

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

**Institut für Tumorbiologie**

**Prof. Dr. med. K. Pantel**

## **Identifikation von exosomalen microRNAs im Serum von Pankreaskarzinom-Patienten im Vergleich zu Patienten mit chronischer Pankreatitis und Gesunden**

### **Promotion**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:  
Silke Klapdor  
aus Hamburg

Hamburg 2020

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg  
am: 18.02.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD Dr. Heidi Schwarzenbach**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Johannes Herkel**

# Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Pankreas	1
1.2 Pankreaskarzinom	2
1.2.2 Epidemiologie	2
1.2.4 Pathologie	3
1.2.5 Karzinogenese	4
1.2.6 Klassifikation	4
1.2.7 Klinik	6
1.2.8 Diagnostik	6
1.2.9 Metastasierung	7
1.2.10 Therapie	7
1.2.10.1 Operation	7
1.2.10.2 Chemotherapie	8
1.2.11 Prognose	9
1.3 Exosomen	10
1.3.1 Biogenese der Exosomen	11
1.3.2 Funktion von Exosomen	12
1.3.3 Exosomen und Tumorerkrankungen	12
1.4 MiRNAs	12
1.4.1 miRNA Biosynthese und Funktion	14
1.4.2 Mechanismus der Befreiung der miRNA in die Blutzirkulation	14
1.4.3 miRNAs bei Tumorerkrankungen	15
2. Ziele der Arbeit	16
3. Material und Methoden	17
3.1 Materialien	17
3.1.1 Kits	17
3.1.2 Chemikalien und Lösungen	17
3.1.3 Puffer	17
3.1.4 Geräte	18
3.1.5 Liste der miRNAs	18
3.2 Methoden	19
3.2.1 Studienpopulation	19
3.2.2 Überprüfung von Hämolyse der Serumproben	19

3.2.3 Isolation der Exosomen aus den Serumproben	20
3.2.4 Extraktion der miRNAs	20
3.2.5 Konversion in cDNA und Präamplifikation	21
3.2.6 miRNA Expression	22
3.2.7 Normalisierung der Daten und statistische Analyse	22
4. Ergebnisse	23
4.1 Studienpopulation	23
4.2 Hämolysen	26
4.2 Vorkommen von miRNAs in Exosomen bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu Patienten mit chronischer Pankreatitis und Gesunden	26
4.3 Korrelation der exosomalen Niveaus der miRNAs mit den CA 19-9 Werten	30
4.4 Vergleich der exosomalen Niveaus der miRNAs unter Berücksichtigung des Tumorsprechens	31
4.5 Veränderung der miRNA Expression bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Verlauf der Chemotherapie	33
4.6 Vergleich der miRNA Expression zwischen den Subgruppen innerhalb der Patienten mit Pankreaskarzinom	35
5. Diskussion	36
6. Zusammenfassung	41
7. Abkürzungsverzeichnis	43
8. Referenzen	44
9. Anhang	53
9.1 Abbildungsverzeichnis	53
9.2 Tabellenverzeichnis	54
10. Danksagung	55
11. Lebenslauf	56
12. Eidesstattliche Versicherung	577

# 1. Einleitung

Das Pankreaskarzinom gehört aufgrund seiner recht späten Diagnosestellung, des invasiven Wachstums und hohen Metastasierungspotentials, sowie den begrenzten Therapiemöglichkeiten zu den Krebserkrankungen mit einer sehr schlechten Prognose (Ilic M und Ilic I, 2016). Daher ist die Identifikation von Biomarkern, welche einen Zusammenhang haben mit der Entwicklung, dem Progress oder auch mit der Bildung von Metastasen beim Pankreaskarzinom, Teil der aktuellen Forschung. Nach neuesten Studien könnten eventuell bestimmte miRNAs als solche Biomarker genutzt werden (Daoud et. al., 2019, Rawat et. al., 2019, Park et. al, 2009)

MiRNAs sind kleine, nicht-kodierende RNA Moleküle, welche sowohl in Exosomen als auch zellfrei im Blut zirkulieren und eine Rolle bei der Regulation der Translation der mRNA im Protein spielen (Kloosterman und Plasterk, 2006). Bei Tumorpatienten ist ihre Expression häufig dereguliert (Gironella et. al., 2007, Hu et. al., 2012).

## 1.1 Pankreas

Die Anatomie des Pankreas ist in Abbildung 1 dargestellt. Das Pankreas ist ein längliches, quer im Oberbauch retroperitoneal liegendes Organ in enger topographischer Nähe zu den großen Oberbauchgefäßen sowie sämtlichen Oberbauchorganen. Es wird unterteilt in Kopf (Caput), Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda). Der Kopf legt sich anatomisch eng in die C-Kurve des Duodenums, während der Schwanz des Pankreas fast bis an die Milz heranreicht (Schünke (Hrsg), 2014). Das Pankreas erfüllt zwei wichtige Funktionen. Der exokrine Anteil des Drüsengewebes produziert in den Azinuszellen Verdauungsenzyme (Amylasen, Lipasen, Proteasen), welche über den Ductus pancreaticus, einem Ausführungsgang, in den Darm gelangen und dort die Verdauung regulieren (Silbernagel (Hrsg.), 2005). Der endokrine Anteil des Pankreas, welcher nur etwa 2 % der Organmasse ausmacht (Schünke (Hrsg.), 2014), produziert die Hormone Insulin und Glucagon, welche direkt in das Blut abgegeben werden und an der Regulation des Blutzuckerspiegels beteiligt sind (Silbernagel (Hrsg.), 2005).

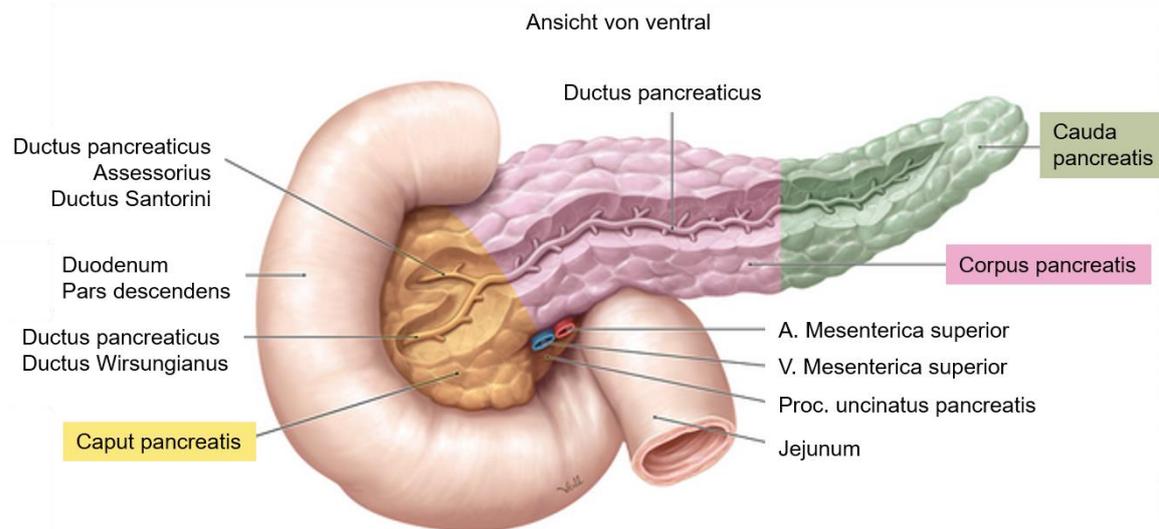


Abbildung 1: **Anatomie des Pankreas** (nach Schünke et. al., 2014)

## 1.2 Pankreaskarzinom

### 1.2.2 Epidemiologie

Wie in Abbildung 2 dargestellt, erkrankten im Jahr 2018 weltweit mehr als 458000 Menschen neu am Pankreaskarzinom und mehr als 430000 Menschen starben an dieser Erkrankung (WHO, 2018). Dies weist auf eine sehr hohe Sterblichkeitsrate und schlechte Prognose hinweist. Das Gesamtüberleben liegt zwischen zwei und neun Prozent (Ilic et. al., 2016, Robert-Koch-Institut (Hrsg.), 2016). In Deutschland erhalten etwa 17000 Menschen pro Jahr die Diagnose, an einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC), dem häufigsten Typ des Pankreaskarzinoms, erkrankt zu sein. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 72 Jahren für Männer und bei 75 Jahren für Frauen (Robert-Koch-Institut (Hrsg.), 2016).

