden die Ergebnisse durch Sanger Sequenzierung, Immunhistochemie und in selektierten Fällen durch *Next-Generation* Sequenzierung mit einem erweiterten Gen Panel bestehend aus 40 häufig mutierten Genen gewonnen. Veränderungen von *KRAS* wurden in 92,7%, von *TP53* in 78,8%, von *P16/CDKN2A* in 72,9% und von *SMAD4* in 37,3% detektiert. Diese Veränderungen traten meist gleichzeitig auf, so dass mehr als zwei Drittel der Patienten Veränderungen in drei oder allen vier Genen trugen (68,3% (121/177) siehe Abbildung 21).

6.3.1 Vergleich der Mutationsraten mit der Literatur

In der Literatur werden für die *KRAS* Mutationsrate mittels *Whole-genome* Sequenzierung, welche derzeit als neuste und genaueste Methode anerkannt ist, ähnliche Werte angegeben (Jones, Zhang et al. 2008, Iacobuzio-Donahue, Velculescu et al. 2012). Mit Werten von >90% ist damit ist die *KRAS* Mutation die am häufigsten im PDAC beschriebene Mutation (Caldas and Kern 1995, Jones, Zhang et al. 2008). Der Wert für Veränderungen in *P16/CDKN2A* ist in der Literatur mit um die 90% höher angesetzt (Attri, Srinivasan et al. 2005, Jones, Zhang et al. 2008, Li, Poi et al. 2011). *P16/CDKN2A* stellt damit die zweithäufigste genetische Veränderung dar. Der Verlust von *P16/CDKN2A* wird durch verschiedene Mechanismen ausgelöst, darunter intragenetische Mutationen verbunden mit dem Verlust des zweiten Allels, homozygote Deletion oder Promotor Methylierung (Scarpa, Capelli et al. 1993, Schutte, Hruban et al. 1997, Jones, Zhang et al. 2008). Möglicherweise wurden daher in dieser Studie mit den verwendeten Mutationen nicht alle Veränderungen erfasst. Für den Verlust von *SMAD4* finden sich in der Literatur vergleichbare Werte, teilweise mit 55% auch höher (Hahn, Hoque et al. 1996, Jones, Zhang et al. 2008). Für *TP53* schwankt die Mutationsrate in der Literatur um die 75%, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt (Scarpa, Capelli et al. 1993, Pellegata, Sessa et al. 1994, Redston, Caldas et al. 1994, Jones, Zhang et al. 2008).

Wie erwartet, enthalten die meisten Tumoren mehrere Mutationen gleichzeitig und zwei Drittel der PDAC Patienten (68,3%) trugen Veränderungen in drei oder allen vier Genen, gefolgt von Veränderungen in 2 Genen mit 25,6%, (47/177) und 1 Gen mit 4,5% (8/177).

6.3.2 Zusammenhänge der Mutationsrate mit Morphologie und Klinik

Durch Korrelation des individuellen Mutationsstatus mit der Histopathologie und den Überlebensdaten gelang es eine Reihe von Parametern mit prognostischer Signifikanz ausfindig zu machen. Zum einen war die Gesamtanzahl an Veränderungen prognostisch signifikant. Patienten mit einer, zwei oder drei Mutationen überlebten signifikant länger als jene mit Veränderungen in allen vier Genen ($p=0,04$; >45 vs. $25,3$ vs. $17,6$ vs. $14,5$ Monate). Ein Patient ohne Mutationen war bei Abschluss der Studie noch am Leben (Gesamtüberleben >76 Monate). Auch wenige andere Studien bestätigen diese Ergebnisse und zeigen, dass das krankheitsfreie Überleben, das Gesamtüberleben und der Grad der Metastastasierung signifikant mit der Anzahl der Mutationen korrelieren (Yachida, White et al. 2012). Es erfolgte jedoch bisher keine detaillierte Analyse der Zusammenhänge zwischen Phenotyp und Genotyp. Zu den Tumoren mit einer geringen Mutationsrate und längerem Überleben zählen vor allem die kolloidalen Karzinome, die medullären und die tubulären, während adenosquamöse Karzinome, papilläre Karzinome und kombinierte PDACs mit einer komplexen Komponente zu den Fällen mit einer hohen Mutationsrate und einem schlechteren Überleben zählten. Medulläre und kolloidale Karzinome sind bekannt für ihre geringe Mutationsrate und eine gute Prognose (Goggins, Offerhaus et al. 1998, Wilentz, Goggins et al. 2000, Adsay, Pierson et al. 2001, Calhoun, Jones et al. 2003, Oshima, Okano et al. 2013). Im Gegensatz dazu sind adenosquamöse Karzinome durch eine Vielzahl an genetischen Veränderungen und ein aggressives biologisches Verhalten charakterisiert (Trikudanathan and Dasanu 2010, Borazanci, Millis et al. 2015). Bei der papillären Variante könnte es sich um die invasive Komponente eines IPMNs handeln (Kloppel, Basturk et al. 2014), da in unserer Studie in vier von sechs papillären Karzinomen assoziierte IPMNs vom pankreato-biliären (2/6), intestinalen (1/6) oder gastrischen (1/6) Typ gefunden wurden. Jedoch können diese wohl auch ohne assoziiertes IPMN auftreten, da in zwei Fällen kein IPMN identifiziert werden konnte. Auch eine andere aktuelle Studie, in der 10 papilläre zystische PDACs untersucht wurden, kam zu dem Ergebnis, dass zystische PDAC ohne IPMN auftreten können (Kelly, Shinagare et al. 2012).

6.3.3 Bedeutung der Verteilung der Mutationen für die Modelle der Karzinogenese

Die unterschiedliche Verteilung der Mutationen ist auch im Hinblick auf die Karzinogenese des PDACs interessant. Das Modell der Karzinogenese des PDACs aus PanIN Vorläufer Läsionen veranschaulicht die zeitliche Abfolge der Ansammlung bestimmter Mutationen (Hruban, Goggins et al. 2000). *KRAS* Mutationen treten früh auf, gefolgt von Veränderungen in *P16/CDK2NA*, während *SMAD4* und *TP53* später hinzukommen (Maitra, Adsay et al. 2003, Sipos, Frank et al. 2009, Kanda, Matthaei et al. 2012, Zamboni, Hirabayashi et al. 2013). Die Daten der hier vorgestellten Studie widersprechen diesem Modell nicht, allerdings legen sie nahe, dass dieses Modell der genetischen Progression nur für einen Teil der Fälle zutrifft, da nur bei 20,3% (36/177) alle vier Mutationen gefunden wurden. Diese Zahl entspricht auch dem Ergebnis anderer Studien (Yachida, White et al. 2012).

Auch tragen, anders als dem Modell zufolge, nicht alle Karziome Veränderungen in *KRAS* und *P16/CDKN2A* in sich. Ein neues Modell über die Entstehung von PDACs durch azinär-duktale Metaplasie (ADM) unterstützt die wichtige Rolle von *KRAS* für die PDAC Entstehung aus AFL (Shi, Klein et al. 2009, Esposito, Konukiewitz et al. 2014, Esposito, Segler et al. 2015). Allerdings hat die Analyse menschlicher AFL Läsionen auch ergeben, dass isolierte ADM Läsionen keine *KRAS* Mutationen beinhalten. Dies spricht dafür, dass mindestens zwei verschiedene Mechanismen der Tumorgenese des PDACs existieren, eine mit und eine ohne *KRAS* Mutationen (Shi 2009). Diese Beobachtungen legen nahe, dass *KRAS* Mutationen nicht essentiell für die Entstehung von Pankreaskarzinomen im Menschen sind, sondern dass verschiedene, seltenere Mutationen andere Signalwege aktivieren können. Bei der Sequenzierung des pankreatischen Genoms wurden auch viele solcher seltenen Mutationen detektiert (Jones, Zhang et al. 2008). Offenbar sind also die Hintergründe der Karzinogenese des PDACs noch nicht vollständig verstanden.

6.3.4 Prognostischer Wert und klinische Relevanz von *KRAS* und *P16/CDKN2A*

Patienten mit *KRAS* Wildtyp oder *P16/CDKN2A* Wildtyp zeigten einen besseren Verlauf als solche mit Mutationen in diesen Genen. Die Signifikanz von *KRAS* war so stark, dass die multivariante Analyse den Mutationsstatus von *KRAS* als

unabhängigen prognostischen Marker identifizierte. Zu dem gleichen Ergebnis kommen auch andere aktuelle Studien, welche somit diese These stützen (Lee, Jang et al. 2007, Ogura, Yamao et al. 2013, Shin, Kim et al. 2013, Sinn, Striefler et al. 2014). In drei dieser vier Studien war *KRAS* ebenfalls ein unabhängiger prognostischer Marker. Die Überlebensunterschiede waren jedoch in allen Studien deutlich geringer als in unserer Studie (siehe Tabelle 28) bis hin zu Lee et al., die einen Überlebensvorteil von nur 4,3 Tagen beobachteten. In unserer Studie ergaben sich ein medianes Überleben von 19,7 Monaten für Patienten mit mutiertem *KRAS* im Vergleich zu >45 Monaten bei Wildtyp *KRAS* ($p=0,018$). Das längere Überleben in unserer Studie ist zum einen dadurch zu erklären, dass nur Patienten mit resezierten Pankreaskarzinomen eingeschlossen wurden, während beispielsweise Lee et al. und Ogura et al. nur Patienten mit nicht resektablen Karzinomen eingeschlossen haben und die Proben durch Feinnadelaspiration gewonnen wurden. Möglicherweise sind die Unterschiede aber auch bedingt durch eine bessere Selektion der Patienten auf Basis genauerer und extensiverer *KRAS* Analysen (Exon 2-4), während in den älteren Studien nur Exon 2 untersucht wurde. Dieser methodische Unterschied erklärt vermutlich auch die geringeren *KRAS* Mutationsraten, welche zwischen nur 49% bei Lee et al. bis hin zu 88,4% bei Ogura et al. variieren im Vergleich zu 93% in dieser Studie und aktuellen Whole-Exome Analysen (Iacobuzio-Donahue, Velculescu et al. 2012, Waddell, Pajic et al. 2015, Witkiewicz, McMillan et al. 2015). Unter den Tumoren mit Wildtyp *KRAS* befanden sich medulläre Karzinome, deren spezifische genetische und molekulare Eigenschaften bereits beschrieben wurden (Goggins, Offerhaus et al. 1998, Wilentz, Goggins et al. 2000, Calhoun, Jones et al. 2003, Wu, Jiao et al. 2011), und ein tubuläres Adenokarzinom.

Tabelle 28. Vergleich verschiedener Studien, bei denen KRAS als prognostischer Marker für das PDAC identifiziert wurde.

Überblick über die jeweilige Patientenkohorte, die untersuchten Parameter und die KRAS bezogenen Ergebnisse der Studien. Der Vergleich mit anderen Studien zeigt, dass diese Arbeit vergleichsweise viele verschiedene morphologische und genetische Marker erfasst und ein hochsignifikantes Ergebnis erzielt hat.

Studie	Patienten gesamt	Patienten für Analyse	Analysierte Morphologische Merkmale	Analysierte Gene	KRAS Mutationsrate	Signifikanz von KRAS	Überlebens unterschiede KRAS Mut vs WT	p- Wert	
Lee et al. 2007	66	65	Grading	KRAS (Exon 12,13), EGFR	49% (32/65)	univariat	9,1 vs 13, 4 Monate	0,03	Die Anwesenheit einer Punktmutation in Kodon 12 beeinflusst das Überleben der PDAC Patienten
Ogura et al. 2013	242	242	keine	KRAS (Exon 12), TP53	88,4% (214/242)	multivariat	255 vs 479 Tage	0,03	Das mediane Überleben war signifikant länger in der KRAS Wildtyp- im Vergleich zur mutierten Gruppe
Shin et al. 2013	272	234	Grading	KRAS (Exon12), TP53, SMAD4, c-erbB-2	53,8% (126/234)	multivariat	14,7% vs 33,3% (5-Jahres- Überlebensrat e)	0,001	KRAS Mutation und SMAD4 Inaktivierung resultierten in einer Reduktion des postoperativen Überlebens (p= 0,001 und p= 0,047)
Rachakonda et al. 2013	171 *	150	Tumortyp nach WHO Klassifikation, Grading	KRAS (Exon 12,13), P16/CDKN2A	79% (119/150)	multivariat	17 vs 30 Monate	0,07	PDAC Patienten mit KRAS Mutationen überlebten signifikant kürzer im Vergleich zu denen ohne Mutation
Sinn et al. 2014	185	153	Grading	KRAS (Exon 12), TP53	68% (105/153)	multivariat	12,7 vs 20,7 Monate	0,02	KRAS Mutationsstatus war ein unabhängiger prognostischer Faktor, jedoch nicht TP53.
Segler, Schlitter et al. 2016	200	177	Wachstums komponenten, Grading, Vorläuferläsionen , Inflammation, Stromareaktion	KRAS (Exon 12,13, 4), P16/CDKN2A TP53, SMAD4	91.5%	multivariat	19,7 vs 45 Monate	0,018	Die morphologischen Subgruppen, die Anzahl der Mutationen, KRAS und P16/CDKN2A Mutationsstatus haben prognostische Relevanz

Die Relevanz der *KRAS* Mutation als prognostischer Marker für das PDAC hängt vermutlich mit der Schlüsselfunktion dieses Gens in der Karzinogenese zusammen. Weitere Belege dafür, dass *KRAS* in Interaktion mit *TP53*, *P16/CDKN2A* und *SMAD4* eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese spielt, stammen von *Kras* gesteuerten genetisch manipulierten PDAC- Mausmodellen (Hingorani, Petricoin et al. 2003, Di Micco, Fumagalli et al. 2006, Guerra, Schuhmacher et al. 2007, Seidler, Schmidt et al. 2008, Morris, Wang et al. 2010, Collisson, Sadanandam et al. 2011, Pylayeva-Gupta, Grabocka et al. 2011, Biankin, Waddell et al. 2012, Mazur and Siveke 2012). Durch die gezielte Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *P16/CDKN2A*, *SMAD4* und *TP53* konnte in diesen Modellen in Abhängigkeit von *Kras* die Entstehung von PanIN ausgelöst werden (Jones, Zhang et al. 2008, Morris, Wang et al. 2010, Biankin, Waddell et al. 2012). Des Weiteren belegen kürzlich entwickelte Mausmodelle, in denen das *Kras* Gen an- und ausgeschaltet werden kann, eindrücklich, dass ein kontinuierliches *Kras* Signal essentiell sowohl für die Progression als auch den Erhalt des PDACs und seiner Metastasen ist (Collins, Brisset et al. 2012). Außerdem prägten die murinen PDAC Zelllinien mit LOH von *Kras* aggressivere Phänotypen aus, als diese mit erhaltenem *KRAS* Wildtyp Allel (Qiu, Sahin et al. 2011). In menschlichen Zelllinien der PDAC Metastasen wurde ein LOH von *KRAS* in 80% festgesetzt, während die Zellen der Primärtumoren nur einen *KRAS* LOH in 37% aufwiesen. Als einzige chromosomale Region, welche statistisch signifikant zwischen metastatischen und Primärtumor-Zellen verändert war, wurde die chromosomale Region 12p identifiziert, auf der auch *KRAS* Gen lokalisiert ist (Qiu, Sahin et al. 2011).

Möglicherweise ist die *KRAS* Mutation also für ein aggressiveres biologisches Verhalten der Tumorzellen verantwortlich. In dieser Studie zeigte sich unter den *KRAS* Wildtyp Patienten nur ein Fall mit Fernmetastase.

Bei einem Patienten mit schlechtem klinischem Verlauf (Überleben: 17,8 Monate) konnte selbst durch *Next-Generation* Sequenzierung nur eine *Low level KRAS* Mutation (3%) als einzige genetische Veränderung festgestellt werden. In der Lebermetastase dieses Patienten zeigte sich die gleiche Mutation, jedoch als *High level KRAS* Mutation. Dies könnte darauf hindeuten, dass für die Tumorzellverbreitung und Metastasierung vor allem die *KRAS* mutierten Tumorzellklone verantwortlich sein könnten.

Yachida et al. dokumentierten den vergleichbaren Fall eines PDAC Patienten, der außer einer *KRAS* Mutation keine weiteren Genveränderungen trug, jedoch weitreichende Metastasen und ein kurzes Überleben von nur 5 Monaten zeigte (Yachida, White et al. 2012).

Diese Ergebnisse unterstreichen, dass *KRAS* nicht nur eine entscheidende Rolle als Schlüsselmutation der Karzinogenese spielt, sondern vielmehr auch das biologische Verhalten der neoplastischen Zellen, wie die Gefäßinvasion und die Metastasierung beeinflusst. Basierend auf den Daten dieser Arbeit und aktuellen Studien, welche die prognostische Signifikanz von *KRAS* als unabhängigen Marker nachgewiesen haben (siehe Tabelle 28), empfehlen wir die Integration des *KRAS* Status in die pathologische Untersuchung des PDACs für die Zukunft (Lee, Jang et al. 2007, Ogura, Yamao et al. 2013, Shin, Kim et al. 2013, Sinn, Strieler et al. 2014).

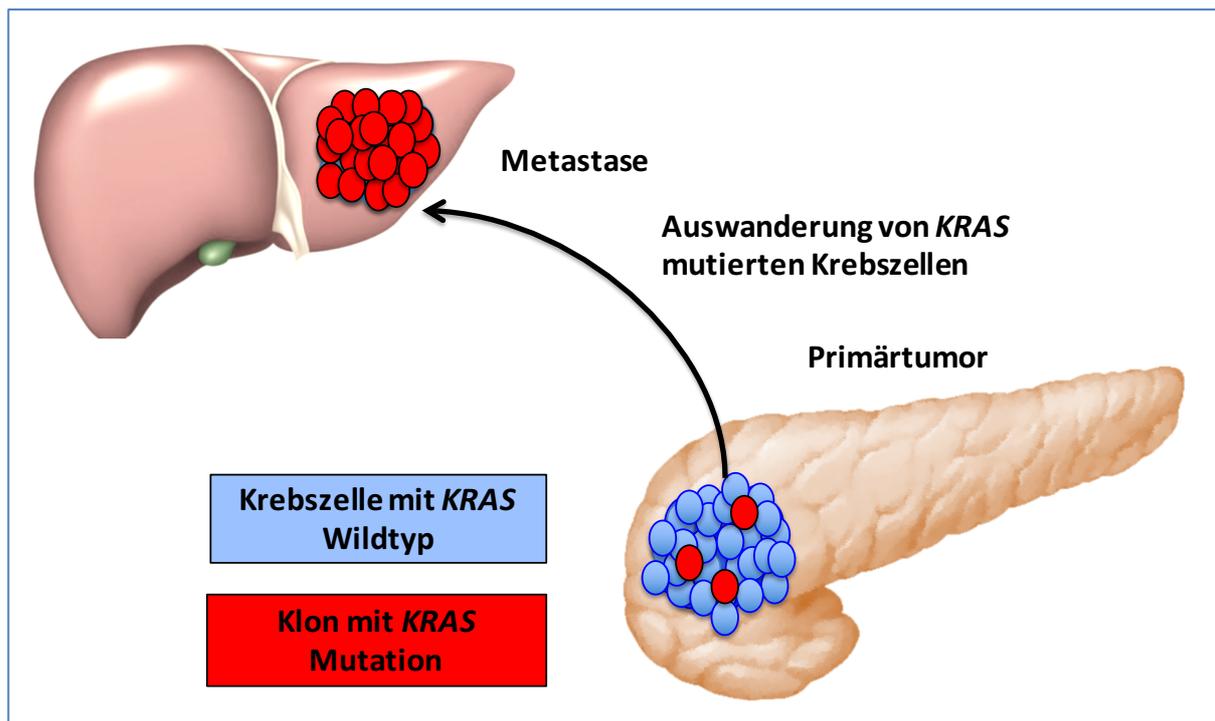


Abbildung 29: Hypothese der Auswanderung von *KRAS* mutierten Tumorzellklonen

Die Ergebnisse der vergleichenden Analyse von Primärtumor und Metastasen unterstützen die Hypothese einer Auswanderung von *KRAS* mutierten Krebszellen. Während im Primärtumor nur eine *Low level KRAS* Mutation (3%) detektiert wurde, zeigte sich eine *High level KRAS* Mutation in der Lebermetastase. *KRAS* mutierte Klone von Krebszellen mit *KRAS* Wildtyp sind möglicherweise aggressiver und treiben die Metastasierung voran.

Patienten mit Wildtyp P16/*CDKN2A* lebten wie Patienten mit Wildtyp *KRAS* signifikant länger als solche mit Veränderungen in diesem Gen ($p=0,006$; 36,9 vs. 18,8 Monate). Obwohl die multivariante Analyse diese Genkonstellation nicht als unabhängigen Prognosefaktor identifizieren konnte, scheint P16/*CDKN2A* eine Rolle im klinischen Verlauf der Patienten zu spielen. Alle Patienten ohne Veränderungen in P16/*CDKN2A* und *KRAS* waren bei Abschluss der Studie noch am Leben. Diese Ergebnisse werden von Daten anderer Arbeiten gestützt, die das Sterberisiko für Patienten mit gleichzeitigen Veränderungen des *KRAS* und P16/*CDKN2A* Gens als 2,5-fach höher einstufen, als bei Patienten ohne Veränderung in diesen Genen (Rachakonda, Bauer et al. 2013). Außerdem zeigte sich der Verlust von P16/*CDKN2A* in unserer Studie signifikant mit einer höheren Rate an lymphatischer Metastasierung ($p=0,016$) assoziiert (siehe

Tabelle 26). Aktuelle Studien stützen diese Hypothese und stellen eine Verbindung zwischen dem immunhistochemischen Verlust von P16/*CDKN2A* und der lymphatischen Invasion und postoperativen Metastasierung her (Oshima, Okano et al. 2013). Studien an Mausmodellen belegen außerdem, dass die biallele Inaktivierung von P16/*CDKN2A* und *KRAS* synergistische Effekte auf die pankreatische Tumorgenese und Metastasierung hat (Qiu, Sahin et al. 2011). Mäuse mit P16/*CDKN2A* und *Kras Knockout* entwickeln nicht nur PanIN und invasive Karzinome, sondern zeigen auch ein kurzes Gesamtüberleben und eine hohe Metastasierungsrate.

Interessanterweise zeigte die Analyse der histopathologischen Subgruppen außerdem eine deutlich höhere P16/*CDKN2A* Mutationsrate in den kombinierten PDACs mit einer weiteren dominanten Wachstumskomponente im Vergleich zu den konventionellen PDACs. Dies weist darauf hin, dass Schlüsselgene in die Ausbildung von dominanten histologischen Wachstumsmustern innerhalb der PDACs involviert sind.

6.3.5 Fragliche Relevanz von SMAD4 und TP53

Die prognostische Relevanz von SMAD4 war Gegenstand kontroverser Diskussionen in den letzten Jahren. Möglicherweise ist der Verlust von SMAD4 mit einem schlechteren Verlauf der Erkrankung assoziiert. Einige Studien belegen einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von SMAD4 und einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten und einer höheren post-operativen

Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Metastasen (Singh, Srinivasan et al. 2012, Oshima, Okano et al. 2013, Shin, Kim et al. 2013, Boone, Sabbaghian et al. 2014). Diese Effekte konnten jedoch nicht in allen Studien reproduziert werden (Biankin, Morey et al. 2002, Yachida, White et al. 2012, Winter, Tang et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit konnten ebenfalls keine Unterschiede im Verlauf der Patienten mit oder ohne Verlust von SMAD4 beobachtet werden ($p=0,15$; medianes Überleben 22,2 Monate vs. 17,6 Monate, siehe Abbildung 26). Jedoch war der Verlust von SMAD4 mit einem lokal fortgeschritteneren Tumorstadium assoziiert (siehe

Tabelle 27).

Für die Korrelation von *TP53* mit dem klinischen Verlauf ergab sich keine prognostische Relevanz ($p= 0,83$, medianes Überleben 19,2 vs. 29,8 Monate). Während die meisten Studien *TP53* als prognostischen Marker ablehnen, zeigen sich auch hier vereinzelt widersprüchliche Ergebnisse (DiGiuseppe, Hruban et al. 1994, Redston, Caldas et al. 1994, Yachida, White et al. 2012).

7 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zahlreiche signifikante Zusammenhänge zwischen der Genetik, der Morphologie und dem klinischen Verlauf des PDACs bestehen, basierend auf der morphologischen Stratifizierung von PDAC in Subtypen und Varianten sowie dem Mutationsstatus der vier Schlüsselgene *KRAS*, *P16/CDKN2A*, *SMAD4* und *TP53*. Insgesamt wurden 177 Patienten mit chirurgisch resezierten PDACs untersucht. Die Überlebensdaten der Patienten zeigten ein wie erwartet insgesamt schlechtes Überleben mit einem medianen Überleben von nur 19,8 Monaten. Jedoch gab es auch Patienten, die mit bis zu vier Jahren und mehr deutlich länger überleben und somit von der Operation profitieren (siehe Abbildung 10). Das unterschiedliche biologische Verhalten der Tumore unterstützt die These der Existenz verschiedener Subtypen und tatsächlich zeichneten sich einige Tumoren dieser Patienten durch eine spezielle Histologie und/ oder Molekularbiologie aus.

Auch andere Studien haben bereits gezeigt, dass klinisch relevante Subtypen mit unterschiedlichem Ansprechen auf Medikamente existieren und Zusammenhänge zwischen dem Mutationsstatus der Schlüsselmutationen und dem klinischen Verlauf bestehen (Collisson, Sadanandam et al. 2011, Yachida, White et al. 2012, Oshima, Okano et al. 2013). Diese Studien haben jedoch nicht die morphologische Heterogenität des PDACs erfasst, untersucht oder korreliert.

In dieser Arbeit wurden die Patienten nach definierten Kriterien in drei morphologische Gruppen unterteilt: die konventionellen PDACs mit dem typischen duktalem Wachstum, die kombinierten PDACs, die eine weitere Wachstumskomponente aufwiesen, und die homogenen Varianten/ spezielle Karzinome. Insgesamt zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Varianten >34,1 vs. konventionelle PDACs 22,7 vs. kombinierte PDACs 15,5 Monate, $p= 0,035$). Die Patienten mit konventionellem PDAC überlebten dabei besser als solche mit kombinierten PDACs und einer weiteren Wachstumskomponente. Im Detail zeigten die Patienten mit konventionellen PDACs und solche mit kribriiformer Wachstumskomponente das beste Überleben (22,7 und 28,7 Monate), gefolgt von Fällen mit klarzelliger und papillärer Komponente (17,6 und 13,9 Monate). Am schlechtesten überlebten Patienten mit adenosquamösen Karzinomen (4,1 und 10 Monate) und das längste Überleben konnte für zwei der Patienten mit tubulärem Karzinom (>68,8 und >55,3 Monate) beobachtet

werden. Außerdem erhöhte die Anwesenheit einer komplexen Wachstumskomponente das Risiko zu versterben signifikant ($p < 0,001$; HR: 4,3).

Für die bekannten Varianten, wie das medulläre, adenosquamöse oder kolloidale Karzinom, sind im Einzelnen nicht nur spezifische Unterschiede im klinischen Verlauf sondern auch in der Genetik und bekannt, welche sich so in dieser Arbeit bestätigten (Goggins, Offerhaus et al. 1998, Wilentz, Goggins et al. 2000, Adsay, Pierson et al. 2001, Kardon, Thompson et al. 2001, Seidel, Zahurak et al. 2002, Calhoun, Jones et al. 2003, Bosman, Carneiro et al. 2010, Trikudanathan and Dasanu 2010, Wu, Jiao et al. 2011, Borazanci, Millis et al. 2015).

In dieser Arbeit wird erstmals das tubuläre Karzinom des Pankreas in Anlehnung an das tubuläre Karzinom der Mamma beschrieben. Es weist durch seine gut differenzierte Morphologie (G1) mit charakteristischen, durch eine flache kuboidale Zellschicht ausgekleideten Tubuli, sein seltenes Auftreten, die geringe Mutationsrate und die gute Prognose markante Ähnlichkeiten zum tubulären Karzinom der Mamma auf (Riener, Nikolopoulos et al. 2008, Rakha, Lee et al. 2010). Alle drei Karzinome wiesen weder Veränderungen in den Genen *TP53* oder *SMAD4* auf und ein Patient trug als einziger der Kohorte sogar keine einzige Mutation innerhalb der vier analysierten Schlüsselgene, was nochmals mittels *Next-Generation* Sequenzierung bestätigt wurde (siehe Tabelle 23).

Die genetische Analyse ergab insgesamt hohe Mutationsraten für die vier untersuchten Schlüsselmutationen mit 92,7% für *KRAS*, 78,5% für *TP53*, 72,9% für *P16/CDKN2A* und 37,7% für *SMAD4*, vergleichbar mit anderen Studien (Scarpa, Capelli et al. 1993, Pellegata, Sessa et al. 1994, Redston, Caldas et al. 1994, Hahn, Hoque et al. 1996, Schutte, Hruban et al. 1997, Attri, Srinivasan et al. 2005, Jones, Zhang et al. 2008, Iacobuzio-Donahue, Velculescu et al. 2012). Damit zeigten 75% der Patienten Veränderungen in zwei oder drei und weitere 20% sogar in allen vier Genen. Zwischen den morphologischen Subgruppen zeigten sich neben den klinischen auch signifikante genetische Unterschiede. Patienten mit konventionellen oder kombinierten PDACs unterschieden sich von denen mit Varianten des PDACs durch eine signifikant höhere *KRAS* Mutationsrate ($p = 0,035$), eine höhere Anzahl an Gesamtmutationen ($p = 0,004$) und ein insgesamt schlechteres Grading ($p < 0,001$). Außerdem zeigten kombinierte PDACs im Vergleich zu den konventionellen PDACs deutlich häufiger Veränderungen in *P16/CDKN2A* als bei den konventionellen PDACs, das Auftreten

einer weiteren Wachstumskomponente außer dem klassisch duktalem Wachstum war also mit einer höheren P16/CDKN2A Mutationsrate assoziiert.

Die Anzahl der Mutationen, *KRAS* und P16/CDKN2A kristallisierten sich als interessante molekulare Marker heraus. Patienten mit Wildtyp *KRAS* oder intaktem P16/CDKN2A lebten signifikant länger als solche mit Veränderungen in diesen Genen (*KRAS*: 45 vs 19,7 Monate $p=0,018$, P16/CDKN2A: 36,9 vs. 18,8 Monate, $p=0,006$). Die prognostische Relevanz von *KRAS* war so stark, dass sich *KRAS* in der multivariaten Analyse als unabhängiger prognostischer Marker bestätigte. Die Signifikanz von *KRAS* wurde bereits in anderen Arbeiten verdeutlicht (Lee, Jang et al. 2007, Ogura, Yamao et al. 2013, Shin, Kim et al. 2013, Sinn, Striefler et al. 2014), sodass wir die Aufnahme von *KRAS* als prognostischen Marker in die pathologische Routinediagnostik des PDACs vorschlagen. Die Kombination von *KRAS* und P16/CDKN2A ergab sogar, dass alle vier Patienten ohne Veränderungen in *KRAS* und P16/CDKN2A bei Abschluss der Studie noch am Leben waren. Bei Patienten mit einem Verlust von P16/CDKN2A fand sich häufiger eine lymphatische Invasion, was andere Studien bestätigen (Oshima, Okano et al. 2013). Auch die Gesamtzahl der Mutationen trägt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien eine prognostische Relevanz (Yachida, White et al. 2012). Die Anzahl der veränderten Gene korrelierte signifikant ($p=0,04$) mit dem medianen Gesamtüberleben (medianes Gesamtüberleben >45 vs. >25,3 vs. >17,6 vs. >14,5 Monate).

Zusammenfassend spezifizieren unsere Daten die prognostischen Zusammenhänge zwischen Phänotyp, Genotyp und dem klinischen Verlauf. Sie belegen, dass morphologische Subgruppen mit unterschiedlichen genetischen und klinischen Eigenschaften existieren und dass bestimmte Gene und Genkombinationen, im Besonderen *KRAS*, P16/CDKN2A, und die Anzahl der Mutationen prognostische Signifikanz aufweisen. Damit bestätigen sie endlich lang vermutete Zusammenhänge zwischen diesen drei Modalitäten.

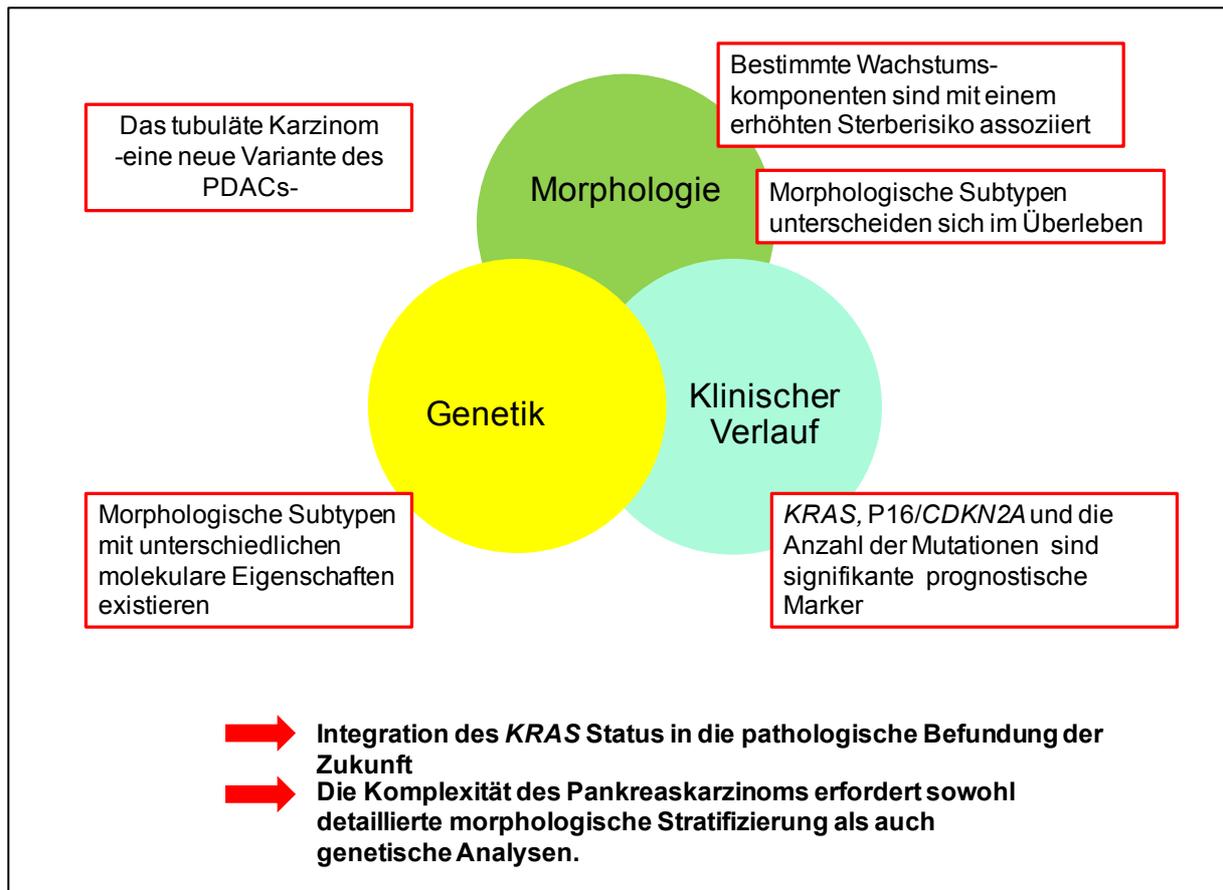


Abbildung 30: Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Prootionsarbeit: Zusammenhänge zwischen Morphologie, Genetik und dem klinischen Verlauf.

Die Arbeit belegt, dass lang vermutete Zusammenhänge zwischen den Modalitäten existieren. Zukünftig könnte daher die kombinierte Analyse von Morphologie und Genetik bei der Entschlüsselung der Komplexität des PDACs eine entscheidende Rolle spielen.