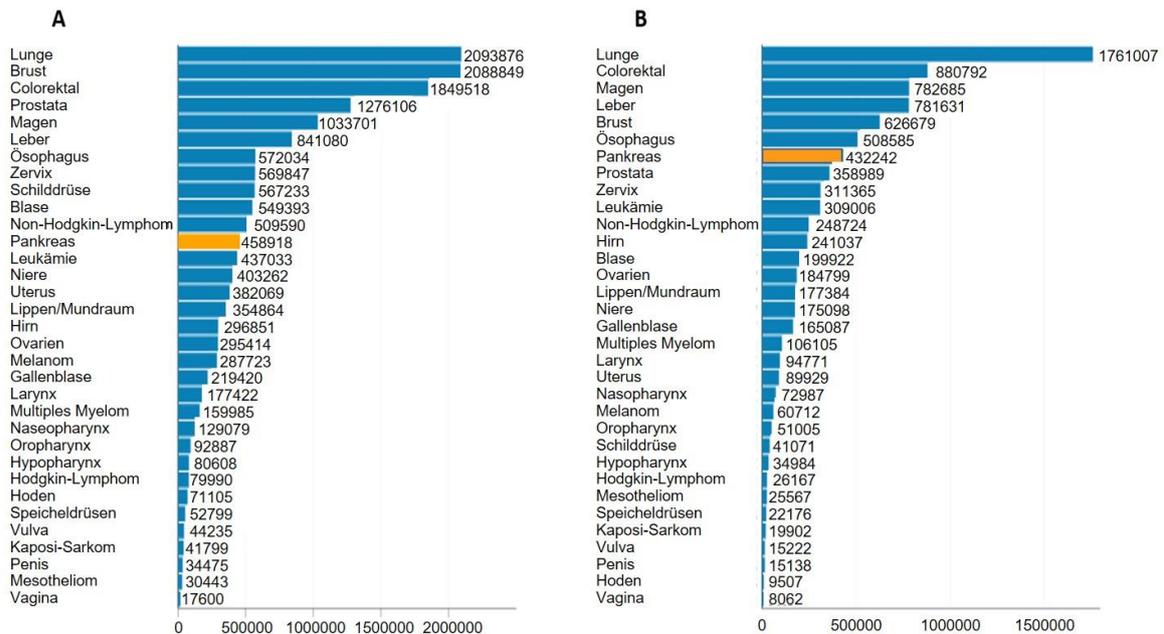


Abbildung 2: **Anzahl der Krebs-Neuerkrankungen weltweit (A), sowie Anzahl der Krebs-Todesfälle weltweit (B)** im Jahr 2018 für beide Geschlechter und alle Altersgruppen. Anzahl der Neuerkrankungen und Todesfälle für das Pankreaskarzinom sind orange markiert (modifiziert nach WHO, 2018)

Zu den Risikofaktoren an einem Pankreaskarzinom zu erkranken gehören Rauchen, Adipositas, erhöhter Alkoholkonsum und auch die chronische Pankreatitis (Lowenfels et. al., 2006). Die meisten Pankreaskarzinome treten sporadisch auf, aber es gibt auch hereditäre Risikofaktoren. Tritt ein PDAC bei Patienten auf, bei denen mindestens zwei weitere Verwandte ersten Grades an einem Pankreaskarzinom erkrankt sind, wird auch von einem familiären Pankreaskarzinom gesprochen (Olson et. al., 2013)

## 1.2.4 Pathologie

Neoplasien entstehen zu 95 % aus der Entartung des exokrinen Teils der Bauchspeicheldrüse, einschließlich der Tumore, welche aus den dukталen Zellen oder Azinuszellen entstehen, sowie deren Stammzellen (Robert-Koch-Institut (Hrsg), 2016). Etwa 5 % der Tumore gehen von den Inselzellen der Bauchspeicheldrüse aus und werden als endokrine Pankreastumore bezeichnet (Klimstra et. al., 2007).

Pankreastumore werden in benigne, prä-maligne mit malignem Potential und maligne Läsionen eingeteilt. Das PDAC und seine Subtypen machen mit 85-90 % den höchsten Anteil der malignen Pankreastumore aus, gefolgt von der intraduktalen papillären mucinösen Neoplasie (IPMN) und der mucinösen zystischen Neoplasie (MCN) jeweils mit assoziiertem invasivem Karzinom (Bosmann et. al., 2010).

### 1.2.5 Karzinogenese

Die Entstehung des Pankreaskarzinoms ist hier am Beispiel des PDAC dargestellt. Es handelt sich hierbei um einen mehrstufigen Prozess, welcher unter anderem auch auf die Mutationen verschiedener Gene zurückzuführen ist (Daoud et. al., 2019). Typische Mutationen beim Pankreaskarzinom betreffen beispielsweise die Tumorsuppressorgene p53 (Bailey et. al., 2016, Zarkavelis et. al., 2019), sowie die CDKN2A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A) (Zarkavelis et. al., 2019). Ein häufig mutiertes Onkogen ist das K-RAS (Kirsten rat sarkoma) (di Magliano et. al., 2013). Diese Genmutationen führen über Veränderungen der duktaalen Zellen zu so genannten präneoplastischen Läsionen, den PanIn (pankreatische intraepitheliale Neoplasie), welche sich schrittweise weiter zum invasiven Karzinom entwickeln können (Abbildung 3) (Daoud et. al., 2019)

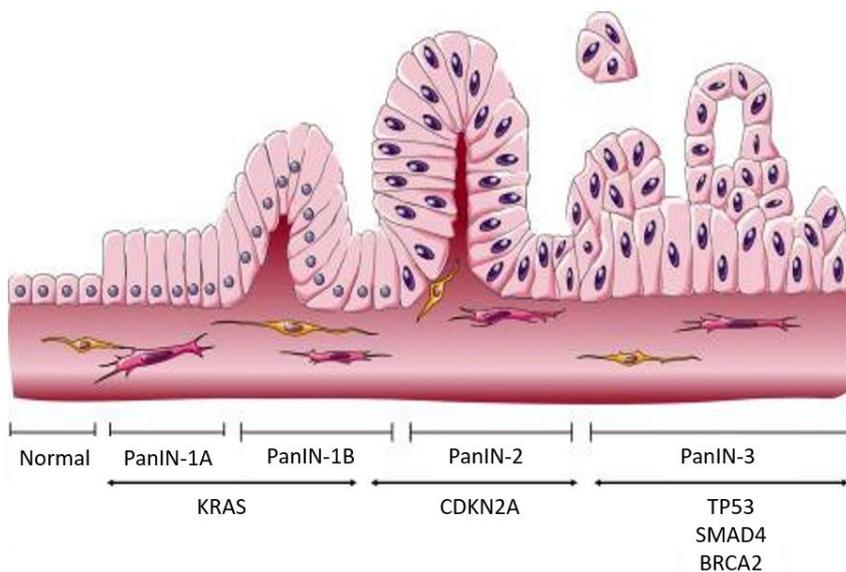


Abbildung 3: **Karzinogenese beim PDAC** (modifiziert nach Daoud et. al., 2019)

Die Regulierung der Expression von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen erfolgt unter anderem auch durch miRNAs, entsprechend scheinen miRNAs an der Tumorgenese beteiligt zu sein (Gironella et. al., 2007, Hu et. al., 2012).

### 1.2.6 Klassifikation

Wie in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt, werden die meisten Pankreastumore zusätzlich zur histopathologischen Klassifikation der WHO (World Health Organization) durch das TNM System, sowie auf dessen Basis durch die Union internationale contre le cancer (UICC) und das American Joint Committee on Cancer (AJCC) klassifiziert, wobei das TNM

System die anatomische Tumorausbreitung klassifiziert. Das TNM System und die darauf basierende Einteilung in UICC-Stadien ist die Grundlage zur Abschätzung der Prognose und für die Entscheidung der möglichen Therapie beim Pankreaskarzinom wichtig (Wittekind (Hrsg.), 2017)

Tabelle 1: **TNM Klassifikation des Pankreaskarzinoms** (modifiziert nach Wittekind (Hrsg.),2017)

T1 a b c	Tumor begrenzt auf Pankreas ≤ 0.5 cm ≤ 1 cm ≤ 2 cm
T2	Tumor begrenzt auf Pankreas > 2cm
T3	Tumor begrenzt auf Pankreas > 4cm
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus, Arteria hepatica oder Arteria mesenterica superior
No	keine positiven Lymphknoten von mindestens 12 resezierten Lymphknoten
N1	1-3 positive Lymphknoten von mindestens 12 resezierten Lymphknoten
N2	≥ 4 positive Lymphknoten von mindestens 12 resezierten Lymphknoten
M1	Metastasen

Tabelle 2: **UICC/AJCC Tumorstadien** (modifiziert nach American Cancer Society, 2019)

UICC/ AJCC Stadium	
I a b	T1, N0, M0 T2, N0, M0
II a b	T3, N0, M0 T1 - T3, N1, M0
III	T1-T3, N2, M0 oder T4, jedes N, M0
IV	jedes T, jedes N, M1

Diese Stadieneinteilung wird für die meisten Tumorerkrankungen der Bauchspeicheldrüse genutzt, abgesehen von neuroendokrinen Tumoren (NET), welche nach ihrem eigenen System eingeteilt werden. Das UICC-Tumorstadium nach kurativer Operation ist der wichtigste prognostische Parameter (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

### **1.2.7 Klinik**

Das Pankreaskarzinom präsentiert sich klinisch oft durch unspezifische Symptome. Dies ist ein Hauptgrund für die späte Diagnosestellung bei Pankreastumoren. Häufige Erstsymptome sind gürtelförmige abdominale oder epigastrische Schmerzen, Gewichtsverlust, Appetitverlust und Diarrhoe. Typisch für Tumore des Pankreaskopfes kann weiterhin ein schmerzloser Ikterus sein, verursacht durch Kompression der distalen Gallengänge. Für das Pankreasschwanzkarzinom existieren damit keine charakteristischen Symptome (Gallmeier et. al., 2018). Aber auch paraneoplastische Phänomene, wie zum Beispiel die Thrombophlebitis migrans oder der Progress eines bereits vorbestehenden Diabetes mellitus oder eine akute Pankreatitis können initiale Symptome eines Pankreaskarzinoms sein.

Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung können weitere Symptome auftreten. Hierzu zählen beispielsweise Symptome einer Leberinsuffizienz wie Juckreiz, Vigilanzveränderungen oder Tremor bis hin zum Koma, Ascites oder auch Knochenschmerzen und neurologische Veränderungen, die durch die Metastasierung des Tumors verursacht sind (Gallmeier et. al., 2018).

### **1.2.8 Diagnostik**

Eine frühe Diagnose des Pankreaskarzinoms ist notwendig, um ein Pankreaskarzinomleiden durch eine kurative Resektion, also die vollständige Entfernung des Tumors, zu heilen. Leider sind Patienten, die an einem Pankreaskarzinom leiden, in frühen Stadien häufig asymptomatisch und aktuell existieren keine relevanten Screeningmethoden um ein Pankreaskarzinom im frühen Stadium zu detektieren (Loosen et. al., 2017). Die Abdomensonographie, Endosonographie, Computertomographie (CT), sowie die Magnetresonanztomographie (MRT) mit MR Cholangiopankreatikographie (MRCP) sind momentan die Methoden der Wahl, um ein Pankreaskarzinom zu diagnostizieren. Die höchste Sensitivität besteht hierbei für das CT und das MRT mit MRCP.

Ist ein Tumor mittels Bildgebung diagnostiziert worden, empfehlen die Leitlinien die Bestimmung des Tumormarkers CA 19-9 (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

CA 19-9 ist zur Zeit der einzige validierte Biomarker für das Pankreaskarzinom. Jedoch ist er nicht spezifisch und kann auch bei benignen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Leberzirrhose oder Pankreatitis, erhöht sein. Seine Sensitivität und Spezifität für die Diagnose eines PDAC liegen nur bei 75,5 % resp. 77,6 %. Daher ist der Tumormarker CA

19-9 kein optimaler Tumormarker für das Screening von Pankreaskarzinomen (Zhang Y et. al., 2015).

Im Falle einer Resektabilität des diagnostizierten Tumors, wie durch die bildgebende Diagnostik beurteilt, empfehlen die Leitlinien keine vorherige Biopsie des Tumors. Ist der Tumor fortgeschritten und eine kurative Operation nicht mehr möglich, dann wird die Gewinnung von Tumorgewebe mittels Endosonographie empfohlen, um die Diagnose eines Karzinoms definitiv zu sichern und eine optimale zielgerichtete Tumorthherapie einleiten zu können (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

### **1.2.9 Metastasierung**

Einen wesentlichen Anteil an der schlechten Prognose für das Pankreaskarzinom hat die frühe Metastasierung. Diese betrifft einerseits die Lymphbahnen, aber auch über hämatogene Streuung insbesondere die Leber, Lunge, Knochen und Peritoneum (Yachida und Iacobuzio-Donahue, 2009).

Eine Rolle bei der Tumormetastasierung beim Pankreaskarzinom scheint die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) zu spielen, ein Prozess bei welchem sich Epithelzellen in mesenchymale Stammzellen umwandeln und über diese Umwandlung Eigenschaften erhalten, wie beispielsweise Migrationsfähigkeit, Invasivität und Resistenz gegenüber Apoptose (Kalluri und Weinberg, 2009)

### **1.2.10 Therapie**

Aufgrund der meist späten Diagnose in oftmals fortgeschrittenen Stadien ist es auch heute nur bei etwa 20 % der Patienten möglich eine kurative Resektion des Tumors durchzuführen. Die komplette Tumorsektion ist dabei die einzige kurative Möglichkeit für Patienten mit Pankreaskarzinom (Benson et. al., 2007). Aktuell zeigen neuere Studien, dass bei primär nicht resektablen, noch nicht metastasierten Tumoren eine so genannte neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt werden kann, welche im Idealfall den Tumor verkleinert und resezierbar macht. Diese Möglichkeit erhöht mittlerweile den Anteil an Patienten, die kurativ operiert werden können (Janssen et. al., 2019)

#### **1.2.10.1 Operation**

Ziel jeder Tumor-Operation an der Bauchspeicheldrüse ist die vollständige Entfernung des Tumorgewebes (R0-Resektion). Dies bedeutet, dass mikroskopisch keine Tumorzellen an den Resektionsrändern nachgewiesen werden dürfen. Mittlerweile ist es auch möglich, Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom kurativ zu operieren. Insbesondere im Fall einer Infiltration von venösen Gefäßen, wie zum Beispiel der Vena mesenterica

superior oder Vena portae, ist eine en bloc Resektion möglich. Liegt dagegen eine Infiltration von arteriellen Gefäßen, zum Beispiel des Truncus coeliacus oder Arteria mesenterica superior, vor, wird eine Tumorsektion aufgrund der perioperativ hohen Morbidität und Mortalität durch die Leitlinien nicht empfohlen. Auch bei Vorliegen von Fernmetastasen wird eine Resektion des Tumors nicht empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Studien konnten weiterhin zeigen, dass auch die Möglichkeit für eine neoadjuvante Therapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom beziehungsweise initial nicht-resektablem Pankreaskarzinom ohne Fernmetastasen besteht. Nach Durchführung der neoadjuvanten Therapie war bei bis zu 60 % der Patienten eine kurative Resektion des Tumors möglich (Hackert et. al., 2016, Palmer et. al., 1994). Abhängig von der Tumorlokalisation werden unterschiedliche Resektionsmethoden angewendet. Ist der Tumor im Kopf der Bauchspeicheldrüse lokalisiert, wird in der Regel eine klassische Whipple-Operation beziehungsweise eine pyloruserhaltende Duodenopankreatektomie durchgeführt, weiterhin, abhängig von der Tumorausbreitung, auch eine totale Pankreatektomie. Im Falle einer Lokalisation des Tumors im Körper oder Schwanz der Bauchspeicheldrüsen wird eine Pankreaslinksresektion durchgeführt, in der Regel in Kombination mit einer Splenektomie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Eine Operation an der Bauchspeicheldrüse ist ein komplizierter Eingriff, der früher mit einer hohen 30-Tages Mortalität verbunden war. Insbesondere durch Zugewinn an Erfahrung und Methodik, sowie Entstehung spezialisierter Zentren konnte diese Mortalitätsrate gesenkt werden und liegt nun deutlich unter 5 % (Winter et. al., 2012).

#### **1.2.10.2 Chemotherapie**

Abhängig vom UICC-Stadium des Tumors wird eine Chemotherapie durchgeführt. Die Leitlinien der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.) empfehlen bei Patienten nach Resektion, sowie histopathologischem UICC-Stadium I-III, eine adjuvante Monotherapie mit Gemcitabine oder 5-Fluorouracil (5-FU) /Folinsäure (Mayo-Protokoll) für mindestens sechs Monate. Die Therapie sollte, wenn möglich, spätestens sechs Wochen nach Durchführung der Operation begonnen werden.

Bei Vorliegen einer palliativen Situation, d.h. bei nicht-resektablen Tumoren, ist die Empfehlung, eine Chemotherapie durchzuführen, abhängig vom Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status der Patienten, welcher zwischen 0 und 2 liegen sollte (Tabelle 3).

Tabelle 3: **ECOG Performance Status** (modifiziert nach Oken et al, 1985)

0	Asymptomatisch. Keine Einschränkung in den Aktivitäten, wie vor der Erkrankung
1	Eingeschränkt in körperlichen Aktivitäten, aber Gehfähigkeit vorhanden und leichte Arbeit, wie z.B. Hausarbeit oder Computer-Arbeit, möglich
2	Gehfähigkeit und Fähigkeit zur Selbstversorgung vorhanden, Arbeiten nicht mehr möglich. Aufstehen über 50 % der Wachzeit möglich
3	Nur noch bedingt fähig zur Selbstversorgung, mehr als 50 % der Wachzeit bettlägerig bzw. sitzend.
4	Keine Möglichkeit der Selbstversorgung, vollständig an Bett oder Stuhl gebunden
5	Tod

Mögliche Therapie-Regimes für die palliative Therapie sind einerseits eine Monotherapie mit Gemcitabine, als auch Kombinationstherapien, zum Beispiel eine Therapie nach dem FOLFIRINOX-Schema (5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin) oder Gemcitabine kombiniert mit Erlotinib. Im Fall, dass der Tumor auf die so genannte Erstlinien-Therapie nicht anspricht, aber der ECOG Performance Status weiterhin im guten Bereich liegt, empfehlen die Leitlinien die Durchführung einer so genannten Zweitlinien-Therapie mit einem anderen Chemotherapeutikum (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine palliative Chemotherapie das Gesamtüberleben von Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung um etwa das doppelte verlängern und auch die Lebensqualität verbessern konnte (Palmer et. al., 1994, Glimelius et. al., 1996, Costa et. al., 2019). Bezüglich der aktuell gültigen Leitlinien muss allerdings beachtet werden, dass die AWMF-Leitlinien für das Pankreaskarzinom aus dem Jahr 2013 stammen und momentan aktualisiert werden.

### 1.2.11 Prognose

Wie bereits erwähnt, ist eine kurative Operation aufgrund der späten Diagnosestellung nur bei einem kleinen Teil der Patienten mit Pankreaskarzinom möglich. Aber auch bei vollständig resezierten Patienten liegt das 5-Jahres-Gesamtüberleben nur bei 10-30 % und ist unter anderem abhängig vom Lymphknotenstatus (Kang et. al., 2014).

Bezugnehmend auf Daten der American Cancer Society liegt das 5-Jahres-Gesamtüberleben bei Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien bei nur etwa 3 % (American Cancer Society, 2019). Nichtsdestotrotz zeigen Studien, dass sowohl durch die adjuvante Therapie als auch eine palliative Therapie durch die Nutzung verschiedener aufeinanderfolgender (sequenziellen) Chemotherapie-Regimes die Überlebenszeit der Patienten verlängert werden kann (Neoptolemos et. al., 2017, Pelzer et. al., 2011). Umso

wichtiger ist es, Biomarker zu identifizieren, die frühzeitig bei Patienten unter Chemotherapie ein Therapieansprechen anzeigen und bei Nicht-Ansprechen eine schnelle Umstellung auf eine andere, vielleicht wirksame Therapie ermöglichen.

### 1.3 Exosomen

Exosomen stellen mit einem maximalen Durchmesser von 30-120 nm (Lin J et. al., 2015) die kleinsten der drei Haupttypen extrazellulärer Vesikel, zu denen weiterhin die Mikrovesikel und Apoptosekörper gezählt werden, dar, und werden von Zellen in die interstitielle Flüssigkeit sezerniert (Abbildung 4) (Pettersen Hessvik et. al., 2018).