Unsere Daten legen nahe, dass die Identifikation von Subgruppen (gering/ intermediär und hoch aggressive PDACs) möglich ist und personalisierte Therapieoptionen diskutiert werden sollten, und zwar auf der Basis eines multimodalen Systems, welches Morphologie und Genetik berücksichtigt. Solch ein Ansatz wird benötigt, um in Zukunft ein besseres klinisches Management für das Pankreaskarzinom als komplexe und heterogene Erkrankung zu gewährleisten. Patienten mit Veränderungen in *P16/CDKN2A* profitieren möglicherweise von aggressiveren preoperativen Therapieregimen, während bei Patienten mit Wildtyp *KRAS* eher die chirurgische Resektion gefolgt von adjuvanter Therapie indiziert ist. Im Hinblick auf diese potentiellen Therapieunterschiede sollte erwogen werden, den Status der vier Schlüsselmutationen in die pathologische Befundung in Zukunft zu integrieren (Lee, Jang et al. 2007, Singh, Greninger et al. 2009, Ogura, Yamao et al. 2013, Shin, Kim et

al. 2013, Sinn, Striefler et al. 2014). Die möglicherweise enorme klinische Bedeutung und das große Potential unserer Ergebnisse impliziert, dass ihre Validierung in unabhängigen Kohorten Gegenstand zukünftiger Forschung sein sollte.

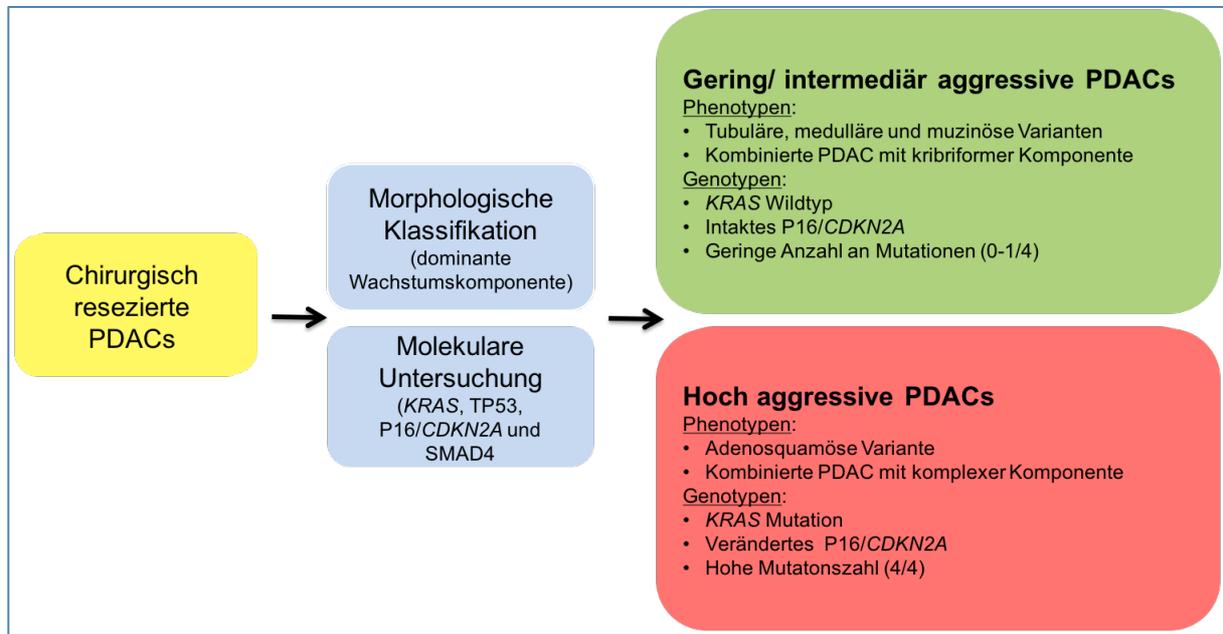


Abbildung 31: Risikostratifizierung nach chirurgischer Resektion des PDACs.

Vorgeschlag eines Schemas zur Identifikation von gering/ intermediär und hoch aggressiven PDACs basierend auf der morphologischen Klassifikation und der molekularen Untersuchung der vier Schlüsselgene.

Das Prinzip der Kombination von morphologischen und genetischen Daten erscheint vielversprechend. Nicht nur aber sollten diese Ergebnisse validiert werden, vielmehr sollten zukünftige Studien diese Erkenntnisse erweitern. Um der Komplexität des Pankreaskarzinoms gerecht zu werden und die Entwicklung einer individualisierten Medizin für das Pankreaskarzinom voranzutreiben, sind Studien mit detaillierteren Analysen (sowohl morphologisch als auch genetisch) an größeren Kohorten sinnvoll. Die vier Schlüsselmutationen reichen wahrscheinlich nicht aus, um die zahlreichen Wachstumsmuster zu erklären und wiederzuspiegeln und sie sind aktuellen Studien zufolge auch nicht die einzigen Gene, die von Bedeutung für das PDAC sind. So trug beispielsweise eine Arbeit über die *Whole-Genome* Sequenzierung an insgesamt 109 mikrodisezierten PDACs Fällen zur Entdeckung weiterer neuer Gene bei, wovon einige, wie *RBM10*, prognostisch relevant waren (Witkiewicz, McMillan et al. 2015). Es hat sich bereits gezeigt, dass auch andere seltenere Gene das Potential haben, die Tumorbiologie des PDACs zu beeinflussen, z.B. inaktivierende *BRCA2*, *PALB2* oder

FANC Mutationen, welche die Sensitivität für Cisplatin oder PARP Inhibitoren erhöhen (Fogelman, Wolff et al. 2011, Villarroel, Rajeshkumar et al. 2011).

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit wohl den Grundstein für die Anwendung eines multimodalen Systems, welches die morphologische Subtypisierung mit einer genetischen Subtypisierung im Sinne einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation verbindet und somit auch die Vorteile eines interdisziplinären Managements für Forschung und Diagnostik der Erkrankung hervorhebt. Die Pathologie bildet dabei ein wichtiges Bindeglied zwischen den verschiedenen klinischen Disziplinen.

8 Literaturverzeichnis

Adkins, S. and M. Burmeister (1996). "Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations." Anal Biochem **240**(1): 17-23.

Adsay, N. V., C. Pierson, F. Sarkar, J. Abrams, D. Weaver, K. C. Conlon, M. F. Brennan and D. S. Klimstra (2001). "Colloid (mucinous noncystic) carcinoma of the pancreas." Am J Surg Pathol **25**(1): 26-42.

Aichler, M., C. Seiler, M. Tost, J. Siveke, P. K. Mazur, P. Da Silva-Buttkus, D. K. Bartsch, P. Langer, S. Chiblak, A. Durr, H. Hofler, G. Kloppel, K. Muller-Decker, M. Brielmeier and I. Esposito (2012). "Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues." J Pathol **226**(5): 723-734.

Attri, J., R. Srinivasan, S. Majumdar, B. D. Radotra and J. Wig (2005). "Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma." BMC Gastroenterol **5**: 22.

Bailey, P., D. K. Chang, K. Nones, A. L. Johns, A. M. Patch, M. C. Gingras, D. K. Miller, A. N. Christ, T. J. Bruxner, M. C. Quinn, C. Nourse, L. C. Murtaugh, I. Harliwong, S. Idrisoglu, S. Manning, E. Nourbakhsh, S. Wani, L. Fink, O. Holmes, V. Chin, M. J. Anderson, S. Kazakoff, C. Leonard, F. Newell, N. Waddell, S. Wood, Q. Xu, P. J. Wilson, N. Cloonan, K. S. Kassahn, D. Taylor, K. Quek, A. Robertson, L. Pantano, L. Mincarelli, L. N. Sanchez, L. Evers, J. Wu, M. Pinese, M. J. Cowley, M. D. Jones, E. K. Colvin, A. M. Nagrial, E. S. Humphrey, L. A. Chantrill, A. Mawson, J. Humphris, A. Chou, M. Pajic, C. J. Scarlett, A. V. Pinho, M. Giry-Laterriere, I. Rooman, J. S. Samra, J. G. Kench, J. A. Lovell, N. D. Merrett, C. W. Toon, K. Epari, N. Q. Nguyen, A. Barbour, N. Zeps, K. Moran-Jones, N. B. Jamieson, J. S. Graham, F. Duthie, K. Oien, J. Hair, R. Grutzmann, A. Maitra, C. A. Iacobuzio-Donahue, C. L. Wolfgang, R. A. Morgan, R. T. Lawlor, V. Corbo, C. Bassi, B. Rusev, P. Capelli, R. Salvia, G. Tortora, D. Mukhopadhyay, G. M. Petersen, I. Australian Pancreatic Cancer Genome, D. M. Munzy, W. E. Fisher, S. A. Karim, J. R. Eshleman, R. H. Hruban, C. Pilarsky, J. P. Morton, O. J. Sansom, A. Scarpa, E. A. Musgrove, U. M. Bailey, O. Hofmann, R. L. Sutherland, D. A. Wheeler, A. J. Gill, R. A. Gibbs, J. V. Pearson, N. Waddell, A. V. Biankin and S. M. Grimmond (2016). "Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer." Nature **531**(7592): 47-52.

Bartkova, J., Z. Horejsi, K. Koed, A. Kramer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldborg, M. Sehested, J. M. Nesland, C. Lukas, T. Orntoft, J. Lukas and J. Bartek (2005). "DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis." Nature **434**(7035): 864-870.

Bartsch, D. K., K. Dietzel, M. Bargello, E. Matthaei, G. Kloppel, I. Esposito, J. T. Heverhagen, T. M. Gress, E. P. Slater and P. Langer (2013). "Multiple small "imaging" branch-duct type intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) in familial pancreatic cancer: indicator for concomitant high grade pancreatic intraepithelial neoplasia?" Fam Cancer **12**(1): 89-96.

Bartsch, D. K., R. Kress, M. Sina-Frey, R. Grutzmann, B. Gerdes, C. Pilarsky, J. W. Heise, K. M. Schulte, M. Colombo-Benkmann, C. Schleicher, H. Witzigmann, O. Pridohl, M. B. Ghadimi, O. Horstmann, W. von Bernstorff, L. Jochimsen, J. Schmidt,

S. Eisold, L. Estevez-Schwarz, S. A. Hahn, K. Schulmann, W. Bock, T. M. Gress, N. Zigel, K. Breitschaft, K. Prenzel, H. Messmann, E. Endlicher, M. Schneider, A. Ziegler, W. Schmiegel, H. Schafer, M. Rothmund and H. Rieder (2004). "Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany." Int J Cancer **110**(6): 902-906.

Biankin, A. V., A. L. Morey, C. S. Lee, J. G. Kench, S. A. Biankin, H. C. Hook, D. R. Head, T. B. Hugh, R. L. Sutherland and S. M. Henshall (2002). "DPC4/Smad4 expression and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma." J Clin Oncol **20**(23): 4531-4542.

Biankin, A. V., N. Waddell, K. S. Kassahn, M. C. Gingras, L. B. Muthuswamy, A. L. Johns, D. K. Miller, P. J. Wilson, A. M. Patch, J. Wu, D. K. Chang, M. J. Cowley, B. B. Gardiner, S. Song, I. Harliwong, S. Idrisoglu, C. Nourse, E. Nourbakhsh, S. Manning, S. Wani, M. Gongora, M. Pajic, C. J. Scarlett, A. J. Gill, A. V. Pinho, I. Rooman, M. Anderson, O. Holmes, C. Leonard, D. Taylor, S. Wood, Q. Xu, K. Nones, J. L. Fink, A. Christ, T. Bruxner, N. Cloonan, G. Kolle, F. Newell, M. Pinese, R. S. Mead, J. L. Humphris, W. Kaplan, M. D. Jones, E. K. Colvin, A. M. Nagrial, E. S. Humphrey, A. Chou, V. T. Chin, L. A. Chantrill, A. Mawson, J. S. Samra, J. G. Kench, J. A. Lovell, R. J. Daly, N. D. Merrett, C. Toon, K. Epari, N. Q. Nguyen, A. Barbour, N. Zeps, I. Australian Pancreatic Cancer Genome, N. Kakkar, F. Zhao, Y. Q. Wu, M. Wang, D. M. Muzny, W. E. Fisher, F. C. Brunnicardi, S. E. Hodges, J. G. Reid, J. Drummond, K. Chang, Y. Han, L. R. Lewis, H. Dinh, C. J. Buhay, T. Beck, L. Timms, M. Sam, K. Begley, A. Brown, D. Pai, A. Panchal, N. Buchner, R. De Borja, R. E. Denroche, C. K. Yung, S. Serra, N. Onetto, D. Mukhopadhyay, M. S. Tsao, P. A. Shaw, G. M. Petersen, S. Gallinger, R. H. Hruban, A. Maitra, C. A. Iacobuzio-Donahue, R. D. Schulick, C. L. Wolfgang, R. A. Morgan, R. T. Lawlor, P. Capelli, V. Corbo, M. Scardoni, G. Tortora, M. A. Tempero, K. M. Mann, N. A. Jenkins, P. A. Perez-Mancera, D. J. Adams, D. A. Largaespada, L. F. Wessels, A. G. Rust, L. D. Stein, D. A. Tuveson, N. G. Copeland, E. A. Musgrove, A. Scarpa, J. R. Eshleman, T. J. Hudson, R. L. Sutherland, D. A. Wheeler, J. V. Pearson, J. D. McPherson, R. A. Gibbs and S. M. Grimmond (2012). "Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes." Nature **491**(7424): 399-405.

Boeck, S., A. Jung, R. P. Laubender, J. Neumann, R. Egg, C. Goritschan, U. Vehling-Kaiser, C. Winkelmann, L. Fischer von Weikersthal, M. R. Clemens, T. C. Gauler, A. Marten, S. Klein, G. Kojouharoff, M. Barner, M. Geissler, T. F. Greten, U. Mansmann, T. Kirchner and V. Heinemann (2013). "EGFR pathway biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: translational results from the randomised, crossover phase 3 trial AIO-PK0104." Br J Cancer **108**(2): 469-476.

Boone, B. A., S. Sabbaghian, M. Zenati, J. W. Marsh, A. J. Moser, A. H. Zureikat, A. D. Singhi, H. J. Zeh, 3rd and A. M. Krasinskas (2014). "Loss of SMAD4 staining in pre-operative cell blocks is associated with distant metastases following pancreaticoduodenectomy with venous resection for pancreatic cancer." J Surg Oncol **110**(2): 171-175.

Borazanci, E., S. Z. Millis, R. Korn, H. Han, C. J. Whatcott, Z. Gatalica, M. T. Barrett, D. Cridebring and D. D. Von Hoff (2015). "Adenosquamous carcinoma of the pancreas: Molecular characterization of 23 patients along with a literature review." World J Gastrointest Oncol **7**(9): 132-140.

Bosman, F. T., F. Carneiro, R. H. Hruban and N. D. Theise, Eds. (2010). WHO Classification of Tumours of the Digestive System. WHO Classification of Tumours, IARC.

- Caldas, C. and S. E. Kern (1995). "K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma." Int J Pancreatol **18**(1): 1-6.
- Calhoun, E. S., J. B. Jones, R. Ashfaq, V. Adsay, S. J. Baker, V. Valentine, P. M. Hempen, W. Hilgers, C. J. Yeo, R. H. Hruban and S. E. Kern (2003). "BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) mutations in distinct subsets of pancreatic cancer: potential therapeutic targets." Am J Pathol **163**(4): 1255-1260.
- Collins, M. A., F. Bednar, Y. Zhang, J. C. Brisset, S. Galban, C. J. Galban, S. Rakshit, K. S. Flannagan, N. V. Adsay and M. Pasca di Magliano (2012). "Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice." J Clin Invest **122**(2): 639-653.
- Collins, M. A., J. C. Brisset, Y. Zhang, F. Bednar, J. Pierre, K. A. Heist, C. J. Galban, S. Galban and M. P. di Magliano (2012). "Metastatic pancreatic cancer is dependent on oncogenic Kras in mice." PLoS One **7**(12): e49707.
- Collisson, E. A., A. Sadanandam, P. Olson, W. J. Gibb, M. Truitt, S. Gu, J. Cooc, J. Weinkle, G. E. Kim, L. Jakkula, H. S. Feiler, A. H. Ko, A. B. Olshen, K. L. Danenberg, M. A. Tempero, P. T. Spellman, D. Hanahan and J. W. Gray (2011). "Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy." Nat Med **17**(4): 500-503.
- da Cunha Santos, G., N. Dhani, D. Tu, K. Chin, O. Ludkovski, S. Kamel-Reid, J. Squire, W. Parulekar, M. J. Moore and M. S. Tsao (2010). "Molecular predictors of outcome in a phase 3 study of gemcitabine and erlotinib therapy in patients with advanced pancreatic cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study PA.3." Cancer **116**(24): 5599-5607.
- Derynck, R. and X. H. Feng (1997). "TGF-beta receptor signaling." Biochim Biophys Acta **1333**(2): F105-150.
- di Magliano, M. P. and C. D. Logsdon (2013). "Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression." Gastroenterology **144**(6): 1220-1229.
- Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P. G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P. G. Pelicci and F. d'Adda di Fagagna (2006). "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication." Nature **444**(7119): 638-642.
- Diab, S. G., G. M. Clark, C. K. Osborne, A. Libby, D. C. Allred and R. M. Elledge (1999). "Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas." J Clin Oncol **17**(5): 1442-1448.
- DiGiuseppe, J. A., R. H. Hruban, S. N. Goodman, M. Polak, F. M. van den Berg, D. C. Allison, J. L. Cameron and G. J. Offerhaus (1994). "Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas." Am J Clin Pathol **101**(6): 684-688.
- Donahue, T. R. and H. A. Reber (2015). "Surgical management of pancreatic cancer-pancreaticoduodenectomy." Semin Oncol **42**(1): 98-109.
- Eser, S., A. Schnieke, G. Schneider and D. Saur (2014). "Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer." Br J Cancer **111**(5): 817-822.
- Esposito, I., J. Kleeff, F. Bergmann, C. Reiser, E. Herpel, H. Friess, P. Schirmacher and M. W. Buchler (2008). "Most pancreatic cancer resections are R1 resections." Ann Surg Oncol **15**(6): 1651-1660.