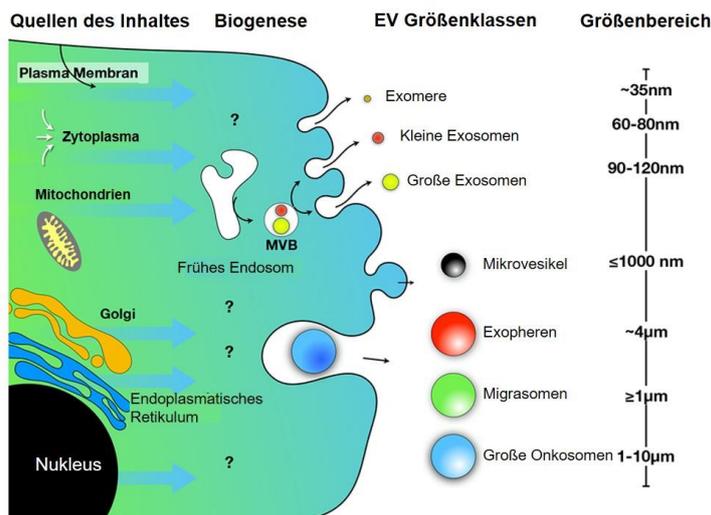


Abbildung 4: **Klassifikation extrazellulärer Vesikel (EV) nach Größe.** Dargestellt sind Exomere, Exosomen, Mikrovesikel, Exopheren, Migrasomen und große Onkosomen geordnet nach ihrer Größe. Die Biogenese der Exosomen ist mittlerweile relativ gut entschlüsselt, während die Biogenese der anderen EVs aktuell noch unbekannt ist. EVs beinhalten Material vom Zytoplasma, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Plasmamembran, endoplasmatischem Retikulum und dem Nukleus. Abkürzungen: EV: extrazellulärer Vesikel, MVB: multivesikulärer Körper (modifiziert nach Zijlstra und di Vicio, 2018)

Exosomen wurden zunächst als Zellabfall bewertet, aber nach dem derzeitigen Kenntnisstand scheinen Exosomen eine wichtige Rolle bei verschiedenen biologischen Prozessen zu spielen, wie zum Beispiel der interzellulären Kommunikation, der Regulation des Immunsystems oder auch als Transportvesikel (Liu et. al., 2019). Exosomen transportieren verschiedene molekulare Bestandteile der Ursprungszelle, einschließlich Proteine, Lipide, DNA, mRNAs und miRNAs von Zelle zu Zelle. Es wird angenommen, dass Exosomen von allen Zelltypen, wie beispielsweise dendritische Zellen, Lymphozyten, epithelialen Zellen oder Neuronen, sezerniert werden. Sie können deshalb in Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Speichel oder auch Aszites, sowohl von gesunden wie auch erkrankten Personen nachgewiesen werden (Li J et. al., 2015). Unser Labor konnte zeigen, dass Tumorpatienten vermehrt Exosomen ausschütten und also höhere Spiegel an

Exosomen in ihrem Blut zirkulieren haben als gesunde Individuen (Gluszko et. al., 2019). Aufgrund dieser Charakteristika werden Exosomen zukünftig noch eine wichtige Rolle bei Diagnose und Therapie von Erkrankungen spielen.

### 1.3.1 Biogenese der Exosomen

Die Biogenese von Exosomen ist in Abbildung 5 dargestellt. Ausgangspunkt ist die Endozytose an der Plasmamembran, die zur Entstehung endozytotischer Vesikel in der Zelle und zur Verschmelzung dieser Vesikel mit frühen Endosomen führt (Gurunathan et. al., 2019). Im endosomal System entstehen aus den frühen Endosomen durch Reifungsprozesse die späten Endosomen, welche dann durch vielfache Einstülpungen ihrer Membran intraluminal Vesikel bilden und somit zu multivesikulären Körper (MVB) reifen (Pettersen Hessvik et. al., 2018). Ein Teil der MVBs wird anschließend in den Lysosomen degradiert. Der andere Teil fusioniert in einem Calcium-abhängigen Prozess mit der Plasmamembran, so dass ihr Inhalt in den extrazellulären Raum ausgeschüttet wird. Die Vesikel werden nun Exosomen genannt (Li et. al., 2015).

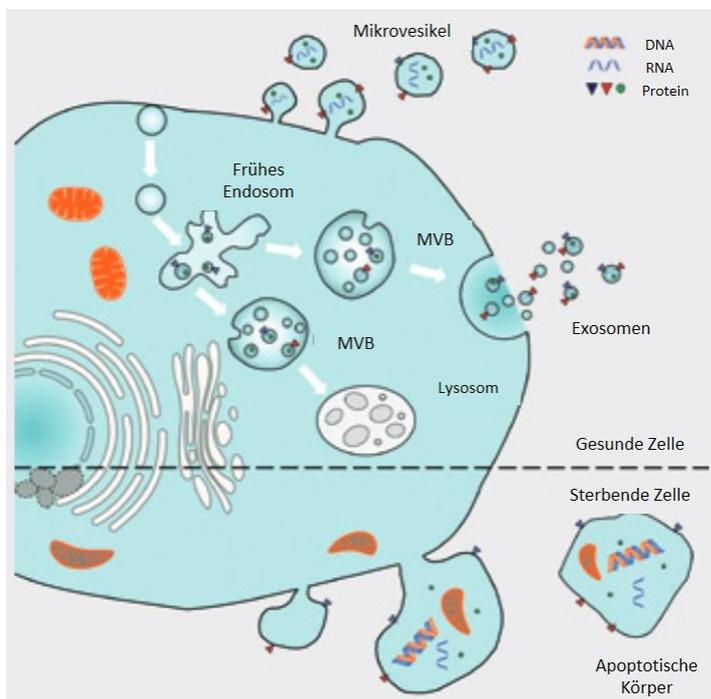


Abbildung 5: **Mechanismus der Freisetzung von Mikrovesikeln, Exosomen und Apoptotischen Körpern.** Mikrovesikel werden hierbei direkt von der Plasmamembran freigesetzt. Ausgangspunkt für die Biogenese von Exosomen ist die Bildung endozytotischer Vesikel, welche mit frühen Endosomen verschmelzen. Aus frühen Endosomen bilden sich über Reifungsprozesse, sowie vielfache Einstülpungen der Membran, letztlich Multivesikuläre Körper (MVB). Diese MVB werden zum einen Teil durch Lysosomen degradiert, zum anderen Teil verschmelzen sie mit der Plasmamembran und setzen ihre Vesikel als Exosomen in den extrazellulären Raum frei. Apoptotische Körper werden von sterbenden Zellen freigesetzt (modifiziert nach Krämer-Albers und Frühbeis, 2013)

### **1.3.2 Funktion von Exosomen**

Exosomen spielen eine wichtige Rolle in der interzellulären Kommunikation, in dem sie zelluläre Bestandteile wie Proteine, DNA, RNA und Lipide zu Empfängerzellen transportieren (Thery et. al., 2002, Schwarzenbach und Gahan, 2019) und somit die Eigenschaften der Wirtszelle modulieren können. Studien haben gezeigt, dass die Funktion der Exosomen von den Ursprungszellen abhängig ist. So sind Exosomen, welche von immunkompetenten Zellen, wie beispielsweise dendritischen Zellen, sezerniert werden, an der Regulation der Immunantwort beteiligt. Exosomen, welche von Tumorzellen freigesetzt werden, unterstützen wiederum die Tumorgenese, Tumorprogression, Metastasierung und die Resistenz auf eine Tumorthherapie (Li et. al., 2015). Aufgrund dessen verbreiten Exosomen die Erkrankung und eignen sich als Zielmoleküle für eine Behandlung.

### **1.3.3 Exosomen und Tumorerkrankungen**

Die Konzentrationen an Exosomen scheint im Blut von Patienten, die an einer Tumorerkrankung leiden, deutlich höher zu sein als bei Gesunden, weiterhin scheint der Inhalt der Exosomen sich mit dem jeweiligen Gesundheitszustand des Patienten zu verändern (Kalluri et. al., 2016). So zeigten Studien, dass Exosomen von Tumorzellen einen höheren Gehalt an onkogenen miRNAs (Onkomirs) haben als gesunde Zellen (Melo et. al., 2014, Melo et. al., 2015). Exosomen haben auf unterschiedliche Weise Einfluss auf eine Tumorerkrankung. So zeigten Studien, dass Exosomen die Tumorprogression unterstützen, indem sie zum Beispiel Tumorwachstum, Metastasierung und Therapieresistenz stimulieren und immunologischen Prozesse unterdrücken (Maia et. al., 2018).