- Esposito, I., B. Konukiewitz, A. M. Schlitter and G. Kloppel (2012). "[New insights into the origin of pancreatic cancer. Role of atypical flat lesions in pancreatic carcinogenesis]." Pathologie **33 Suppl 2**: 189-193.
- Esposito, I., B. Konukiewitz, A. M. Schlitter and G. Kloppel (2014). "Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: facts, challenges and future developments." World J Gastroenterol **20**(38): 13833-13841.
- Esposito, I., A. Segler, K. Steiger and G. Kloppel (2015). "Pathology, genetics and precursors of human and experimental pancreatic neoplasms: An update." Pancreatology **15**(6): 598-610.
- Feakins, R., Campbell, F., Verbeke, C. S. (2013). "Survey of UK histopathologists' approach to the reporting of resection specimens for carcinomas of the pancreatic head." J of Clinical Pathology **66**: 715-717
- Fogelman, D. R., R. A. Wolff, S. Kopetz, M. Javle, C. Bradley, I. Mok, F. Cabanillas and J. L. Abbruzzese (2011). "Evidence for the efficacy of Iniparib, a PARP-1 inhibitor, in BRCA2-associated pancreatic cancer." Anticancer Res **31**(4): 1417-1420.
- Geradts, J., R. H. Hruban, M. Schutte, S. E. Kern and R. Maynard (2000). "Immunohistochemical p16INK4a analysis of archival tumors with deletion, hypermethylation, or mutation of the CDKN2/MTS1 gene. A comparison of four commercial antibodies." Appl Immunohistochem Mol Morphol **8**(1): 71-79.
- Goggins, M., G. J. Offerhaus, W. Hilgers, C. A. Griffin, M. Shekher, D. Tang, T. A. Sohn, C. J. Yeo, S. E. Kern and R. H. Hruban (1998). "Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+." Am J Pathol **152**(6): 1501-1507.
- Gorgoulis, V. G., L. V. Vassiliou, P. Karakaidos, P. Zacharatos, A. Kotsinas, T. Liloglou, M. Venere, R. A. Ditullio, Jr., N. G. Kastrinakis, B. Levy, D. Kletsas, A. Yoneta, M. Herlyn, C. Kittas and T. D. Halazonetis (2005). "Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions." Nature **434**(7035): 907-913.
- Guerra, C., A. J. Schuhmacher, M. Canamero, P. J. Grippo, L. Verdaguer, L. Perez-Gallego, P. Dubus, E. P. Sandgren and M. Barbacid (2007). "Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice." Cancer Cell **11**(3): 291-302.
- Hahn, S. A., A. T. Hoque, C. A. Moskaluk, L. T. da Costa, M. Schutte, E. Rozenblum, A. B. Seymour, C. L. Weinstein, C. J. Yeo, R. H. Hruban and S. E. Kern (1996). "Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer." Cancer Res **56**(3): 490-494.
- Hainaut, P. and M. Hollstein (2000). "p53 and human cancer: the first ten thousand mutations." Adv Cancer Res **77**: 81-137.
- Halazonetis, T. D., V. G. Gorgoulis and J. Bartek (2008). "An oncogene-induced DNA damage model for cancer development." Science **319**(5868): 1352-1355.
- Harris, C. C. and M. Hollstein (1993). "Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene." N Engl J Med **329**(18): 1318-1327.
- Hartwig, W., T. Hackert, U. Hinz, A. Gluth, F. Bergmann, O. Strobel, M. W. Buchler and J. Werner (2011). "Pancreatic cancer surgery in the new millennium: better prediction of outcome." Ann Surg **254**(2): 311-319.

- Hartwig, W., C. M. Vollmer, A. Fingerhut, C. J. Yeo, J. P. Neoptolemos, M. Adham, A. Andren-Sandberg, H. J. Asbun, C. Bassi, M. Bockhorn, R. Charnley, K. C. Conlon, C. Dervenis, L. Fernandez-Cruz, H. Friess, D. J. Gouma, C. W. Imrie, K. D. Lillemoe, M. N. Milicevic, M. Montorsi, S. V. Shrikhande, Y. K. Vashist, J. R. Izbicki, M. W. Buchler and S. International Study Group on Pancreatic (2014). "Extended pancreatectomy in pancreatic ductal adenocarcinoma: definition and consensus of the International Study Group for Pancreatic Surgery (ISGPS)." Surgery **156**(1): 1-14.
- Hinds, P. W., C. A. Finlay, R. S. Quartin, S. J. Baker, E. R. Fearon, B. Vogelstein and A. J. Levine (1990). "Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes." Cell Growth Differ **1**(12): 571-580.
- Hingorani, S. R., E. F. Petricoin, A. Maitra, V. Rajapakse, C. King, M. A. Jacobetz, S. Ross, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, B. A. Hitt, Y. Kawaguchi, D. Johann, L. A. Liotta, H. C. Crawford, M. E. Putt, T. Jacks, C. V. Wright, R. H. Hruban, A. M. Lowy and D. A. Tuveson (2003). "Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse." Cancer Cell **4**(6): 437-450.
- Hortobagyi, G. N. (2005). "Trastuzumab in the treatment of breast cancer." N Engl J Med **353**(16): 1734-1736.
- Hosoda, W., Chianchiano, P., Griffin, J.F., Pittman, M., Brosens, L. A., Noe, M., Yu, J., Shindo, K., Suenaga, M. Rezaee, N., Yonescu, R., Ning, Y., Albores-Saavedra, J., Yoshizawa, N., Harada, K., Yoshizawa, A., Hanada, K., Yonehaa, S., Shimizu, M., Uehara, T., Samra, J.S., Gill, A. J., Wolfgang, C.L., Goggins, M.G., Hruban, R. H. Wood, L (2017). " Genetic analyses of isolated high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (HG-PanIN) reveal paucity of alterations in TP53 and SMAD4." J Pathol **242** (1): 16-23
- Hruban, R. H., M. I. Canto, M. Goggins, R. Schulick and A. P. Klein (2010). "Update on familial pancreatic cancer." Adv Surg **44**: 293-311.
- Hruban, R. H. and N. Fukushima (2007). "Pancreatic adenocarcinoma: update on the surgical pathology of carcinomas of ductal origin and PanINs." Mod Pathol **20 Suppl 1**: S61-70.
- Hruban, R. H., M. Goggins, J. Parsons and S. E. Kern (2000). "Progression model for pancreatic cancer." Clin Cancer Res **6**(8): 2969-2972.
- Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin and A. Zumla (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." Genes Immun **6**(4): 279-284.
- Iacobuzio-Donahue, C. A., V. E. Velculescu, C. L. Wolfgang and R. H. Hruban (2012). "Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing." Clin Cancer Res **18**(16): 4257-4265.
- Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu and M. J. Thun (2009). "Cancer statistics, 2009." CA Cancer J Clin **59**(4): 225-249.
- Jiang, L., J. H. Hickman, S. J. Wang and W. Gu (2015). "Dynamic roles of p53-mediated metabolic activities in ROS-induced stress responses." Cell Cycle: 0.
- Jones, S., X. Zhang, D. W. Parsons, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, H. Kamiyama, A. Jimeno, S. M. Hong, B. Fu, M. T. Lin, E. S. Calhoun, M. Kamiyama, K. Walter, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D. R. Smith, M. Hidalgo, S. D. Leach, A. P. Klein, E. M. Jaffee, M. Goggins, A. Maitra, C. Iacobuzio-Donahue,

- J. R. Eshleman, S. E. Kern, R. H. Hruban, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu and K. W. Kinzler (2008). "Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses." Science **321**(5897): 1801-1806.
- Kanda, M., H. Matthaei, J. Wu, S. M. Hong, J. Yu, M. Borges, R. H. Hruban, A. Maitra, K. Kinzler, B. Vogelstein and M. Goggins (2012). "Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia." Gastroenterology **142**(4): 730-733 e739.
- Kardon, D. E., L. D. Thompson, R. M. Przygodzki and C. S. Heffess (2001). "Adenosquamous carcinoma of the pancreas: a clinicopathologic series of 25 cases." Mod Pathol **14**(5): 443-451.
- Kelly, P. J., S. Shinagare, N. Sainani, X. Hong, C. Ferrone, O. Yilmaz, C. Fernandez-del Castillo, G. Y. Lauwers and V. Deshpande (2012). "Cystic papillary pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma: a heretofore undescribed morphologic pattern that mimics intraductal papillary mucinous carcinoma." Am J Surg Pathol **36**(5): 696-701.
- Klimstra, D. S. and G. Klöppel, Eds. (2013). Tumors of the Exocrine Pancreas. Diagnostic Histopathology of Tumors. Philadelphia, Churchill Livingstone Elsevier.
- Kloppel, G., O. Basturk, A. M. Schlitter, B. Konukiewitz and I. Esposito (2014). "Intraductal neoplasms of the pancreas." Semin Diagn Pathol **31**(6): 452-466.
- Klöppel, G., B. Sipos and D. S. Klimstra (2008). Pathology of exocrine pancreatic tumors. Oxford, Blackwell.
- Koch-Institut, R. (2009/2010). Krebs in Deutschland Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. R. Koch-Institut. Berlin 2013. **9. Ausgabe**.
- Koorstra, J. B., S. M. Hong, C. Shi, A. K. Meeker, J. K. Ryu, G. J. Offerhaus, M. G. Goggins, R. H. Hruban and A. Maitra (2009). "Widespread activation of the DNA damage response in human pancreatic intraepithelial neoplasia." Mod Pathol **22**(11): 1439-1445.
- Kotake, Y., M. Naemura, C. Murasaki, Y. Inoue and H. Okamoto (2015). "Transcriptional Regulation of the p16 Tumor Suppressor Gene." Anticancer Res **35**(8): 4397-4401.
- Krejs, G. J. (2010). "Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors." Dig Dis **28**(2): 355-358.
- Krishnamurthy, J., C. Torrice, M. R. Ramsey, G. I. Kovalev, K. Al-Regaiey, L. Su and N. E. Sharpless (2004). "Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging." J Clin Invest **114**(9): 1299-1307.
- Kulke, M. H., L. S. Blaszkowsky, D. P. Ryan, J. W. Clark, J. A. Meyerhardt, A. X. Zhu, P. C. Enzinger, E. L. Kwak, A. Muzikansky, C. Lawrence and C. S. Fuchs (2007). "Capecitabine plus erlotinib in gemcitabine-refractory advanced pancreatic cancer." J Clin Oncol **25**(30): 4787-4792.
- Lagna, G., A. Hata, A. Hemmati-Brivanlou and J. Massague (1996). "Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways." Nature **383**(6603): 832-836.
- Lazzerini Denchi, E., C. Attwooll, D. Pasini and K. Helin (2005). "Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland." Mol Cell Biol **25**(7): 2660-2672.

- Lee, J., K. T. Jang, C. S. Ki, T. Lim, Y. S. Park, H. Y. Lim, D. W. Choi, W. K. Kang, K. Park and J. O. Park (2007). "Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma." Cancer **109**(8): 1561-1569.
- Li, J., M. J. Poi and M. D. Tsai (2011). "Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer." Biochemistry **50**(25): 5566-5582.
- Lubezky, N., M. Ben-Haim, S. Marmor, E. Brazowsky, G. Rechavi, J. M. Klausner and Y. Cohen (2011). "High-throughput mutation profiling in intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN)." J Gastrointest Surg **15**(3): 503-511.
- Lucchini, C., Capelli, P., Scarpa, A. (2016). "Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants." Surg Pathol Clin **9**(4): 547-560
- Maitra, A., N. V. Adsay, P. Argani, C. Iacobuzio-Donahue, A. De Marzo, J. L. Cameron, C. J. Yeo and R. H. Hruban (2003). "Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray." Mod Pathol **16**(9): 902-912.
- Mazur, P. K. and J. T. Siveke (2012). "Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology." Gut **61**(10): 1488-1500.
- McCormick, F. (1995). "Ras-related proteins in signal transduction and growth control." Mol Reprod Dev **42**(4): 500-506.
- Melhem, M. F., J. C. Law, L. el-Ashmawy, J. T. Johnson, R. J. Landreneau, S. Srivastava and T. L. Whiteside (1995). "Assessment of sensitivity and specificity of immunohistochemical staining of p53 in lung and head and neck cancers." Am J Pathol **146**(5): 1170-1177.
- Mirzoeva, O. K., E. A. Collisson, P. M. Schaefer, B. Hann, Y. K. Hom, A. H. Ko and W. M. Korn (2013). "Subtype-specific MEK-PI3 kinase feedback as a therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma." Mol Cancer Ther **12**(10): 2213-2225.
- Morris, J. P. t., S. C. Wang and M. Hebrok (2010). "KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma." Nat Rev Cancer **10**(10): 683-695.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.
- Noll, E. M., C. Eisen, A. Stenzinger, E. Espinet, A. Muckenhuber, C. Klein, V. Vogel, B. Klaus, W. Nadler, C. Rosli, C. Lutz, M. Kulke, J. Engelhardt, F. M. Zickgraf, O. Espinosa, M. Schlesner, X. Jiang, A. Kopp-Schneider, P. Neuhaus, M. Bahra, B. V. Sinn, R. Eils, N. A. Giese, T. Hackert, O. Strobel, J. Werner, M. W. Buchler, W. Weichert, A. Trumpp and M. R. Sprick (2016). "CYP3A5 mediates basal and acquired therapy resistance in different subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma." Nat Med **22**(3): 278-287.
- Obata, A., M. Eura, J. Sasaki, H. Saya, K. Chikamatsu, M. Tada, R. D. Iggo and E. Yumoto (2000). "Clinical significance of p53 functional loss in squamous cell carcinoma of the oropharynx." Int J Cancer **89**(2): 187-193.
- Ogura, T., K. Yamao, K. Hara, N. Mizuno, S. Hijioka, H. Imaoka, A. Sawaki, Y. Niwa, M. Tajika, S. Kondo, T. Tanaka, Y. Shimizu, V. Bhatia, K. Higuchi, W. Hosoda and Y. Yatabe (2013). "Prognostic value of K-ras mutation status and subtypes in endoscopic

ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens from patients with unresectable pancreatic cancer." J Gastroenterol **48**(5): 640-646.

Oshima, M., K. Okano, S. Muraki, R. Haba, T. Maeba, Y. Suzuki and S. Yachida (2013). "Immunohistochemically detected expression of 3 major genes (CDKN2A/p16, TP53, and SMAD4/DPC4) strongly predicts survival in patients with resectable pancreatic cancer." Ann Surg **258**(2): 336-346.

Paulson, A. S., H. S. Tran Cao, M. A. Tempero and A. M. Lowy (2013). "Therapeutic advances in pancreatic cancer." Gastroenterology **144**(6): 1316-1326.

Pellegata, N. S., F. Sessa, B. Renault, M. Bonato, B. E. Leone, E. Solcia and G. N. Ranzani (1994). "K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions." Cancer Res **54**(6): 1556-1560.

Philip, P. A., J. Benedetti, C. L. Corless, R. Wong, E. M. O'Reilly, P. J. Flynn, K. M. Rowland, J. N. Atkins, B. C. Mirtsching, S. E. Rivkin, A. A. Khorana, B. Goldman, C. M. Fenoglio-Preiser, J. L. Abbruzzese and C. D. Blanke (2010). "Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205." J Clin Oncol **28**(22): 3605-3610.

Pylayeva-Gupta, Y., E. Grabocka and D. Bar-Sagi (2011). "RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web." Nat Rev Cancer **11**(11): 761-774.

Qiu, W., F. Sahin, C. A. Iacobuzio-Donahue, D. Garcia-Carracedo, W. M. Wang, C. Y. Kuo, D. Chen, D. E. Arking, A. M. Lowy, R. H. Hruban, H. E. Remotti and G. H. Su (2011). "Disruption of p16 and activation of Kras in pancreas increase ductal adenocarcinoma formation and metastasis in vivo." Oncotarget **2**(11): 862-873.

Rachakonda, P. S., A. S. Bauer, H. Xie, D. Campa, C. Rizzato, F. Canzian, S. Beghelli, W. Greenhalf, E. Costello, M. Schanne, A. Heller, A. Scarpa, J. P. Neoptolemos, J. Werner, M. Buchler, J. D. Hoheisel, K. Hemminki, N. Giese and R. Kumar (2013). "Somatic mutations in exocrine pancreatic tumors: association with patient survival." PLoS One **8**(4): e60870.

Rajalingam, K., R. Schreck, U. R. Rapp and S. Albert (2007). "Ras oncogenes and their downstream targets." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1177-1195.

Rakha, E. A., A. H. Lee, A. J. Evans, S. Menon, N. Y. Assad, Z. Hodi, D. Macmillan, R. W. Blamey and I. O. Ellis (2010). "Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis." J Clin Oncol **28**(1): 99-104.

Rakha, E. A., S. E. Pinder, S. J. Shi and H. Tsuda, Eds. (2012). Tubular Carcinoma and Cribriform Carcinoma. WHO Classification of Tumours of the Breast. International Agency for Research on Cancer, Lyon, World Health Organization.

Rayess, H., M. B. Wang and E. S. Srivatsan (2012). "Cellular senescence and tumor suppressor gene p16." Int J Cancer **130**(8): 1715-1725.

Reddy, S. A. (2001). "Signaling pathways in pancreatic cancer." Cancer J **7**(4): 274-286.

Redston, M. S., C. Caldas, A. B. Seymour, R. H. Hruban, L. da Costa, C. J. Yeo and S. E. Kern (1994). "p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions." Cancer Res **54**(11): 3025-3033.

- Riener, M. O., E. Nikolopoulos, A. Herr, P. J. Wild, M. Hausmann, T. Wiech, M. Orłowska-Volk, S. Lassmann, A. Walch and M. Werner (2008). "Microarray comparative genomic hybridization analysis of tubular breast carcinoma shows recurrent loss of the CDH13 locus on 16q." Hum Pathol **39**(11): 1621-1629.
- Robert-Koch-Institut, Ed. (2011/2012). Krebs in Deutschland. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin.
- Rozenblum, E., M. Schutte, M. Goggins, S. A. Hahn, S. Panzer, M. Zahurak, S. N. Goodman, T. A. Sohn, R. H. Hruban, C. J. Yeo and S. E. Kern (1997). "Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma." Cancer Res **57**(9): 1731-1734.
- Sanger, F., J. E. Donelson, A. R. Coulson, H. Kossel and D. Fischer (1974). "Determination of a nucleotide sequence in bacteriophage f1 DNA by primed synthesis with DNA polymerase." J Mol Biol **90**(2): 315-333.
- Scarpa, A., P. Capelli, K. Mukai, G. Zamboni, T. Oda, C. Iacono and S. Hirohashi (1993). "Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations." Am J Pathol **142**(5): 1534-1543.
- Schlitter, A. M. and I. Esposito (2010). "Definition of microscopic tumor clearance (r0) in pancreatic cancer resections." Cancers (Basel) **2**(4): 2001-2010.
- Schlitter, A. M., K. T. Jang, G. Kloppel, B. Saka, S. M. Hong, H. Choi, G. J. Offerhaus, R. H. Hruban, Y. Zen, B. Konukiewitz, I. Regel, M. Allgauer, S. Balci, O. Basturk, M. D. Reid, I. Esposito and V. Adsay (2015). "Intraductal tubulopapillary neoplasms of the bile ducts: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular analysis of 20 cases." Mod Pathol.
- Schlitter, A. M., G. Kloppel and I. Esposito (2013). "[Intraductal papillary neoplasms of the bile duct (IPNB). Diagnostic criteria, carcinogenesis and differential diagnostics]." Pathologe **34 Suppl 2**: 235-240.
- Schmidt, C. R., Y. J. Gi, T. A. Patel, R. J. Coffey, R. D. Beauchamp and A. S. Pearson (2005). "E-cadherin is regulated by the transcriptional repressor SLUG during Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells." Surgery **138**(2): 306-312.
- Schutte, M., R. H. Hruban, J. Geradts, R. Maynard, W. Hilgers, S. K. Rabindran, C. A. Moskaluk, S. A. Hahn, I. Schwarte-Waldhoff, W. Schmiegel, S. B. Baylin, S. E. Kern and J. G. Herman (1997). "Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas." Cancer Res **57**(15): 3126-3130.
- Schwarte-Waldhoff, I., O. V. Volpert, N. P. Bouck, B. Sipos, S. A. Hahn, S. Klein-Scory, J. Luttges, G. Kloppel, U. Graeven, C. Eilert-Micus, A. Hintelmann and W. Schmiegel (2000). "Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9624-9629.
- Seidel, G., M. Zahurak, C. Iacobuzio-Donahue, T. A. Sohn, N. V. Adsay, C. J. Yeo, K. D. Lillemoe, J. L. Cameron, R. H. Hruban and R. E. Wilentz (2002). "Almost all infiltrating colloid carcinomas of the pancreas and periampullary region arise from in situ papillary neoplasms: a study of 39 cases." Am J Surg Pathol **26**(1): 56-63.
- Seidler, B., A. Schmidt, U. Mayr, H. Nakhai, R. M. Schmid, G. Schneider and D. Saur (2008). "A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knockdown in vivo by using avian retroviral vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 10137-10142.
- Shi, C., R. H. Hruban and A. P. Klein (2009). "Familial pancreatic cancer." Arch Pathol Lab Med **133**(3): 365-374.

- Shi, C., A. P. Klein, M. Goggins, A. Maitra, M. Canto, S. Ali, R. Schulick, E. Palmisano and R. H. Hruban (2009). "Increased Prevalence of Precursor Lesions in Familial Pancreatic Cancer Patients." Clin Cancer Res **15**(24): 7737-7743.
- Shin, S. H., S. C. Kim, S. M. Hong, Y. H. Kim, K. B. Song, K. M. Park and Y. J. Lee (2013). "Genetic alterations of K-ras, p53, c-erbB-2, and DPC4 in pancreatic ductal adenocarcinoma and their correlation with patient survival." Pancreas **42**(2): 216-222.
- Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2015). "Cancer statistics, 2015." CA Cancer J Clin **65**(1): 5-29.
- Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2016). "Cancer statistics, 2016." CA Cancer J Clin **66**(1): 7-30.
- Singh, A., P. Greninger, D. Rhodes, L. Koopman, S. Violette, N. Bardeesy and J. Settleman (2009). "A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival." Cancer Cell **15**(6): 489-500.
- Singh, P., R. Srinivasan and J. D. Wig (2012). "SMAD4 genetic alterations predict a worse prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma." Pancreas **41**(4): 541-546.
- Sinn, B. V., J. K. Striefler, M. A. Rudl, A. Lehmann, M. Bahra, C. Denkert, M. Sinn, J. Stieler, F. Klauschen, J. Budczies, W. Weichert, A. Stenzinger, C. Kamphues, M. Dietel and H. Riess (2014). "KRAS mutations in codon 12 or 13 are associated with worse prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma." Pancreas **43**(4): 578-583.
- Sipos, B., S. Frank, T. Gress, S. Hahn and G. Kloppel (2009). "Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated." Pancreatology **9**(1-2): 45-54.
- Sjogren, S., M. Inganas, T. Norberg, A. Lindgren, H. Nordgren, L. Holmberg and J. Bergh (1996). "The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry." J Natl Cancer Inst **88**(3-4): 173-182.
- Sobin, L., M. Gospodarowicz and C. Wittekind, Eds. (2009). The TNM Classification of Malignant Tumours, Wiley- Blackwell.
- Solcia, E., C. Capella and G. Klöppel (1997). Tumors of the Pancreas. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, Blackwell.
- Spath, C., U. Nitsche, T. Muller, C. Michalski, M. Erkan, B. Kong and J. Kleeff (2015). "Strategies to improve the outcome in locally advanced pancreatic cancer." Minerva Chir **70**(2): 97-106.
- Tan, C. and X. Du (2012). "KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer." World J Gastroenterol **18**(37): 5171-5180.
- Tornillo, L. (2014). "Gastrointestinal stromal tumor - an evolving concept." Front Med (Lausanne) **1**: 43.
- Trikudanathan, G. and C. A. Dasanu (2010). "Adenosquamous carcinoma of the pancreas: a distinct clinicopathologic entity." South Med J **103**(9): 903-910.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K.

Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferreira, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yoosheph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh and X. Zhu (2001). "The sequence of the human genome." *Science* **291**(5507): 1304-1351.

Verbeke, C. (2016) "Morphological heterogeneity in ductal adenocarcinoma of the pancreas - Does it matter?" *Pancreatology* **16**(3):295-301

Villarroel, M. C., N. V. Rajeshkumar, I. Garrido-Laguna, A. De Jesus-Acosta, S. Jones, A. Maitra, R. H. Hruban, J. R. Eshleman, A. Klein, D. Laheru, R. Donehower and M. Hidalgo (2011). "Personalizing cancer treatment in the age of global genomic analyses: PALB2 gene mutations and the response to DNA damaging agents in pancreatic cancer." *Mol Cancer Ther* **10**(1): 3-8.

Vogelstein, B., D. Lane and A. J. Levine (2000). "Surfing the p53 network." *Nature* **408**(6810): 307-310.

Vogelstein, B., N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, Jr. and K. W. Kinzler (2013). "Cancer genome landscapes." *Science* **339**(6127): 1546-1558.

Waddell, N., M. Pajic, A. M. Patch, D. K. Chang, K. S. Kassahn, P. Bailey, A. L. Johns, D. Miller, K. Nones, K. Quek, M. C. Quinn, A. J. Robertson, M. Z. Fadlullah, T. J. Bruxner, A. N. Christ, I. Harliwong, S. Idrisoglu, S. Manning, C. Nourse, E. Nourbakhsh, S. Wani, P. J. Wilson, E. Markham, N. Cloonan, M. J. Anderson, J. L. Fink, O. Holmes, S. H. Kazakoff, C. Leonard, F. Newell, B. Poudel, S. Song, D. Taylor, N. Waddell, S. Wood, Q. Xu, J. Wu, M. Pinese, M. J. Cowley, H. C. Lee, M. D. Jones,

- A. M. Nagrial, J. Humphris, L. A. Chantrill, V. Chin, A. M. Steinmann, A. Mawson, E. S. Humphrey, E. K. Colvin, A. Chou, C. J. Scarlett, A. V. Pinho, M. Giry-Laterriere, I. Rومان, J. S. Samra, J. G. Kench, J. A. Pettitt, N. D. Merrett, C. Toon, K. Epari, N. Q. Nguyen, A. Barbour, N. Zeps, N. B. Jamieson, J. S. Graham, S. P. Niclou, R. Bjerkvig, R. Grutzmann, D. Aust, R. H. Hruban, A. Maitra, C. A. Iacobuzio-Donahue, C. L. Wolfgang, R. A. Morgan, R. T. Lawlor, V. Corbo, C. Bassi, M. Falconi, G. Zamboni, G. Tortora, M. A. Tempero, I. Australian Pancreatic Cancer Genome, A. J. Gill, J. R. Eshleman, C. Pilarsky, A. Scarpa, E. A. Musgrove, J. V. Pearson, A. V. Biankin and S. M. Grimmond (2015). "Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer." *Nature* **518**(7540): 495-501.
- Wilentz, R. E., J. Geradts, R. Maynard, G. J. Offerhaus, M. Kang, M. Goggins, C. J. Yeo, S. E. Kern and R. H. Hruban (1998). "Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression." *Cancer Res* **58**(20): 4740-4744.
- Wilentz, R. E., M. Goggins, M. Redston, V. A. Marcus, N. V. Adsay, T. A. Sohn, S. S. Kadkol, C. J. Yeo, M. Choti, M. Zahurak, K. Johnson, M. Tascilar, G. J. Offerhaus, R. H. Hruban and S. E. Kern (2000). "Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity." *Am J Pathol* **156**(5): 1641-1651.
- Wilentz, R. E., G. H. Su, J. L. Dai, A. B. Sparks, P. Argani, T. A. Sohn, C. J. Yeo, S. E. Kern and R. H. Hruban (2000). "Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas : a new marker of DPC4 inactivation." *Am J Pathol* **156**(1): 37-43.
- Winter, J. M., L. H. Tang, D. S. Klimstra, W. Liu, I. Linkov, M. F. Brennan, M. I. D'Angelica, R. P. DeMatteo, Y. Fong, W. R. Jarnagin, M. O'Reilly E and P. J. Allen (2013). "Failure patterns in resected pancreas adenocarcinoma: lack of predicted benefit to SMAD4 expression." *Ann Surg* **258**(2): 331-335.
- Witkiewicz, A. K., E. A. McMillan, U. Balaji, G. Baek, W. C. Lin, J. Mansour, M. Mollaei, K. U. Wagner, P. Koduru, A. Yopp, M. A. Choti, C. J. Yeo, P. McCue, M. A. White and E. S. Knudsen (2015). "Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets." *Nat Commun* **6**: 6744.
- Wittwer, C. T., G. H. Reed, C. N. Gundry, J. G. Vandersteen and R. J. Pryor (2003). "High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen." *Clin Chem* **49**(6 Pt 1): 853-860.
- Wolpin, B. M., P. Kraft, M. Gross, K. Helzlsouer, H. B. Bueno-de-Mesquita, E. Steplowski, R. Z. Stolzenberg-Solomon, A. A. Arslan, E. J. Jacobs, A. Lacroix, G. Petersen, W. Zheng, D. Albanes, N. E. Allen, L. Amundadottir, G. Anderson, M. C. Boutron-Ruault, J. E. Buring, F. Canzian, S. J. Chanock, S. Clipp, J. M. Gaziano, E. L. Giovannucci, G. Hallmans, S. E. Hankinson, R. N. Hoover, D. J. Hunter, A. Hutchinson, K. Jacobs, C. Kooperberg, S. M. Lynch, J. B. Mendelsohn, D. S. Michaud, K. Overvad, A. V. Patel, A. Rajkovic, M. J. Sanchez, X. O. Shu, N. Slimani, G. Thomas, G. S. Tobias, D. Trichopoulos, P. Vineis, J. Virtamo, J. Wactawski-Wende, K. Yu, A. Zeleniuch-Jacquotte, P. Hartge and C. S. Fuchs (2010). "Pancreatic cancer risk and ABO blood group alleles: results from the pancreatic cancer cohort consortium." *Cancer Res* **70**(3): 1015-1023.
- Wood, L. D. and R. H. Hruban (2012). "Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms." *Cancer J* **18**(6): 492-501.

- Wu, J., Y. Jiao, M. Dal Molin, A. Maitra, R. F. de Wilde, L. D. Wood, J. R. Eshleman, M. G. Goggins, C. L. Wolfgang, M. I. Canto, R. D. Schulick, B. H. Edil, M. A. Choti, V. Adsay, D. S. Klimstra, G. J. Offerhaus, A. P. Klein, L. Kopelovich, H. Carter, R. Karchin, P. J. Allen, C. M. Schmidt, Y. Naito, L. A. Diaz, Jr., K. W. Kinzler, N. Papadopoulos, R. H. Hruban and B. Vogelstein (2011). "Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(52): 21188-21193.
- Wynford-Thomas, D. (1992). "P53 in tumour pathology: can we trust immunocytochemistry?" J Pathol **166**(4): 329-330.
- Yachida, S., C. M. White, Y. Naito, Y. Zhong, J. A. Brosnan, A. M. Macgregor-Das, R. A. Morgan, T. Saunders, D. A. Laheru, J. M. Herman, R. H. Hruban, A. P. Klein, S. Jones, V. Velculescu, C. L. Wolfgang and C. A. Iacobuzio-Donahue (2012). "Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors." Clin Cancer Res **18**(22): 6339-6347.
- Ying, H., A. C. Kimmelman, C. A. Lyssiotis, S. Hua, G. C. Chu, E. Fletcher-Sananikone, J. W. Locasale, J. Son, H. Zhang, J. L. Coloff, H. Yan, W. Wang, S. Chen, A. Viale, H. Zheng, J. H. Paik, C. Lim, A. R. Guimaraes, E. S. Martin, J. Chang, A. F. Hezel, S. R. Perry, J. Hu, B. Gan, Y. Xiao, J. M. Asara, R. Weissleder, Y. A. Wang, L. Chin, L. C. Cantley and R. A. DePinho (2012). "Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism." Cell **149**(3): 656-670.
- Zamboni, G., K. Hirabayashi, P. Castelli and A. M. Lennon (2013). "Precancerous lesions of the pancreas." Best Pract Res Clin Gastroenterol **27**(2): 299-322.
- Zimmermann, G., B. Papke, S. Ismail, N. Vartak, A. Chandra, M. Hoffmann, S. A. Hahn, G. Triola, A. Wittinghofer, P. I. Bastiaens and H. Waldmann (2013). "Small molecule inhibition of the KRAS-PDEdelta interaction impairs oncogenic KRAS signalling." Nature **497**(7451): 638-642.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt...

- ... meiner Doktormutter Frau Professor Dr. med. Irene Esposito für die ausgezeichnete Betreuung, die uneingeschränkte Unterstützung und die wohlwollende Förderung, welche mir auch die Mitarbeit an weiteren Projekten, Publikationen und Kongressen ermöglichte.
- ... Herrn Professor Dr. med. Günter Klöppel für seinen fachlichen Rat, seine bereichernden Anregungen und seine große Hilfsbereitschaft. Seine Begeisterung für das Fach Pathologie färbt auf alle ab, die mit Ihm arbeiten.
- ... Frau Dr. med. Anna Melissa Schlitter für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und die wertvollen Diskussionen. Außerdem möchte ich mich für die Freundschaft bedanken, welche die Arbeit an diesem Projekt bereichert und erleichtert hat.
- ... Herr Carsten Jäger für die hervorragende Arbeit und Zusammenarbeit, das freundschaftliche Verhältnis und die unersetzliche Hilfe bei statistischen Fragestellungen.
- ... Frau Dr. med. vet. Katja Steiger und Herrn Dr. med. Björn Konukiewitz für die großzügige und bereichernde Hilfe und Unterstützung.
- ... allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die fröhlichen Stunden, den gemeinschaftlichen Umgang und die Unterstützung.
- ... Frau Nicole Pfarr und Dr. rer. nat. Ivonne Regel für die Anfertigung der *Whole-Exome* Sequenzierung und LOH Analysen.
- ... Frau Birgt Geiß, Frau Daniela Angermeier und Frau Petra Meyer und allen Mitgliedern des molekularbiologischen Labors des Instituts für die Einführung in und Unterstützung bei der molekulargenetischen Methodik.
- ... von Herzen meinen Eltern und meinen Schwestern für ihre liebevolle Unterstützung, ihre Geduld und ihre stetige Begleitung.

Dieses Projekt wurde unterstützt von der Novartis AG



SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Molecular, morphological and survival analysis of 177 resected pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs): Identification of prognostic subtypes

Anna Melissa Schlitter^{1,*}, Angela Segler^{1,*}, Katja Steiger¹, Christoph W. Michalski², Carsten Jäger³, Björn Konukiewitz¹, Nicole Pfarr¹, Volker Endris⁴, Markus Bettstetter⁵, Bo Kong³, Ivonne Regel⁶, Jörg Kleeff^{7,8}, Günter Klöppel^{1,†} & Irene Esposito^{6,†}

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) has generally a poor prognosis, but recent data suggest that there are molecular subtypes differing in clinical outcome. This study examines the association between histopathologic heterogeneity, genetic profile, and survival. Tumor histology from 177 resected PDAC patients with follow-up data was subclassified according to predominant growth pattern, and four key genes were analyzed. PDACs were classified as conventional (51%), combined with a predominant component (41%), variants and special carcinomas (8%). Patients with combined PDACs and a dominant cribriform component survived longer than patients with conventional or other combined PDACs. Genetic alterations in at least two out of four genes were found in 95% of the patients (*KRAS* 93%, *TP53* 79%, *CDKN2A/p16* 75%, *SMAD4* 37%). Patients with less than four mutations survived significantly longer ($p = 0.04$) than those with alterations in all four genes. Patients with either wildtype *KRAS* or *CDKN2A/p16* lived significantly longer than those with alterations in these genes ($p = 0.018$ and $p = 0.006$, respectively). Our data suggest that the number of altered genes, the mutational status of *KRAS* and certain morphological subtypes correlate with the outcome of patients with PDAC. Future pathology reporting of PDAC should therefore include the *KRAS* status and a detailed morphological description.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an aggressive tumor with dismal prognosis. The overall 5-year survival rate is only 6% and after curative surgery less than 25%¹, making PDAC one of the most lethal tumors among solid malignancies². This poor outcome is related to multiple factors, including resistance to chemotherapy and the relatively late stage of diagnosis due to unspecific symptoms and aggressive tumor biology¹.