## **1.4 MiRNAs**

MiRNAs wurden erstmals 1993 durch Lee et al in der Nematode *C. elegans* entdeckt (Lee et. al., 1993). Im Jahr 2007 wurden sie dann in Exosomen entdeckt (Valadi et. al., 2007). Heute weiß man, dass miRNAs eine wichtige regulative Rolle in Tier- und Pflanzenzellen spielen. MiRNAs sind eine Klasse kleiner, nicht-kodierender, einzelsträngiger RNA Moleküle, welche etwa 18-25 Nukleotide lang sind. Sie fungieren vorwiegend als Inhibitoren der Translation, indem sie an komplementäre Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region (3' UTR) ihrer Ziel-mRNAs binden. Auf diese Weise wird die Proteinexpression entweder durch Inhibition der Translation posttranskriptionell oder durch den Abbau ihrer Ziel-mRNAs unterdrückt. Für die mRNA-Bindung ist eine Kernsequenz von nur 2 bis 7 Nukleotiden erforderlich. In den meisten Fällen binden miRNAs nur teilweise an ihre komplementäre

Ziel-mRNA-Sequenz (Corcoran et. al., 2011). Eine unvollständige komplementäre Bindung führt zu translationaler Repression oder Deadenylierung ihrer Ziel-mRNAs, während eine vollständige komplementäre Bindung zum Abbau ihrer Ziel-mRNAs führt. In diesem Prozess binden miRNAs an zwei Proteine (GW182-Protein und ein Mitglied der Argonaut-Familie) und bilden einen Komplex namens miRNA-induzierter Silencing-Komplex (miRISC) (Abbildung 6). Dieser Komplex dient dann als Translationsinhibitor (Matsuyama und Suzuki, 2020). Im Gegensatz zur Inhibition der Translation können miRNAs auch als Aktivatoren der Genexpression dienen, indem sie an Promotorsequenzen binden (Tang et al, 2017, Liu et. al., 2013). Dieser Einfluss auf die Genexpression durch miRNAs führt zur Regulation zahlreicher Prozesse, wie beispielsweise Apoptose, Zellwachstum, Stoffwechsel (Roth et. al., 2010). Die Dysregulation von miRNAs scheint sowohl eine Rolle bei der Tumorentwicklung als auch beim Tumorsprechen auf eine Therapie zu spielen. Daher könnten miRNAs in Zukunft als potenzielle Zielmoleküle für eine zielgerichtete Tumorthherapie genutzt werden, oder auch als diagnostische Marker.

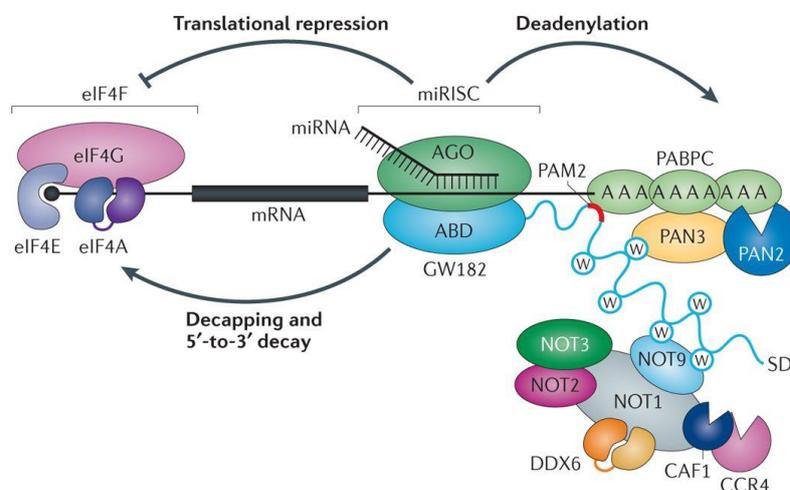


Abbildung 6: **Gen-Silencing durch miRNAs.** Die miRNA bindet an die Proteine GW182, welche eine AGO-bindende Domäne (ABD) besitzen, sowie ein Mitglied der Argonaut-Familie (AGO) und bildet den miRNA induced silencing complex (miRISC). MiRISC bindet an die 3'-untranslatierte Region (3' UTR) der Ziel-mRNA. Durch Interaktion mit dem zyttoplasmatischen Poly(A)-bindenden Protein (PABPC), sowie den zyttoplasmatischen Deadenylase-Komplexen PAN2-PAN3 und CCR4-NOT erfolgt die Deadenylierung der mRNA. Der PAN2-PAN3 Komplex scheint hierbei die erste Phase der Deadenylierung zu katalysieren, der CCR4-NOT Komplex vervollständigt diese. Der CCR4-NOT Komplex besteht aus mehreren unabhängigen Modulen, welche an der zentralen Untereinheit NOT1 binden, zu diesen gehören die Deadenylasen CAF1 und CCR4, das DEAD Box Protein 6 (DDX6), NOT9 als Bindeglied mit dem miRISC, sowie die Proteine NOT2 und NOT3. Die Bindung der Deadenylase Komplexe an GW182 erfolgt über das Carboxy-Ende (SD) dieses Proteins, welches aus Tryptophan-haltigen Motiven (W) besteht. Die deadenylierte mRNA wird anschließend durch Decapping weiter destabilisiert und abgebaut. Eine weitere Möglichkeit des Gen-Silencing durch miRISC ist die Inhibition der mRNA-Translation durch Hemmung des eukaryotischen Elongationsfaktor 4F (eIF4F) Komplexes, welcher aus dem Cap-bindenden Protein eIF4E, Adapterprotein eIF4G und der DEAD-Box RNA Helikase eIF4A besteht (nach Jonas und Izaurralde, 2015).

### 1.4.1 miRNA Biosynthese und Funktion

Die Biosynthese der miRNAs, sowie das Exosomen-Shuttle von Zelle zu Zelle ist in Abbildung 6 dargestellt. Der erste Schritt der Biogenese von miRNAs ist die Transkription der DNA im Zellkern. Das initiale Transkript ist die pri-miRNAs („primary miRNA“). Von dieser pri-miRNA wird mittels Mikropressorkomplex, welcher aus Drosha and DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) besteht, die pre-miRNA („precursor miRNA“) geschnitten (Catalonotto, 2016). Die resultierende pre-miRNA wird anschließend aus dem Zellkern mit Hilfe des Exportin 5 (XPO5)/RanGTP Komplexes geschleust, und im Zytoplasma wird sie mittels der RNase III Endonuklease Dicer zugeschnitten. Als Endprodukt entsteht die miRNA, welche an das Protein Argonaut 2 (AGO2) gebunden wird und in den miRISC gepackt wird, der aus mehreren Proteinen besteht (O`Brien et. al., 2018). Im RISC findet dann, wie oben beschrieben, die Inhibition der mRNA Translation statt (Abbildung 7). Der RISC wurde auch in Exosomen entdeckt (McAndrews und Kalluri, 2019).

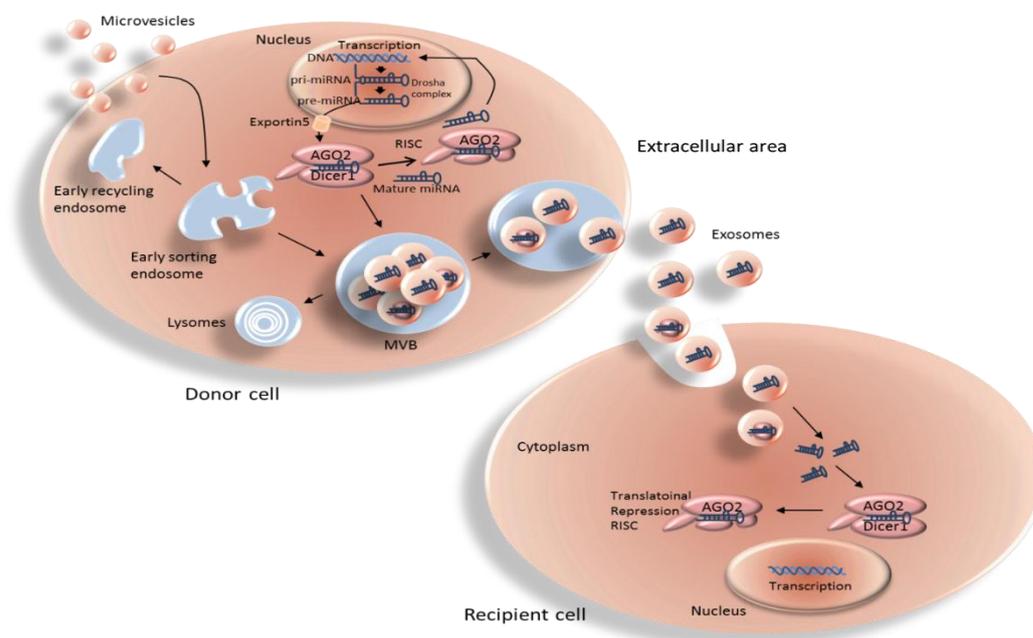


Abbildung 7: **Biosynthese der miRNA und Exosomen-Shuttle von Zelle zu Zelle** (nach Schwarzenbach, 2015)

### 1.4.2 Mechanismus der Befreiung der miRNA in die Blutzirkulation

Die Befreiung der miRNAs in die Blutzirkulation erfolgt entweder durch Zelltod, wie Apoptose und Nekrose, oder durch aktive Sekretion (Abbildung 8) (Zhang et. al., 2015). Bei der Apoptose werden die miRNAs, die an AGO Protein gebunden sind, in apoptotische

Körper integriert oder, wie auch bei der Nekrose als zellfreie Moleküle befreit. Bei der aktiven Sekretion werden die miRNAs selektiv in Exosomen verpackt. Diese Verpackung ist unabhängig von der Höhe ihrer Expression. Der Mechanismus der Sortierung der miRNAs in Exosomen ist bisher nicht vollständig geklärt. Ein Weg scheint die Bindung spezifischer miRNAs an die hnRNP (heterogeneous nuclear Ribonucleoproteine) zu sein (Villarroya-Beltri et. al., 2013). Auch ein „neural sphingomyelinase 2“ (nSMase2)-abhängiger Weg scheint beteiligt zu sein. So zeigten Kosaka et. al. in ihrer Studie einerseits, dass eine Überexpression der nSMase2 die Sekretion von miRNAs induzierte, andererseits, dass die Inhibierung der nSMase2 die Sekretion von miRNAs reduzierte. Der genaue Mechanismus konnte bisher nicht aufgeschlüsselt werden (Kosaka et. al., 2010). Auch das 3`Ende der miRNAs scheint einen Einfluss auf die Verpackung der miRNAs in Exosomen zu haben, sowie auch die Bindung der miRNAs an AGO2 (Zhang et. al., 2015).