Over the last decade major improvements have been made in understanding the mechanisms of molecular carcinogenesis in PDACs^{3–7}. The first milestone was the discovery of the molecular fingerprint of PDAC that included the common mutations in *KRAS*, *SMAD4*, *TP53* and *CDKN2A/p16*⁸. Recent advances in gene sequencing⁹ by introduction of high-throughput molecular methods allowed to further address the genetic complexity of PDAC¹⁰. The first global analysis of 24 advanced PDACs using comprehensive exome sequencing revealed a high mutation rate with an average of 63 mutations per case connected to 12 core signaling pathways¹⁰. In 2011, Collisson *et al.* showed that PDACs and murine PDAC cell lines may be stratified by their transcriptional profiles

¹Institute of Pathology, Technische Universität München, Munich, Germany. ²Department of Surgery, University Hospital Heidelberg, Germany. ³Department of Surgery, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Munich, Germany. ⁴Institute of Pathology, University Hospital of Heidelberg, Heidelberg, Germany. ⁵Molecular Pathology South-Bavaria, Munich, Germany. ⁶Institute of Pathology, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany. ⁷The Royal Liverpool and Broadgreen University Hospitals, Prescot Street, Liverpool L7 8XP, United Kingdom. ⁸Department of General-, Visceral- and Pediatric Surgery, University Hospital Düsseldorf, Heinrich Heine University Düsseldorf, Germany. ^{*}These authors contributed equally to this work. [†]These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to I.E. (email: irene.esposito@med.uni-duesseldorf.de)

	N, 177	%
Sex		
Male	96	54.2%
Female	81	45.8%
Age median in years	68 (31–88)	
Tumor characteristics		
pT		
1	4	2.3%
2	11	6.2%
3	142	80.2%
4	20	11.3%
pN		
0	52	29.4%
1	125	70.6%
Grading		
1	13	7.3%
2	72	40.7%
3	92	52.0%
Resection margin		
0	90	50.8%
1	61	34.5%
2	2	1.1%
X	24	13.6%

Table 1. Clinicopathological features of 177 patients with resected pancreatic adenocarcinomas.

into subtypes with different clinical outcome and drug response¹¹. The stratification of these subtypes was associated with three patterns that were termed classical, quasi-mesenchymal and exocrine-like. The terminology of this subdivision, however, is hardly understandable regarding its morphological meaning. In other recent studies, it was reported that intact *KRAS* and the number of mutations in key genes may have prognostic value in PDAC patients^{12–16}. However, it is unclear so far, whether there are genotype-phenotype correlations that are based on the identification of PDACs with special growth patterns or morphological variants with better survival than classical PDACs, beyond the established pathological parameters of staging and grading¹⁷.

This study that only involved PDAC patients in whom surgical treatment could be performed, focuses on detailed histological investigation and molecular examination of the mutational status of *KRAS*, *CDKN2A/p16*, *TP53* and *SMAD4* in correlation with survival and accurate morphological subtyping. The presented findings show that, according to the analyzed parameters, prognostic relevant subtypes of PDAC can be identified.

Results

The patients' clinicopathologic features are summarized in Table 1. Female (45.8%) and male (54.2%) patients were equally represented with a median age at diagnosis of 68 years. Most patients presented with advanced stage of the disease (\geq UICC 2b: 73.4%, 130/177). A minority of patients (9.4%) received neoadjuvant treatment (details see Supplementary Table 1). All patients were judged resectable and underwent major pancreatic surgery: pylorus-preserving partial pancreaticoduodenectomy (ppWhipple) 55.4% (98/177), partial pancreaticoduodenectomy (Whipple, classic) 9% (16/177), distal pancreatectomy 18.6% (33/177) and total pancreatectomy 17% (30/177).

Histological features. The results are summarized in Table 2 and examples for each pattern are shown in Figs 1 and 2. The majority of the cases (92.1%, 163/177) were classified as either *conventional* PDACs (91/177, 51%), predominantly graded G2 (44%) or G3 (48%), or *combined* PDACs (72/177, 41%), predominantly graded G2 (37%) or G3 (61%). Two of the conventional PDACs contained at the periphery concomitant small (<1.5 cm) gastric type IPMNs and four had retention cysts. The *combined* PDACs showed as dominant histologic feature a conspicuous cribriform (17/177), clear-cell (16/177), papillary (17/177), gyriform (8/177), micropapillary (2/177) or complex (12/177) component (Fig. 1A–F). While the cribriform and clear cell combined PDACs were all G2 tumors, the gyriform, papillary, micropapillary and complex combined PDACs accounted for most (90%) of the G3 tumors. One PDAC with a clear cell component was associated with a pancreato-biliary type IPMN, and another PDAC with a complex component with a gastric type IPMN. A minority of tumors (7.9%, 14/177) fulfilled the criteria of PDAC *variants* and special pancreatic carcinomas. There were two G3-adenosquamous carcinomas (Fig. 1G), two G1-colloid carcinomas (Fig. 1H), six G2-papillary carcinomas (Fig. 1I), one G2-medullary carcinoma (not shown), and three G1-tubular carcinomas (Fig. 2). One of the colloid carcinomas was associated with an intestinal type IPMN. Two thirds of the papillary carcinomas (4/6) were associated with IPMNs, either of gastric (1/6), intestinal (1/6) or pancreato-biliary type (2/6). The three tubular adenocarcinomas were composed of well-differentiated open tubules that infiltrated the parenchyma diffusely and were accompanied by abundant

Tumor type	Frequency	%	Type of associated IPMN	Median survival (months)
Conventional ductal adenocarcinoma	91	51.4	2 gastric	22.7
Combined ductal adenocarcinoma				
with cribriform component	17	9.6		28.7
with papillary component	17	9.6		13.9
with clear-cell component	16	9.0	1 pancreato-biliary	17.6
with complex component	12	6.7	1 gastric	10.7
with gyriform component	8	4.5		12.5
with micropapillary component	2	1.1		16.1
Variants and special carcinomas				
Adenosquamous carcinoma*	2	1.1		4.1
Colloidal/mucinous carcinoma*	2	1.1	1 intestinal	>64.3**
Medullary carcinoma*	1	0.5		>75.1**
Tubular carcinoma	3	1.7		>55.3**
Papillary carcinoma	6	3.4	2 pancreato-biliary, 1 intestinal, 1 gastric	20.6
All tumors	177	100		

Table 2. Histological types of pancreatic ductal adenocarcinoma: frequency and survival. *according to WHO 2010. **more than 50% of patients in this group are still alive.

cellular desmoplastic stroma (Fig. 2). The tubules had oval, rounded or angular shapes and were lined by a single layer of mostly cuboidal cells, with little nuclear pleomorphism, inconspicuous nucleoli and scanty mitotic figures.

No morphological differences were observed between patients who received neoadjuvant therapy and those without neoadjuvant treatment (data not shown).

Molecular features. *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A/p16* and *SMAD4* mutations were found in various frequencies and combinations in all but one tumor (case # 62; confirmed by NGS). Most PDACs carried multiple mutations (two: 47/177, 25.6%; three: 85/177, 48%; four: 36/177, 20.3%), while tumors with one mutation (8/177, 4.5%) were rare.

KRAS was most frequently mutated (Table 3, Fig. 3), mainly in exon 2 (91%), and rarely in exon 3 (8.5%) and only once in both exons. No mutations were detected in exon 4. Almost all (98.8%, 162/164) *KRAS* mutations were detected by HRMA and Sanger sequencing (with expected detection limits of 10% and 15–20%, respectively (29)). Two low-level mutations (mutations with a low frequency in sequence reads) were identified by NGS (see also Fig. 3). All tumors with wildtype *KRAS* showed intact *BRAF* (codon 600).

TP53 wildtype and *TP53* mutations were associated with distinct p53 immunolabelling patterns depicted in Fig. 4. *TP53* Mutations were found in 139/177 tumors and detected in the known hotspots (exon 5–8), but not in exon 9. Mutation type 1 (defined as nuclear expression in $\geq 25\%$ of tumor cells and missense mutation) was more common (52%, 92/177) than mutation type 2 (26.6%, 47/177; defined as absence of expression and presence of an intragenic deletion, a nonsense, a frameshift or splice site mutation) (Fig. 4).

CDKN2A/p16 alterations, recorded in 75% of the tumors, were detected by loss of protein expression (130 tumors), which was confirmed by loss of heterozygosity (LOH) in 58 tumors. Three additional tumors showed intact expression despite presence of LOH. Loss of *SMAD4* expression was recorded in one third of the cases (Table 3, Fig. 5).

Interestingly, altered *CDKN2A/p16* was significantly more common in patients with positive lymph nodes ($p = 0.02$). No significant differences between lymph node negative and positive patients were observed for number of mutations, *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* and tumor morphology.

Four investigated metastases (3 from the liver and one from the peritoneum) had the same *KRAS* mutations as the primary. In case # 5 a low-level mutation in the primary tumor (p.G12D, 3%) was associated with a high-level mutation (p.G12D) in the liver metastasis. In case # 9 intact *TP53* in the primary tumor was associated with a strong (>90%) nuclear labeling in the peritoneal metastasis.

No differences were observed in the mutational status of patients who received neoadjuvant therapy compared to the large group of patients without neoadjuvant therapy (data not shown).

Correlation of molecular with morphologic features. *KRAS* wildtype was significantly more commonly detected in variants than classical PDACs (conventional or combined) ($p = 0.035$) (Table 4). In detail, the group of *KRAS* wildtype tumors (7.3%, 13/177) included *conventional* PDACs (7/13), *combined* PDACs (3/13), and one colloid, one medullary and one tubular carcinoma. The *KRAS* wildtype tubular carcinoma and one *KRAS*-mutated tubular carcinoma also lacked alterations in the three other genes (Table 5), a result that was confirmed by additional extended gene analysis. One of the two *KRAS*-mutated tubular carcinomas harbored *CDKN2A/p16* mutations (Table 5). All papillary carcinomas were associated with mutated *KRAS* and lacked mutated *GNAS*¹⁸, irrespective of the presence of an associated IPMN. *CDKN2A/p16* alterations were more strongly associated ($p = 0.016$) with *combined* PDACs (60/71) than with *conventional* PDACs (29/91) (Table 4).

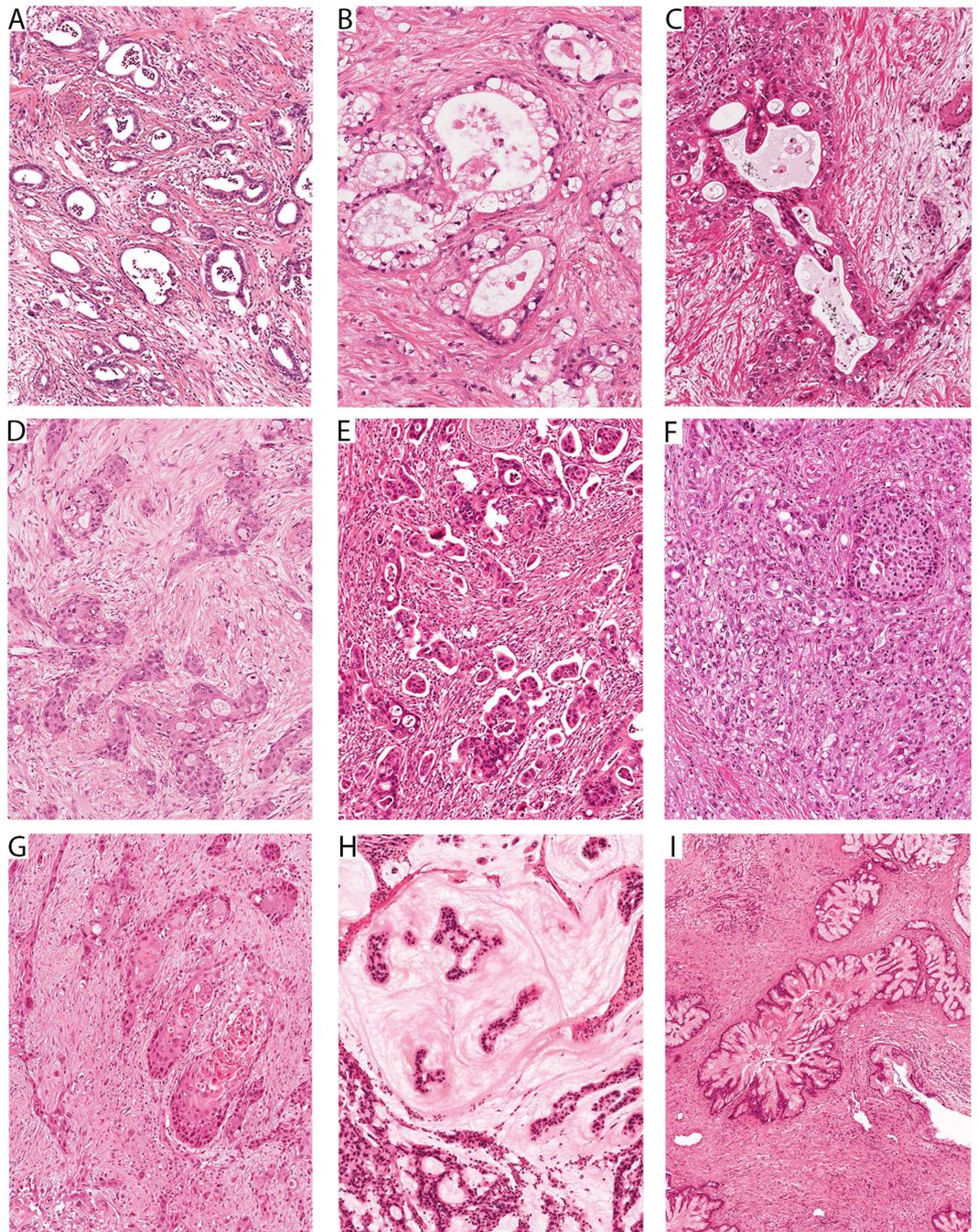


Figure 1. Spectrum of histologic patterns in pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs).

(A) Conventional PDAC. (B–F) Combined PDACs with a dominant histological component: (B) Clear-cell component. (C) Cribriform component. (D) Gyriform component. (E) Micropapillary component. (F) Complex component. (G) Adenosquamous carcinoma. (H) Colloid carcinoma. (I) Papillary carcinoma.

Clinical outcome correlated to morphologic and molecular features. At the time of survival analysis, 33 of 146 patients (22.6%) were alive. Median follow-up for all patients was 19.8 months (2.5–75.1 months) and median follow-up for patients alive was 49.4 months (25.9–75.1 months). Overall survival rates were 72% for one year, 29% for three years and 21% for five years.

Patients with colloid, medullary, tubular or papillary carcinoma survived significantly longer than patients with *conventional* and *combined* PDACs ($p = 0.04$) (Table 2). Longest survival was seen in two of the patients with a tubular carcinoma. They were still alive at the completion of the study, with a survival of >68.8 and >55.3 months, respectively. On the contrary, patients with adenosquamous carcinomas had an extremely poor outcome (4.1 and 10.0 months) (Table 2).

Detailed analysis of the large group of patients with conventional and combined PDACs revealed that patients with a conventional PDAC and those with a cribriform type *combined* PDAC showed the most favorable overall

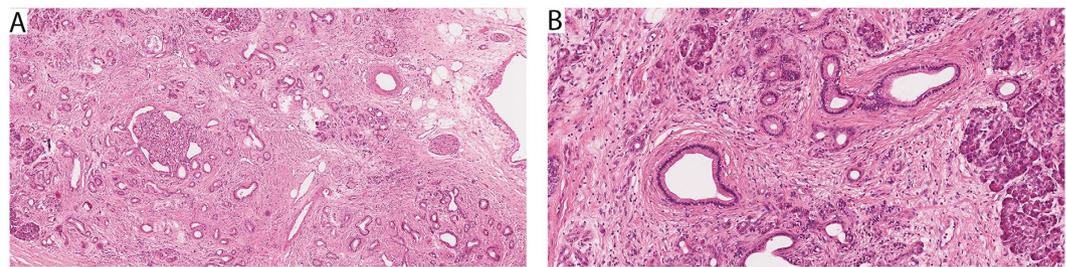


Figure 2. Tubular adenocarcinoma of the pancreas. (A) Low power view showing groups of well-differentiated infiltrating tubules surrounded by small cuffs of desmoplastic stroma. (B) Infiltrating well-differentiated neoplastic glands closely imitating normal ducts.

		N, 177	%
KRAS	Wildtype	13	7.3
	Mutated	164	93
TP53	Intact	38	21.5
	Altered	139	78.5
CDKN2A/p16	Intact	43	24
	Altered	133	75
	n.a.	1	0.6
SMAD4	Intact	112	63
	Altered	65	37

Table 3. Molecular characteristics of pancreatic adenocarcinomas.

median survival (22.7 and 28.7 months), followed by *combined* PDACs with clear-cell and papillary components (17.6 and 13.9 months) (Table 2). *Combined* PDACs with gyriform and complex components were associated with poor survival (12.5 and 10 months).

The median patient survival correlated significantly with the number of mutations ($p = 0.04$, Fig. 6A). Patients with no or low number of mutations (no mutation >68.6 ; one mutation >45 ; two mutations >25.3 months) survived longer than patients with tumors that harbored three (17.6 months) or four mutations (14.5 months).

Correlation of patient outcome and molecular features revealed a significant survival benefit in patients with wildtype KRAS (7.3%, 11/146) compared with that of KRAS mutated patients (92.7%, 135/146) ($p = 0.018$, median survival >45 vs. 19.7 months, Fig. 6B). Likewise, patients with intact CDKN2A/p16 (22.8%, 33/145) lived significantly longer than those with altered CDKN2A/p16 (77.2%, 112/145) ($p = 0.006$; 36.9 vs. 18.8 months, Fig. 6C). Significant prognostic results were further obtained by the combination of CDKN2A/p16 and KRAS. All patients from the cohort followed for survival with an intact status of both genes ($n = 4$) were still alive at the end of the study. A median overall survival could therefore not be calculated. No prognostic significance was observed for mutated TP53 (with no prognostic difference between TP53 type 1 and type 2 mutations) and SMAD4.