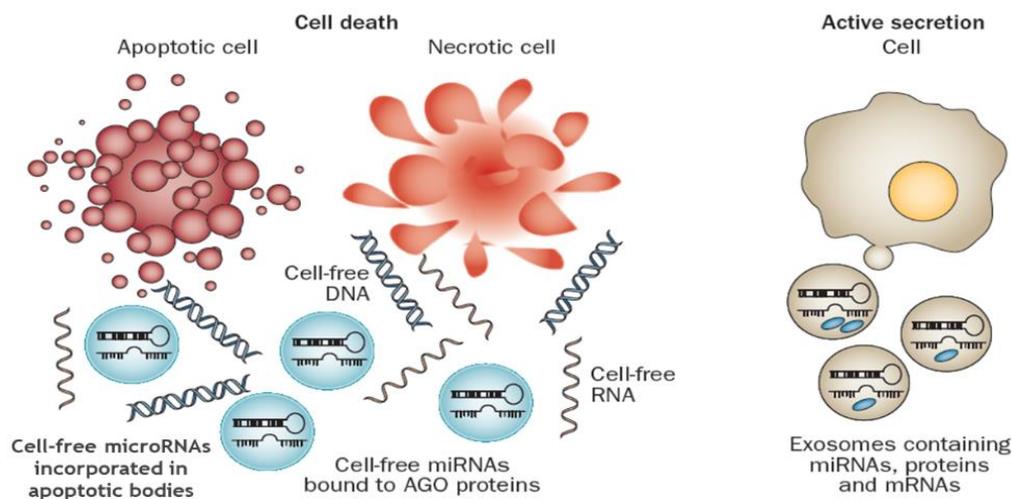


Abbildung 8: **Mechanismus der Befreiung der miRNA in die Blutzirkulation** (nach Schwarzenbach et. al., 2014)

### 1.4.3 miRNAs bei Tumorerkrankungen

In zahlreichen Studien konnte mittlerweile bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen, wie auch beim Pankreaskarzinom eine Dysregulation von miRNAs nachgewiesen werden (Rawat et. al., 2019, Schwarzenbach, 2014, Schwarzenbach, 2015).

MiRNAs erfüllen vielfältige Funktionen und greifen regulatorisch in verschiedene Stoffwechselprozesse und Signalwege der Zellen ein (Liu et. al., 2016, Bartel, 2004). In Abhängigkeit der Ziel-mRNA werden miRNAs in Tumorsuppressor miRNAs, die die Expression von Onkogenen inhibieren, und Onkomirs, die die Expression von Tumorsuppressorgenen reprimieren, eingeteilt (Daoud et. al., 2019). Auch beim Pankreaskarzinom spielen miRNAs eine wichtige Rolle. So zeigte eine Studie, dass die

Translation von CDK (Cyclin-abhängige Kinase) N1B durch eine Überexpression von miR-221 beim Pankreaskarzinom inhibiert wird. CDKN1B spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus und ihre erhöhte Expression fördert die Zellteilung und Proliferation (Park et. al, 2009). Weiterhin fand sich eine Deregulation von verschiedenen miRNAs, welche an KRAS binden und die Zellproliferation steuern. So konnte sowohl für die miR-96 als auch für die miR-126 gezeigt werden, dass diese miRNAs an die 3`Region von KRAS binden und die Translation inhibieren. Weiterhin fand sich in Pankreaskarzinom-Gewebe eine verringerte Expression dieser beiden miRNAs im Vergleich zum gesunden Gewebe (Yu et. al., 2010 und Jiao et. al., 2012). KRAS reguliert vielfältige zelluläre Prozesse, unter anderem Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Saliani et. al., 2019)

Die Anwendung von miRNA-Panels könnte zukünftig eher eine Rolle spielen, als Single-miRNAs. Li et al konnten für ein miRNA Panel, bestehend aus miR-20a, miR-21, miR-24, miR-25, miR-99a, miR-185 und miR-191 eine höhere Spezifität für die Diagnostik bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Stadium I feststellen als für den Tumormarker CA 19-9 (Li et.al., 2012). Eine Studie von Liu et. al. zeigte, dass die Kombination der miR-16 mit miR-196a und dem CA 19-9 Wert signifikant höhere Werte für Sensitivität und Spezifität zeigte, um Patienten mit Pankreaskarzinom von Gesunden zu unterscheiden, als die Anwendung der beiden miRNAs allein oder von CA 19-9 allein. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch für die Unterscheidung zwischen Patienten mit Pankreaskarzinom und Patienten mit chronischer Pankreatitis wider (Liu et. al., 2012). Überdies zeigten Xu et al., dass miR-103 signifikant bei Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium hochreguliert war, sowie bei Patienten mit Lymphknotenbefall. Ebenfalls korrelierte die Expression von miR-103 mit einer schlechten Prognose (Xu L et. al., 2019). Lai et. al. fanden in ihrer Studie, dass sich die veränderte Expression von miR-10b, miR-21, miR-30c, miR-181a und miR-let7a nach einer Tumoresektion wieder auf normale Niveaus regulierte (Lai et. al., 2017).

## **2. Ziele der Arbeit**

Das Pankreaskarzinom ist eine aggressive Tumorerkrankung mit hohem metastatischem Potential und einer schlechten Prognose. Daher besteht der dringende Bedarf für neue diagnostische, prognostische und prädiktive Biomarker. Ziel dieser Arbeit ist es das Vorkommen der mRNAs in Exosomen im Blutserum von Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Menschen zu quantifizieren. Durch statistische Analysen sollen die exosomalen miRNA Niveaus der Patienten mit Pankreaskarzinom mit jenen der Patienten mit chronischer Pankreatitis und der gesunden Studienteilnehmern miteinander verglichen werden, wie auch mit den

klinischen Parametern der Patienten mit Pankreaskarzinom, um die potentielle prognostische und diagnostische Relevanz der exosomalen miRNAs zu ermitteln.

Ein weiteres Ziel ist es, über die Messung der exosomalen miRNAs während des Verlaufes einer Chemotherapie Rückschlüsse auf das Therapieansprechen beziehungsweise den Therapieverlauf ziehen zu können.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Kits

Custom TaqMan microRNA Array- Karten Part Nr: 4449139	Thermofisher Scientific, Massachusetts, USA
ExoQuick® Exosome Isolation and RNA Purification Kit	System Biosciences, Palo Alto, USA
TaqMan PreAmplification Kit	Thermofisher Scientific, Massachusetts, USA
TaqMan miRNA ABC Purification Kit	Thermofisher Scientific, Massachusetts, USA
TaqMan MiRNA Reverse Transcription Kit	Thermofisher Scientific, Massachusetts, USA
TaqMan® Universal Master Mix II	Thermofisher Scientific, Massachusetts, USA

##### 3.1.2 Chemikalien und Lösungen

Nuclease freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts

##### 3.1.3 Puffer

###### Erythrozyten Lyse-Puffer

Sucrose	0.3 M
Tris pH 7.5	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Triton X100	1%

###### Lyse-Puffer

HCl	4 mM
0.1 % NP-40 in Isopropanol	

### 3.1.4 Geräte

MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Global Medical Instrumentation, Ramsey, USA
Monochromat Nano Quant infinite M200 Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Heraeus Multifuge 3 S-R	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tisch-Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries inc., New York, USA
Zentrifuge MC 6	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
7900 HT Fast Real-Time PCR System 384 block	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA

### 3.1.5 Liste der miRNAs

hsa-miR-181c-000482	hsa-miR-182-002334	hsa-miR-18a-002422
hsa-miR-301-000528	hsa-miR-30b-000602	hsa-miR-30c-000419
hsa-miR-181a-000480	hsa-miR-221-000524	hsa-miR-15b-000390
hsa-miR-24-000402	mmu-miR-451-001141	hsa-miR-19a-000395
hsa-miR-16-000391	hsa-miR-20a-000580	hsa-miR-23a-000399
hsa-miR-27a-000408	hsa-miR-29a-002112	hsa-miR-25-000403
mmu-miR-93-001090	hsa-miR-21-000397	hsa-miR-186-002285
hsa-miR-222-002276	hsa-miR-139-3p-002313	hsa-miR-196b-002215
hsa-miR-205-000509	hsa-miR-375-000564	hsa-miR-10b-002218
hsa-miR-483-5p-002338	hsa-miR-99a-000435	hsa-miR-210-000512
hsa-miR-31-002279	hsa-miR-489-002358	hsa-miR-212-000515
hsa-miR-34c-000428	hsa-miR-184-000485	hsa-miR-511-001111
hsa-miR-192-000491	hsa-miR-203-000507	hsa-miR-200b-002251
hsa-miR-200a-000502	hsa-miR-200c-002300	U6 snRNA-001973
hsa-miR-135b-002261	hsa-miR-1-002222	hsa-miR-492-001039

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Studienpopulation**

Für diese Studie wurden Daten und Blutserum von Patienten aus den Jahren 2008-2018 retrospektiv analysiert. Serumproben von Patienten mit Pankreaskarzinom und Patienten mit chronischer Pankreatitis wurden aus der Biomaterialbank ZeTDT GmbH Hamburg, Deutschland verwendet. Die Serumproben von gesunden Teilnehmern stammen aus der Serumbank des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Hamburg, Deutschland.

Die Studienpopulation wurde in drei Gruppen unterteilt: Patienten mit Pankreaskarzinom, welche sich einer Chemotherapie unterzogen, Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunde Teilnehmer. Patienten mit Pankreaskarzinom mussten für den Einschluss in die Studie über 40 Jahre alt sein und an einem diagnostizierten Pankreaskarzinom erkrankt sein. Das Vorliegen anderer Tumorerkrankungen führten zum Ausschluss aus der Studie. Patienten mit chronischer Pankreatitis mussten ebenfalls über 40 Jahre alt sein und unter einer diagnostizierten chronischen Pankreatitis leiden. Die Auswahl der gesunden Teilnehmer erfolgte nach Selbstauskunft.

Für diese Studie wurden vier Serumproben von Patienten mit Pankreaskarzinom analysiert. Die erste Probe war vor Beginn einer Chemotherapie entnommen worden und die drei weiteren Proben wurden alle vier Wochen während der Chemotherapie gewonnen ("Verlauf 1", "Verlauf 2", "Verlauf 3"). Die Untersuchung aller Proben erfolgte nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission (Nr.: WF-64/16). Von den Patienten mit Pankreaskarzinom wurden zusätzlich zu Alter und Geschlecht folgende Daten erfasst: Operation, TNM Stadium, Gesamtüberleben, Chemotherapie, Therapielinie, Tumormarker CA 19-9 in den jeweiligen Proben (Tabelle 4).

Ein Tumorsprechen auf die Therapie wurde durch den Verlauf des Tumormarkers CA 19-9 bestimmt und als CA 19-9 Abfall um >30 % vom Ausgangswert definiert, während ein Nicht-Ansprechen auf die Tumorthherapie als ein CA 19-9 Anstieg um >25 % vom Ausgangswert definiert wurde, modifiziert nach RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) 1.1 Kriterien. Patienten mit Tumormarker-Veränderungen unter Chemotherapie außerhalb dieses Bereichs wurden als stabiler Verlauf eingeteilt (Eisenhauer et. al., 2009)

### **3.2.2 Überprüfung von Hämolyse der Serumproben**

Die Serumproben der Studienpopulation wurden zu Beginn sämtlich auf Hämolysezeichen untersucht, um eine Beeinflussung der Messungen von zellulärer miRNAs durch eine hämolytierte Probe zu vermeiden. Als Standardkurve zur Detektion hämolytischer

Serumproben diente eine präparierte Verdünnungsreihe (1:1, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12, 1:14, 1:18, 1:20). Für diese Verdünnungsreihe wurden aus 7 ml Vollblut die Erythrozyten mittels Lyse-Puffer (bestehend aus 0.3 M Sucrose, 10 mM Tris pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1% Triton X100) lysiert. Dann wurden die Erythrozyten in den entsprechenden Verhältnissen mit Serum verdünnt. Fünfzig µl jeder Probe (Standard und Patientenprobe) wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und die Absorption mittels dem Monochromaten Nano Quant infinite M200 Pro gemessen. Die Messung erfolgte in einer Spanne von 350-650 nm. Absorptionsspitzen insbesondere bei 414 nm, aber auch bei 541 nm und 576 nm wiesen auf freies Hämoglobin und somit auf eine hämolysierte Probe hin. Je höher die Absorption in den Proben, desto höher war auch der Grad der Hämolyse. Patienten mit hämolysierten Serumproben wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

### **3.2.3 Isolation der Exosomen aus den Serumproben**

Die Isolation der Exosomen wurde mit dem ExoQuick® Exosome Isolation and RNA Purification Kit der Firma System Biosciences (SBI) anhand unseres modifizierten Protokolls durchgeführt. Zunächst wurden je 800 µl der Serumproben in 2 ml-Tubes für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 3000 g zentrifugiert, um ein Absetzen von Zelltrümmern zu bewirken. Aus diesen Proben wurden schließlich je 600 µl in ein neues Tube übertragen und erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 3000 g zentrifugiert. Jeweils 500 µl der Serumprobe wurden in ein neues Tube übertragen und 120 µl ExoQuick® hinzugegeben. Die Tubes wurden mehrmals invertiert und schließlich für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Hierdurch kam es zum Ausfallen der Exosomen, welche sich im nächsten Zentrifugationsschritt ebenfalls bei Raumtemperatur jedoch für 30 Minuten mit 1500 g als beiges Pellet am Boden ablagerten. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig abgekippt und es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur für 5 Minuten mit 1500 g. Mit einer Pipette wurde die restliche Flüssigkeit schließlich abpipettiert.

### **3.2.4 Extraktion der miRNAs**

Die Extraktion der miRNAs erfolgte durch Nutzung des TaqMan microRNA ABC Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt). Hierfür wurden die gewonnenen Exosomen zunächst mit 100 µl PBS (Phosphate-Buffered Saline) für 10 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Lysepuffer konnten die Exosomenpellets resuspendiert werden. Die als exogene Kontrolle fungierende cel-miR-39 wurde mit nukleasefreiem Wasser in einem Verhältnis von 1:4000 verdünnt. Je 2 µl dieser Verdünnung wurden zu den Proben gegeben, für 10 Sekunden auf einem Vortexer gemischt und kurz auf Eis gelagert. Mittels der im Kit enthaltenen Beads war es möglich die spezifischen miRNAs einzufangen. Hierfür

wurden diese Beads für eine Minute auf dem Vortexer durchmischt und für jede Probe 100 µl der Beads in einen LoBind 1,5 ml Zentrifugentube pipettiert. Die Tubes wurden auf einen magnetischen Ständer (DynaMag) gestellt, wodurch sich die Beads an die Wand der Tubes anlagerten und nach 1 Minute wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Die 500 µl Probe wurden in die Tubes mit den Beads übertragen, mit Hilfe des Vortexers durchmischt und bei 30°C für 40 Minuten im Thermoshaker inkubiert, um die miRNA an die Beads zu binden. Nach 1 Minute auf dem magnetischen Ständer konnte der Überstand der an den Beads gebundenen miRNA abpipettiert werden. Es folgten mehrere Waschvorgänge, um DNA, Proteine, Verunreinigungen und restliche Bindungslösung zu entfernen. Begonnen wurde mit 100 µl einer ersten Waschlösung (Wash Buffer 1), welche zu den Proben hinzugefügt wurde. Um die Beads in Lösung zu bringen wurde die Probe mit einem Vortexer durchmischt, kurz zentrifugiert und bei Raumtemperatur für 1 Minute inkubiert. Nach einer Minute auf dem Magnetständer wurde der Überstand abpipettiert. Darauf folgend wurde der Waschvorgang zweimal, wie eben beschrieben, mit einer weiteren Waschlösung (Wash Buffer 2) wiederholt. Am Ende der Waschvorgänge musste jegliche Flüssigkeit entfernt werden. Um die miRNAs nun in Lösung zu bringen, wurden 20 µl Elutions-Puffer zugegeben, durchmischt, kurz zentrifugiert und für 3 Minuten bei 70°C und 1200 rpm im Thermoshaker eluiert. Mittels des Magnetständers konnte nun der Überstand, welcher nun die miRNA enthielt, abpipettiert werden und in einem neuen Tube auf Eis gelagert werden.

### **3.2.5 Konversion in cDNA und Präamplifikation**

Die gewonnenen miRNAs wurden anschließend sofort mittels reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Diese Prozedur erfolgte anhand eines modifizierten Protokolls "for Creating Custom RT and Preamplification Pools using TaqMan MicroRNA Assays" (Life Technologies). Hierfür wurde auf Eis zunächst ein Mastermix präpariert, bestehend aus 6 µl Custom RT Primer Pool, 0.3 µl dNTPs mit dTTP (100mM), 3 µl MultiScribe Reverse Transkriptase (50 U/µl), 1.5 µl 10X RT Puffer, sowie 0.19 µl RNase Inhibitor (20 U/µl) pro Serumprobe. Dieser Mastermix wurde 6-mal invertiert und anschließend kurz zentrifugiert. 1 µl des Mastermixes und 4 µl der jeweiligen Probe wurden in ein Tube pipettiert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 15 µl ergab. Die Tubes wurden erneut 6-mal invertiert und anschließend zentrifugiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Mit dem MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Global Medical Instrumentation) erfolgte im Anschluss die reverse Transkription mit den folgenden Schritten: 30 Minuten bei 16°C, 30 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 85°C und abschließend 4°C

Um die Eingabe-cDNA zu erhöhen, wurde ein im Protokoll „for Creating Custom RT and Preamplification Pools using TaqMan MicroRNA Assays“ (Life Technologies) beschriebener Präamplifikationsschritt durchgeführt. Zunächst wurde hierfür ein Präamplifikationsmix vorbereitet, bestehend aus 12.5 µl TaqMan PreAmp Master Mix 2X, 3.75 µl Custom PreAmp Primer Pool und 3.75 µl nuklease-freies Wasser pro Serumprobe. Der Präamplifikationsmix wurde 6-mal invertiert und anschließend zentrifugiert. Dann wurden 20 µl des Präamplifikationsmixes mit 5 µl der jeweiligen Proben in ein Tube pipettiert, welches 6-mal invertiert und anschließend zentrifugiert wurde. Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) erfolgte mittels des MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Global Medical Instrumentation). Die Proben wurden schließlich in den folgenden Schritten präamplifiziert: 1. Zyklus = 10 Minuten bei 95°C, 2 Minuten bei 55°C, 2 Minuten bei 72°C; 16 Zyklen = 15 Sekunden bei 95°C, 4 Minuten bei 60°C; 3. Zyklus = 10 Minuten bei 99,9°C und abschließend bei 4°C.