Univariate survival analysis using log-rank test showed significant p -values for KRAS, CDKN2A/p16, number of mutations, pN and grading. In a backward selected multivariate Cox proportional Hazard model altered KRAS (HR 2.77, 95%-CI: 1.11–6.90; $p = 0.019$), pN1 (HR 2.66; 95%-CI: 1.67–4.26; $p < 0.001$) and grading G3 (HR 3.66, 95%-CI: 1.57–8.54; $p = 0.001$) were independent predictive variables for survival.

Discussion

Reliable prognostic markers for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patients are so far rare. By analyzing the expression profile of primary PDACs, and human and mouse PDAC cell lines, Collisson recently identified molecular subtypes of PDAC that differed in clinical outcome and drug response¹¹. Other studies revealed an association between expression as well as mutational status of key tumor suppressor and oncogenes and patient survival^{16,19}. In all these studies, the molecular profile of PDACs is not or only vaguely correlated to the individual morphology of the tumors.

Here we present data of a correlative study on histopathology, molecular profile, and survival in PDACs and related carcinomas of 177 resected patients, with the aim to find prognostic relevant features. As expected, the overall outcome of our patient cohort was bad. Nearly two thirds of patients survived less than 24 months and the 5-year survival did not exceed 21%. However, within this cohort there were patients who survived for up to four years and longer, and whose tumors had a special histopathology and/or molecular status.

Histopathological heterogeneity in PDACs has long been recognized, but it has not been defined in detail, -with the exception of the definition of histological grade and histological variants. Here we classified the pancreatic carcinomas according to a defined growth pattern into three groups. The first group included the *conventional* type PDACs, which showed an equal mixture of various histological elements (for details see Material and Methods). The second group encompassed the *combined* PDACs, which were characterized by a dominant

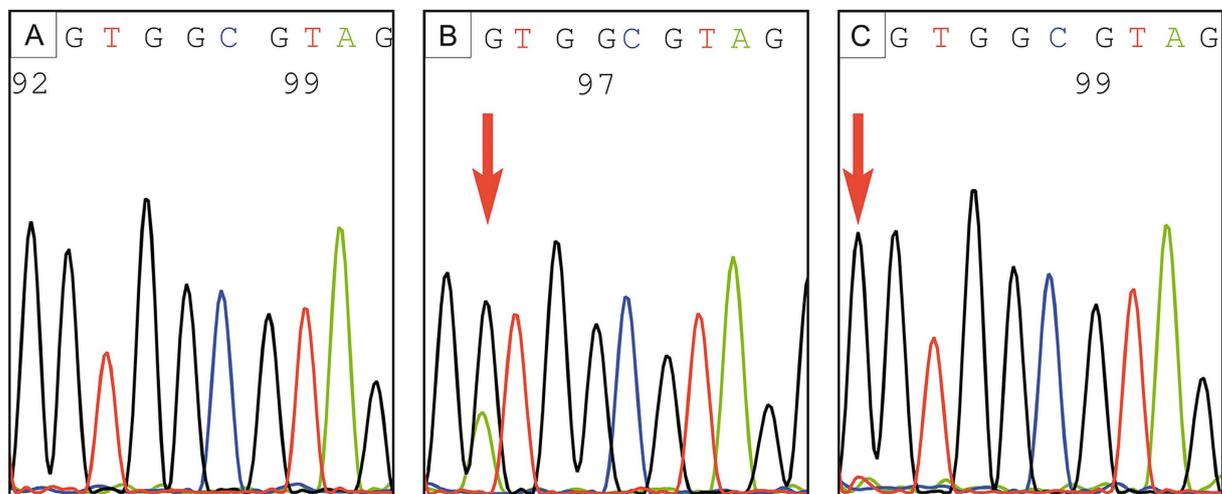


Figure 3. *KRAS* mutation analysis (direct sequencing) of codon 12 of exon 2. (A) Hotspot of exon 2 shows *KRAS* wildtype, (B) *KRAS* mutation (p.G12D, arrow), or (C) low-level mutation (p.G12C, arrow, faint red signal), as confirmed by next generation sequencing (NGS) (case #190).

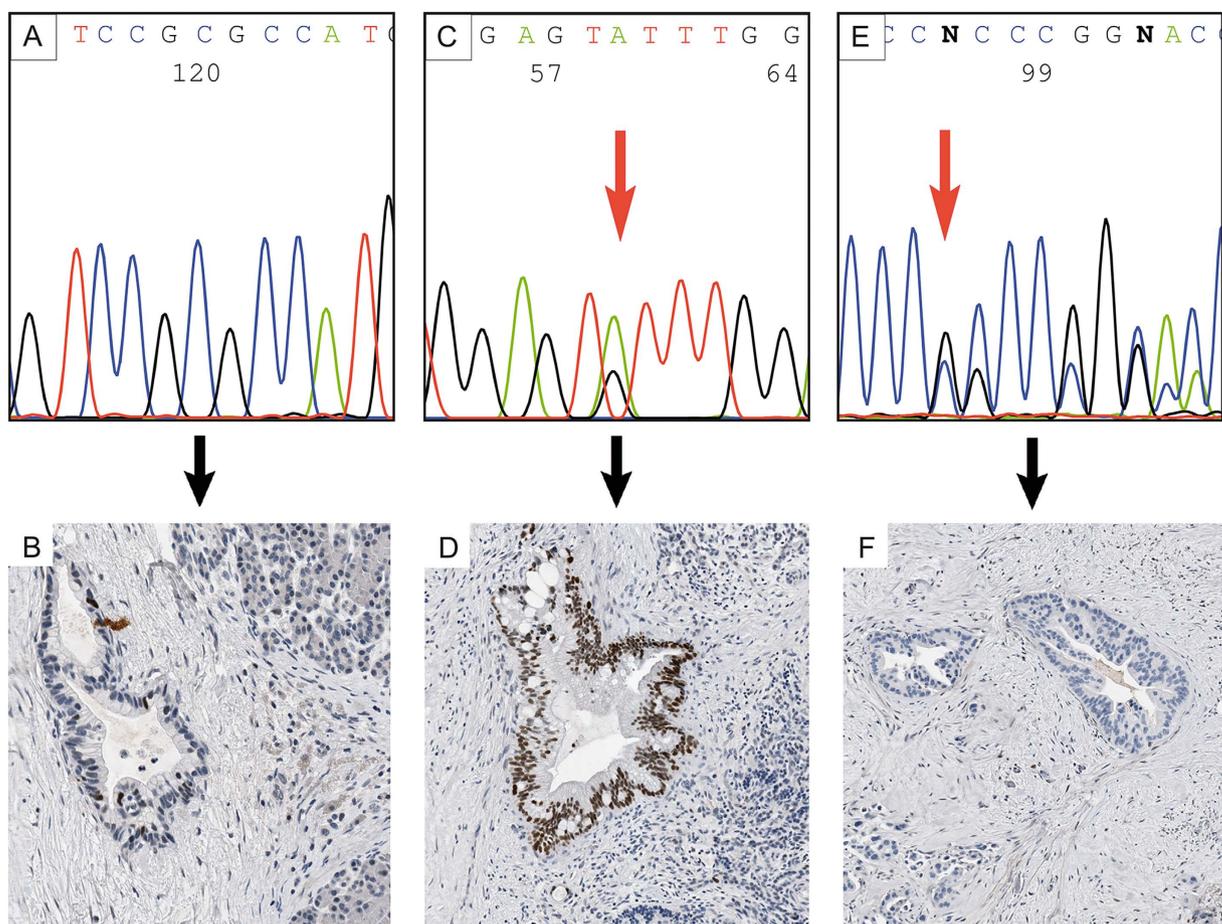


Figure 4. *TP53* analyses. (A,B) *TP53* wildtype is associated with nuclear *TP53* expression in up to 24% of neoplastic cells. (C,D) *TP53* missense mutation (p.Y205C; exon 6) is associated with nuclear *TP53* overexpression in $\geq 25\%$ of neoplastic cells (mutation type 1). (E,F) *TP53* intragenic deletion or nonsense, frameshift or splice site mutations (mutation type 2; here represented by an insertion-frameshift mutation p.P153*fs28; exon 5) is associated with loss of nuclear *TP53* expression in neoplastic cells.

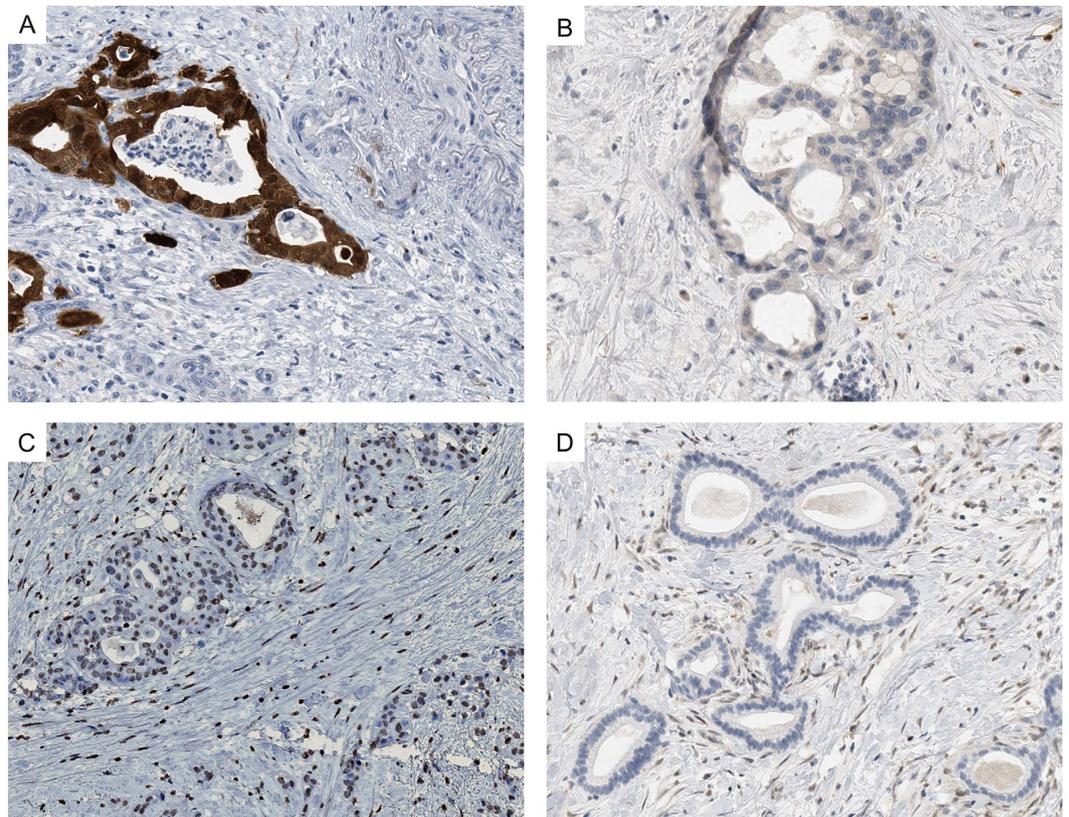


Figure 5. Immunohistochemical analysis of CDKN2A/p16 and SMAD4. (A) Strong nuclear and cytoplasmic staining of CDKN2A/p16 in neoplastic cells indicating the presence of an intact gene. (B) No labeling of CDKN2A/p16 in neoplastic cells indicating either a deletion, inactivating mutation, or promoter hypermethylation. (C) Nuclear SMAD4 immunolabeling of neoplastic cells indicating the presence of an intact protein. (D) Loss of SMAD4 expression in >90% of neoplastic cells indicating a deletion or inactivating mutation of the gene.

histological component (defined as involving more than 30% of the tumor area). The third group contained PDAC *variants* (i.e. adenosquamous carcinoma, colloid carcinoma, papillary carcinoma) and special adenocarcinomas such as medullary carcinoma and tubular carcinoma. By analyzing the survival of patients who were ascribed to the various morphological types, we found and confirmed that the colloid carcinoma, the medullary carcinoma and the tubular carcinoma showed a better outcome than conventional PDACs and particularly adenosquamous carcinoma^{20–23}. Patient with a *conventional* PDAC or a PDAC with dominant cribriform component survived longer than patients with *combined* PDAC and other histological components, such as the clear cell, the papillary, the gyriform and, in particular, the complex component.

PDACs typically harbor *KRAS* mutations, followed by mutations of *CDKN2A/p16*, *SMAD4* and *TP53*¹⁰. These genes are considered the driver genes of PDAC. In addition, there is a multitude of other, but much less frequent, gene alterations, as revealed by whole genome sequencing analysis^{6,7}. In our patients, in whom the molecular results were obtained by Sanger methodology and completed in selected cases by NGS of a large PDAC gene panel including the 40 most commonly mutated genes, *KRAS* was found to be mutated in 92.7%, *TP53* in 78.5%, *CDKN2A/p16* in 72.9% and *SMAD4* in 37.3%. Most of these alterations coexisted in individual tumors and two third of the PDAC patients (68%) harbored alterations in three or all four genes.

Correlation of the individual mutational status with the respective histopathology and survival data revealed a number of findings with prognostic significance. First, the number of mutations per tumor was of prognostic relevance. Patients with one, two or three mutations survived longer than those with alterations in all four genes (>45 vs. 25.3 vs. 17.6 vs. 14.5 months). Although these results confirm previous reports¹⁶, so far the correlation between gene status and phenotype has not been analysed in detail. Among the tumors with low number of mutations and prolonged survival, there are particularly colloid carcinomas, medullary carcinomas and tubular type carcinomas, while adenosquamous carcinomas, papillary carcinomas, and the *combined* PDAC with a complex pattern belong to the carcinomas with a high mutational frequency and poor survival (Fig. 7). Medullary and colloid carcinomas are known for their low prevalence of somatic mutations and good prognosis^{20–22,24}. Conversely, adenosquamous carcinoma is well known for its many somatic mutations and aggressive behavior^{25,26}. The papillary carcinoma variant seems in many cases to be the invasive component of an IPMN²⁷, since IPMNs either of the pancreato-biliary (2/6), intestinal (1/6) or gastric type (1/6) were found in four of our six cases. However, it may also occur without an associated IPMN, since in two cases an associated IPMN was not found, and this was also true in another recently reported series of 10 papillary cystic PDACs²⁸.

Morphological phenotype	Conventional ductal adenocarcinoma (without components) (A1)	Combined ductal adenocarcinoma (with additional components) (A2)	Variants (B)
N	91	72	14
KRAS			
Wildtype	7	3	3
Mutated	84	69	11
p-value A1 vs A2 ¹	0.35		
p-value A vs B ¹	0.035		
CDKN2A/p16			
Intact	29	11	3
Altered	62	60	11
p-value A1 vs A2 ¹	0.016		
p-value A vs B ¹	0.78		
TP53			
Intact	22	11	5
Altered	69	61	9
p-value A1 vs A2 ¹	0.16		
p-value A vs B ¹	0.17		
SMAD4			
Intact	57	45	10
Altered	34	27	4
p-value A1 vs A2 ¹	0.98		
p-value A vs B ¹	0.51		
Number of mutations			
0	0	0	1
1	5	1	2
2	30	14	3
3	40	40	5
4	16	17	3
p-value A1 vs A2 ¹	0.09		
p-value A vs B ¹	0.004		
Pathologic stage			
Primary tumour			
T1	2	2	0
T2	3	8	0
T3	74	55	14
T4	12	7	0
p-value A1 vs A2 ¹	0.23		
p-value A vs B ¹	0.55		
Nodal status			
N0	24	22	7
N1	67	50	7
p-value A1 vs A2 ¹	0.60		
p-value A vs B ¹	0.12		
Grading			
G1	7	1	5
G2	4	27	6
G3	44	44	3
p-value A1 vs A2 ¹	0.08		
p-value A vs B ¹	<0.001		
Survival			
(months)	22.7	15.5	34.1
p-value A1 vs A2 ²	0.07		
p-value A vs B ²	0.06		

Table 4. Comparison between morphological phenotype, genotype, grading and survival. ¹Chi²-test/
Fisher's exact test, ²Log-rank-test.

ID	Sex	Age	Survival (months)	Site/Size (cm)	Grading	pT	pN	cM	KRAS	TP53	CDKN2A/p16	SMAD4
# 44	F	82.6	19.3	head/4.2	G1	T3	N1	M0	mut (p.G12V)	intact	altered	intact
# 62	M	74.9	>68.6, still alive	head/3.8	G1	T3	N0	M0	wt	intact	intact	intact
# 190	M	50.0	>55.3, still alive	head/3.5	G1	T3	N1	M0	mut (p.G12C low-level mutation, 6%)	intact	intact	intact

Table 5. Clinicopathologic and molecular features of pancreatic tubular adenocarcinoma.

Second, patients with either wild type *KRAS* or *CDKN2A/p16* had a better outcome than those with mutations in these genes, while loss of *SMAD4* and intact or altered *TP53* was of no prognostic relevance. The statistical significance of wildtype *KRAS* proved to be so strong that multivariate analysis identified the mutational status of *KRAS* as an independent prognostic marker. This result confirmed the recently reported survival benefit for PDAC patients with intact *KRAS*^{12–15}. The largest of these studies by Sinn, included 153 PDAC patients and reported a significantly decreased median survival of 12.7 months for patients with mutated *KRAS* versus 20.7 months for patients with wild type *KRAS*¹⁵. In our study, the corresponding data were 19.7 months for mutated *KRAS* versus >45 months with wild type *KRAS*. The longer survival in our patients may be due to a better selection on the basis of a more extensive *KRAS* analysis including exon 2 to 4, in contrast to Sinn's study that only focused on *KRAS* exon 2. This methodological difference probably also explains, why in Sinn's study the *KRAS* mutation rate of 68% is much lower than in our study with a rate of 93%.

Among the tumors with a wildtype *KRAS* status were a medullary carcinoma, whose particular genetic and biologic features have been described^{20–23}, and a tubular adenocarcinoma. This latter type of carcinoma, which corresponds by grade to a G1 tumor (WHO 2010), may be considered a conventional PDAC with a strictly well differentiated tubular differentiation. It shows great similarities regarding its morphology, low frequency, rare mutations and long survival to the tubular type carcinoma of the breast^{29–32}. One of the three tubular adenocarcinomas that we identified, not only had an intact *KRAS* gene, but also harbored no alterations in the 40 most commonly altered PDAC genes, including *CDKN2A/p16*, *TP53* and *SMAD4*. Moreover, the patient with this tumor is still alive (see Table 4, case # 62), with a follow-up for >68.6 months. The other two patients with tubular carcinomas had *KRAS* and/or *CDKN2A/p16* alterations, but no loss of *SMAD4* or *TP53* mutations (details see Table 4), and survived for >55.3 and 19.3 months.

The relevance of mutated *KRAS* as a prognosticator in PDAC, a feature shared with bile duct cancer³³, is biologically most likely related to its driver function. Evidence that *KRAS*, in interaction with *TP53*, *CDKN2A/p16* and *SMAD4*, is a driver gene comes from genetically engineered *KRAS* mouse models of pancreatic cancer^{10,34–41}. Moreover, recently developed mouse models in which mutated *KRAS* can be switched on and off, have impressively demonstrated that continuous oncogenic *KRAS* signaling is essential for both progression and maintenance of PDAC^{42,43} and its metastases⁴⁴.

Patients with wildtype *CDKN2A/p16*, like patients with intact *KRAS*, lived significantly longer than those with altered genes ($p = 0.006$; 36.9 months vs. 18.8 months). Though multivariate analysis failed to identify this gene constellation as an independent prognostic factor, *CDKN2A/p16* seems to play a role in patient outcome. All our patients without alterations in *CDKN2A/p16* and *KRAS* were still alive at the completion of the study. On the other hand, loss of *CDKN2A/p16*, as was recently reported, seems to be associated with lymphatic invasion and widespread metastasis¹⁹ and was significantly associated with lymphatic spread in our study. Interestingly, subgroup analysis revealed a significant higher *CDKN2A/p16* mutation rate in *combined* PDACs with a dominant histological component compared to *conventional* PDACs. This suggests that a driver gene might be linked to the presence of dominant histological components in PDACs.

The prognostic relevance of *SMAD4* has been the subject of controversial discussions over the last years. While several studies associated the loss of *SMAD4* with poor prognosis or early metastatic disease^{14,19,45,46}, others were unable to confirm these results^{16,47,48}. Likewise, no differences in the survival data in patients with intact and loss of *SMAD4* were observed in our study ($p = 0.15$, median overall survival 22.2 vs. 17.6 months).

In summary, our findings specify the prognostic relationship between the histopathology and molecular profile, based on the morphologic stratification of PDACs in subtypes and variants, and the mutational status of the four driver genes, *KRAS*, *CDKN2A/p16*, *SMAD4* and *TP53*. Because our data suggest that PDAC subgroups can be identified (low to intermediate aggressive PDACs versus highly aggressive PDACs, see Fig. 7), tailored therapy options may be discussed. Patients with altered *CDKN2A/p16* might benefit from more aggressive preoperative therapies, whereas patients with wildtype *KRAS* might best be treated by upfront surgery followed by adjuvant therapies. In view of these potential therapies it should be considered to include the status of the four driver genes into the pathological reporting of PDACs in the future^{12–15,49}. Given the potential clinical implications of our results, validation in independent PDAC cohorts is of utmost importance.

Material and Methods

The study was approved by the ethics committee of the TU München, Germany (documents no. 1926/2007 and 126/2016S). Written informed consent was obtained from all patients. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

Patients. From 07/2007 to 07/2011 200 patients underwent an elective pancreatic resection at the Department of Surgery, Klinikum rechts der Isar, TU München, Germany, with a final histopathologic diagnosis of PDAC.

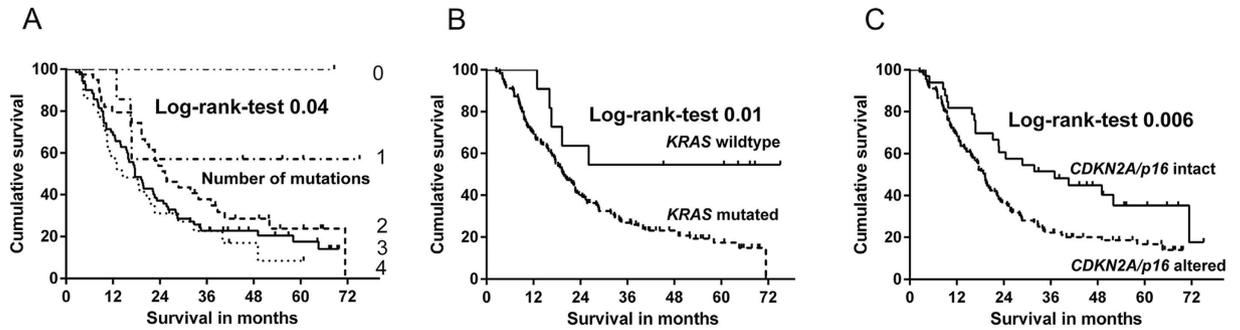


Figure 6. Kaplan-Meier survival curves in pancreatic adenocarcinomas correlated with molecular status. (A) Significant correlation of median patient survival with number of mutations. (B) Patients with *KRAS* wildtype have a significantly better overall survival than patients with mutated *KRAS*. (C) Patients with intact *CDKN2A/p16* have a significantly better overall survival than patients with altered *CDKN2A/p16*.

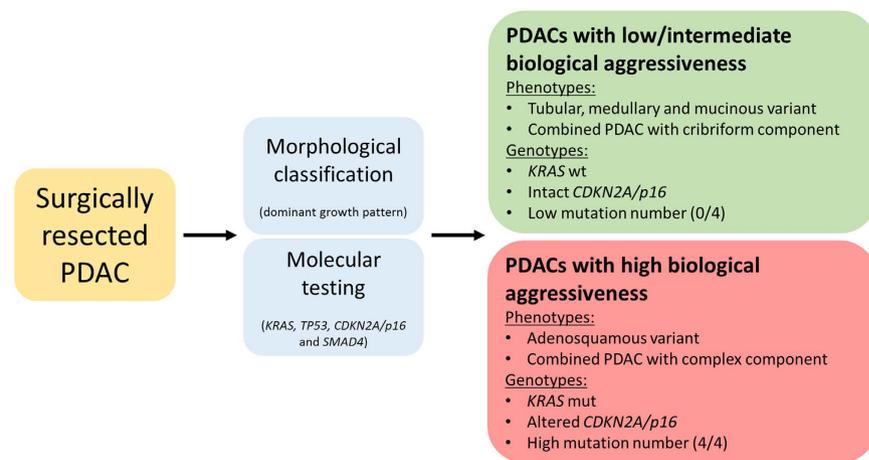


Figure 7. Risk stratification after surgical resection of PDAC. Proposed scheme to identify PDACs with low/intermediate and high biological aggressiveness based on morphological classification and molecular testing of key genes.

Associated and concomitant intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN)⁵⁰ were reported. IPMNs with only minimally invasive component were excluded. TNM and grading followed the WHO recommendations¹⁷. Patients with a family history of PDAC were excluded from the study.

Clinical data and follow up. Clinical, demographic and macroscopic information was obtained from a patient database and by reviewing the medical charts and pathology reports. Follow up on the patients' conditions was obtained by clinical record, directly contacting the patients and/or their physicians. Patients with neoadjuvant therapy (n = 14, details see Supplementary Table 1), distant metastasis/UICC stage IV disease (n = 11, thereof six liver metastases, four peritoneal metastases and one pulmonary metastasis, details see Supplementary Table 2) and/or arterial resection (n = 4), perioperative death/death due to complications (n = 1) and recurrence surgery (n = 1) were excluded from survival analysis. Three patients were lost to follow-up.

Histologic analysis. All PDACs were histologically classified into *conventional* PDACs, *combined* PDACs in which, in addition to the classical tubular growth pattern, a special histologic component was present in more than 30% of the tumor area, and *variants* with a special pattern in at least 50% of the tumor area. PDACs with a conventional morphology were largely composed of well- to moderately developed tubular and duct-like structures and showed only few other structures, such as glands with clear cell morphology, cribriform architecture, papillary epithelial lining and individual pleomorphic cells¹⁷. Combined PDACs with dominant histological features showed either a clear-cell, cribriform, gyriform, papillary, micropapillary or complex component against a background of tubular architecture (see Fig. 1). The complex component was characterized by small irregular glands mixed with solid or cribriform cell sheets and individual pleomorphic cells. PDAC variants included colloid, adenosquamous, and papillary carcinoma (see Fig. 1A–F). Among the pancreatic carcinomas that have not yet been regarded as PDAC variants are medullary and tubular carcinoma. The tubular adenocarcinoma is separated from conventional PDAC by its entirely well differentiated tubular architecture that is characterized

by small tubular glands diffusely infiltrating the pancreatic parenchyma and difficult to distinguish from equally sized normal ducts (see Fig. 2).

Immunohistochemical analysis. All stainings were run on an automated immunostainer with an iVIEW DAB detection kit (Ventana Medical Systems, Roche, Mannheim, Germany) according to the company's protocols for open procedures with slight modifications, for details see Supplementary materials and methods.

Molecular analysis. Molecular analysis was performed on extracted DNA from manually microdissected FFPE tumor tissue, for details see Supplementary materials and methods and Supplementary Table 1.

Statistical analyses. The statistical analyses performed are described in Supplementary materials and methods.

References

- Spath, C. *et al.* Strategies to improve the outcome in locally advanced pancreatic cancer. *Minerva Chir* **70**, 97–106 (2015).
- Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* **65**, 5–29, doi: 10.3322/caac.21254 (2015).
- Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M. & Kloppel, G. Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: facts, challenges and future developments. *World J Gastroenterol* **20**, 13833–13841, doi: 10.3748/wjg.v20.i38.13833 (2014).
- Esposito, I., Segler, A., Steiger, K. & Kloppel, G. Pathology, genetics and precursors of human and experimental pancreatic neoplasms: An update. *Pancreatol*, doi: 10.1016/j.pan.2015.08.007 (2015).
- Wood, L. D. & Hruban, R. H. Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. *Cancer J* **18**, 492–501, doi: 10.1097/PPO.0b013e31827459b6 (2012).
- Witkiewicz, A. K. *et al.* Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun* **6**, 6744, doi: 10.1038/ncomms7744 (2015).
- Waddell, N. *et al.* Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* **518**, 495–501, doi: 10.1038/nature14169 (2015).
- Rozenblum, E. *et al.* Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* **57**, 1731–1734 (1997).
- Venter, J. C. *et al.* The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304–1351, doi: 10.1126/science.1058040 (2001).
- Jones, S. *et al.* Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**, 1801–1806, doi: 10.1126/science.1164368 (2008).
- Collisson, E. A. *et al.* Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* **17**, 500–503, doi: 10.1038/nm.2344 (2011).
- Lee, J. *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* **109**, 1561–1569, doi: 10.1002/cncr.22559 (2007).
- Ogura, T. *et al.* Prognostic value of K-ras mutation status and subtypes in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens from patients with unresectable pancreatic cancer. *J Gastroenterol* **48**, 640–646, doi: 10.1007/s00535-012-0664-2 (2013).
- Shin, S. H. *et al.* Genetic alterations of K-ras, p53, c-erbB-2, and DPC4 in pancreatic ductal adenocarcinoma and their correlation with patient survival. *Pancreas* **42**, 216–222, doi: 10.1097/MPA.0b013e31825b6ab0 (2013).
- Sinn, B. V. *et al.* KRAS mutations in codon 12 or 13 are associated with worse prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* **43**, 578–583, doi: 10.1097/MPA.0000000000000077 (2014).
- Yachida, S. *et al.* Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clin Cancer Res* **18**, 6339–6347, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1215 (2012).
- Hruban, R. H. *et al.* In *WHO Classification of Tumors of the Digestive System* (eds F.T. Bosman, F. Carneiro, R.H. Hruban & N.D. Theise) 292–299 (IARC, 2010).
- Dal Molin, M. *et al.* Clinicopathological correlates of activating GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas. *Ann Surg Oncol* **20**, 3802–3808, doi: 10.1245/s10434-013-3096-1 (2013).
- Oshima, M. *et al.* Immunohistochemically detected expression of 3 major genes (CDKN2A/p16, TP53, and SMAD4/DPC4) strongly predicts survival in patients with resectable pancreatic cancer. *Ann Surg* **258**, 336–346, doi: 10.1097/SLA.0b013e3182827a65 (2013).
- Calhoun, E. S. *et al.* BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) mutations in distinct subsets of pancreatic cancer: potential therapeutic targets. *Am J Pathol* **163**, 1255–1260, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63485-2 (2003).
- Goggins, M. *et al.* Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. *Am J Pathol* **152**, 1501–1507 (1998).
- Wilentz, R. E. *et al.* Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity. *Am J Pathol* **156**, 1641–1651, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65035-3 (2000).
- Wu, J. *et al.* Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 21188–21193, doi: 10.1073/pnas.1118046108 (2011).
- Adsay, N. V. *et al.* Colloid (mucinous noncystic) carcinoma of the pancreas. *Am J Surg Pathol* **25**, 26–42 (2001).
- Borzanci, E. *et al.* Adenosquamous carcinoma of the pancreas: Molecular characterization of 23 patients along with a literature review. *World J Gastrointest Oncol* **7**, 132–140, doi: 10.4251/wjgo.v7.i9.132 (2015).
- Trikudanathan, G. & Dasanu, C. A. Adenosquamous carcinoma of the pancreas: a distinct clinicopathologic entity. *South Med J* **103**, 903–910, doi: 10.1097/SMJ.0b013e3181ebadbd (2010).
- Kloppel, G., Basturk, O., Schlitter, A. M., Konukiewitz, B. & Esposito, I. Intraductal neoplasms of the pancreas. *Semin Diagn Pathol* **31**, 452–466, doi: 10.1053/j.semdp.2014.08.005 (2014).
- Kelly, P. J. *et al.* Cystic papillary pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma: a heretofore undescribed morphologic pattern that mimics intraductal papillary mucinous carcinoma. *Am J Surg Pathol* **36**, 696–701, doi: 10.1097/PAS.0b013e318249ce1c (2012).
- Rakha, E. A., Pinder, S. E., Shi, S. J. & Tsuda, H. In *WHO Classification of Tumours of the Breast* Vol. 4 (eds S.R. Lankhani *et al.*) (IARC, 2012).
- Rakha, E. A. *et al.* Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis. *J Clin Oncol* **28**, 99–104, doi: 10.1200/JCO.2009.23.5051 (2010).
- Riener, M. O. *et al.* Microarray comparative genomic hybridization analysis of tubular breast carcinoma shows recurrent loss of the CDH13 locus on 16q. *Hum Pathol* **39**, 1621–1629, doi: 10.1016/j.humphath.2008.02.021 (2008).
- Diab, S. G. *et al.* Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. *J Clin Oncol* **17**, 1442–1448 (1999).
- Churi, C. R. *et al.* Mutation profiling in cholangiocarcinoma: prognostic and therapeutic implications. *PLoS One* **9**, e115383, doi: 10.1371/journal.pone.0115383 (2014).
- Biankin, A. V. *et al.* Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* **491**, 399–405, doi: 10.1038/nature11547 (2012).

35. Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638–642, doi: 10.1038/nature05327 (2006).
36. Guerra, C. *et al.* Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* **11**, 291–302, doi: 10.1016/j.ccr.2007.01.012 (2007).
37. Hingorani, S. R. *et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437–450 (2003).
38. Mazur, P. K. & Siveke, J. T. Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology. *Gut* **61**, 1488–1500, doi: 10.1136/gutjnl-2011-300756 (2012).
39. Morris, J. P. t., Wang, S. C. & Hebrok, M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* **10**, 683–695, doi: 10.1038/nrc2899 (2010).
40. Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E. & Bar-Sagi, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* **11**, 761–774, doi: 10.1038/nrc3106 (2011).
41. Seidler, B. *et al.* A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knockdown *in vivo* by using avian retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 10137–10142, doi: 10.1073/pnas.0800487105 (2008).
42. Collins, M. A. *et al.* Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J Clin Invest* **122**, 639–653, doi: 10.1172/JCI59227 (2012).
43. Ying, H. *et al.* Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* **149**, 656–670, doi: 10.1016/j.cell.2012.01.058 (2012).
44. Collins, M. A. *et al.* Metastatic pancreatic cancer is dependent on oncogenic Kras in mice. *PLoS One* **7**, e49707, doi: 10.1371/journal.pone.0049707 (2012).
45. Boone, B. A. *et al.* Loss of SMAD4 staining in pre-operative cell blocks is associated with distant metastases following pancreaticoduodenectomy with venous resection for pancreatic cancer. *J Surg Oncol* **110**, 171–175, doi: 10.1002/jso.23606 (2014).
46. Singh, P., Srinivasan, R. & Wig, J. D. SMAD4 genetic alterations predict a worse prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* **41**, 541–546, doi: 10.1097/MPA.0b013e318247d6af (2012).
47. Biankin, A. V. *et al.* DPC4/Smad4 expression and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* **20**, 4531–4542 (2002).
48. Winter, J. M. *et al.* Failure patterns in resected pancreas adenocarcinoma: lack of predicted benefit to SMAD4 expression. *Ann Surg* **258**, 331–335, doi: 10.1097/SLA.0b013e31827fe9ce (2013).
49. Singh, A. *et al.* A gene expression signature associated with “K-Ras addiction” reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* **15**, 489–500, doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.022 (2009).
50. Basturk, O. *et al.* A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol* **39**, 1730–1741, doi: 10.1097/PAS.0000000000000533 (2015).

Acknowledgements

This work was partly supported by a grant from Novartis Pharma GmbH, Nurnberg (to A.M.S., G.K. and I.E.). We are grateful to Professor Gisela Keller for advice and helpful discussion, to Petra Meyer, Daniela Angermeier and Birgit Geist for excellent technical assistance and Henrike Jahns for her contribution in figure preparation.

Author Contributions

A.S., N.P., V.E., I.R. and M.B. carried out experiments and analyzed data. C.J., B.K., BO.K. and K.S. collected and analyzed data. A.M.S., G.K. and I.E. designed the study, conceived out experiments and analyzed data. C.W.M. and J.K. designed the study. A.M.S., A.S. and G.K. wrote the manuscript. All authors had final approval of the submitted version.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Schlitter, A. M. *et al.* Molecular, morphological and survival analysis of 177 resected pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs): Identification of prognostic subtypes. *Sci. Rep.* **7**, 41064; doi: 10.1038/srep41064 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