### **3.2.6 miRNA Expression**

Um unterschiedlich exprimierte miRNAs zu identifizieren wurde eine real-time TaqMan PCR mit Custom TaqMan microRNA Array-Karten durchgeführt. Die Array-Karten enthielten insgesamt 45 unterschiedliche miRNAs, 2 Referenz-miRNAs und eine Leerkontrolle. Als endogene Kontrollen dienten miR-39 und miR-484 zur Normalisierung der Daten. Die 45 miRNAs von Interesse wurden anhand der Literatur spezifisch für das Pankreaskarzinom zusammengesetzt. Serumproben von jeweils 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis und Gesunden, sowie Serumproben von 22 Patienten mit Pankreaskarzinom vor Beginn der Chemotherapie mit jeweils drei Verlaufsmessungen während der Chemotherapie wurden analysiert. Für die Durchführung der real-time TaqMan PCR wurde das Protokoll von Thermo Fisher Scientific wie folgt modifiziert: Die Array-Karten wurden mit dem PCR-Reaktionsmix beladen, welcher insgesamt 112.5 µl fasste, bestehend aus 56.25 µl TaqMan Universal Master Mix II, 54.2 µl nuklease-freies Wasser und 2 µl Präamplifikations-Produkt. Die PCR wurde im 7900 HT Fast Real-Time PCR System 384 Block durchgeführt: 1 Zyklus bei 95 °C für 10 Minuten; 40 Zyklen bei 95 °C für 15 Sekunden, 60 °C für 1 Minute.

### **3.2.7 Normalisierung der Daten und statistische Analyse**

Für die statistische Auswertung wurde die Thermo Fisher Applied Biosystems™ Analysis Modules ([www.aps.thermofisher.com](http://www.aps.thermofisher.com)), SPSS Software, Version 24.0 (SPSS Inc. Chicago, IL) und Microsoft Excel (Microsoft Excel für Office 365 MSO) verwendet.

Die Thermo Fisher Scientific Analyse Software wurde für die Erstellung der Heatmap und der Volcano Plots genutzt. Alle Rohdaten aus der real-time PCR wurden in die Analysesoftware von Thermo Fisher importiert. Zunächst erfolgte die Begutachtung der Amplifikationskurven. Falls sich eine Kurve atypisch darstellte, wurde der Cq-Wert für die Analyse entfernt. Anschließend wurden die Cq Werte mit einem Cq Konfidenzintervall unter 0.95 ebenfalls verworfen. Der Konfidenzintervall wurde mittels Algorithmus durch die Thermo Fisher Software kalkuliert und beschreibt wie wahrscheinlich es ist, dass der beobachtete Cq Wert mit einer korrekten Amplifikationskurve korreliert. Die bereinigten Daten der miRNA Expression wurden mittels  $\Delta Cq$  Methode wie folgt kalkuliert:  $\Delta Cq = \text{Mittelwert Cq der jeweiligen miRNA von Interesse} - \text{Mittelwert Cq der Referenz-miRNAs (miR-484 und miR-39)}$ .

Für die Heatmap wurden die Abstände zwischen Proben und Assays unter Verwendung einer hierarchischen Clusterbildung basierend auf den  $\Delta Cq$ -Werten und der Pearson-Korrelation berechnet. Die Clustering-Methode ist eine durchschnittliche Kopplung.

Die Volcano Plots stellen die p-Werte vs. X-fache Veränderung der Expressionsniveaus jeder miRNA bei der untersuchten Zielgruppe (Patienten mit Pankreaskarzinom) relativ zu einer Referenzgruppe (Patienten mit Pankreatitis oder gesunde Teilnehmer) dar. Hierfür wurden die  $\Delta\Delta Cq$  kalkuliert, resultierend aus dem Mittelwert  $\Delta Cq$  (miRNA in der Zielgruppe)-Mittelwert of  $\Delta Cq$  (miRNA in der Referenzgruppe). Anschließend erfolgte die relative Quantifizierung mittels der Formel  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ . Letztendlich wurden die relative Expression und die p-Werte mittels Benjamini und Hochberg Methode  $\log_2$  und  $\log_{10}$ -transformiert und als Volcano Plots dargestellt. Die Berechnung des Unterschiedes der relativen Expression der miRNAs innerhalb der Subgruppen erfolgte mittels Student t-Test. Mittels SPSS erfolgte die Auswertung der Patientencharakteristika, weiterhin die Korrelation zwischen miRNAs und CA 19-9 mittels Spearman-Rho-Test, sowie die Streudiagramme. Die Erstellung der Liniendiagramme erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel. Ein p-Wert  $<0.05$  wurde als statistisch signifikant gewertet, und zwar zweiseitig.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Studienpopulation**

Tabelle 4 fasst die demographischen, klinischen und histopathologischen Eigenschaften der verschiedenen Gruppen zusammen.

Insgesamt wurden die Daten von 22 Patienten mit Pankreaskarzinom, 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis und 10 gesunden Teilnehmern ausgewertet. Sowohl Pankreaskarzinom-Patienten mit einem Median von 60 Jahren (47-75 Jahre) und einem

Grenzwert-p-Wert von 0.045 als auch gesunde Teilnehmer mit einem Median von 54 Jahren (46-73 Jahre) und einem p-Wert von 0.021 waren jünger als die Patienten mit chronischer Pankreatitis mit einem Median von 69.5 Jahren (52-79 Jahre). Die Patienten mit Pankreaskarzinom, welche inzwischen fast alle verstorben sind, hatten ein Gesamtüberleben von 12 Monaten im Median ab Diagnosestellung. Am Ende der Studie im Jahr 2018 waren nur noch zwei der Patienten am Leben, die bis dahin ein Gesamtüberleben von über 62 Monaten im Median hatten.

Insgesamt wurden 10 Patienten in die Studie eingeschlossen, die sich zuvor einer Operation in kurativer Absicht unterzogen hatten. Bei 7 dieser Patienten konnte eine vollständige Entfernung des Tumors (R0-Resektion) erreicht werden. Zwölf Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits im fortgeschrittenen Stadium, sodass eine kurative Operation nicht mehr möglich war. Bezüglich des Gesamtüberlebens zeigte sich ein signifikanter Vorteil für die Patienten, die sich einer kurativen Operation unterzogen hatten im Vergleich zu Patienten, die nicht operiert wurden [Median 31.5 Monate (8-93 Monate, n=10) vs. 9.5 Monate (4-23 Monate n=12),  $p < 0.001$ ]. Betrachtet man die Tumorgroße zum Operationszeitpunkt, so wies die Mehrheit der Patienten (n=19) ein T3 Stadium auf, zwei Patienten befanden sich im T4 Stadium. Bei 10 Patienten bestand bereits ein Befall der Lymphknoten, bei 13 Patienten konnten hämatogene Metastasen nachgewiesen werden, und nur 3 Patienten hatten weder einen Lymphknotenbefall noch eine Fernmetastasierung zum Untersuchungszeitpunkt. Für einen Patienten fehlten diese Angaben zum TNM Stadium.

Elf Patienten, die sich keiner kurativen Operation unterzogen hatten, befanden sich zum Zeitpunkt unserer Untersuchung vor Beginn einer palliativen Erstlinientherapie. Bei einem Patienten begann unsere Untersuchung vor der Zweitlinientherapie. Die Patienten, welche sich einer Operation in kurativer Absicht unterzogen hatten, befanden sich meist entweder ebenfalls vor Beginn einer Erstlinientherapie (n=4) oder vor Beginn einer Zweitlinientherapie (n=4). Zwei Patienten befanden sich vor einer Drittlinientherapie. Insgesamt sprachen 11 der 22 Patienten gut auf die durchgeführte Chemotherapie an und zeigten bei Betrachtung des CA 19-9 Wertes eine Remission, das heißt einen Abfall des Tumormarkers um mehr als 30% des Ausgangswertes. Fünf Patienten zeigten eine Progression (einen Anstieg von mindestens 20 % des CA 19-9 Wertes) und 6 Patienten zeigten ein stabiles Tumorgeschehen. Die Einteilung des Tumoransprechens erfolgte modifiziert nach den RECIST 1.1 Kriterien (s.a. Methodik, Eisenhauer et. al., 2009).

Tabelle 4: **Demographische und klinische Eigenschaften der Studienpopulation**, aufgeteilt nach Patienten mit Pankreaskarzinom unter Chemotherapie, Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Teilnehmern (SD = Standardabweichung)

	Patienten mit Pankreaskarzinom n=22	Patienten mit chronischer Pankreatitis n=10	Gesunde Teilnehmer n=10
Geschlecht weiblich männlich	10 (45.5 %) 12 (54.5 %)	4 (40%) 6 (60%)	6 (60%) 4 (40%)
Alter in Jahren Median (Range)	60 (47-75)	69.5 (52-79)	54 (46-73)
Verstorbene Patienten Gesamtüberleben in Monaten Median (Range)	n=20 12 (4-49)		
Noch lebend Gesamtüberleben in Monaten Median in Monaten	n = 2 >62		
Gesamtüberleben in Monaten [Median (Range)] kurative Operation (n=10) keine kurative Operation (n=12)	31.5 (8-93) 9.5 (4-23)		
Keine resezierende Operation hiervon operative Exploration Operation in kurativer Intention R0-Resektion R1-Resektion	n=12 n=3 n=10 n=7 (70 %) n=3 (30 %)		
TNM Stadium (n=21) Tumorgroße (T) T3 T4 N1 M1 N1+M1	19 (90 %) 2 (10 %) 10 (47 %) 13 (62 %) 5 (24 %)		
Therapielinie Erstlinie ohne OP Erstlinie nach OP Zweitlinie nach OP Zweitlinie ohne OP Drittlinie nach OP	n=22 11 (50 %) 4 (18.2 %) 4 (18.2 %) 1 (4.5 %) 2 (9.1 %)		
Therapieansprechen (Serum CA 19-9) Remission Stabiler Verlauf Progression	n=11 (50 %) n= 6 (27 %) n=5 (23 %)		

## 4.2 Hämolyse

Um einen Einfluss der Hämolyse bei der Quantifizierung der exosomalen miRNAs in den Serumproben zu vermeiden, die Daten verfälschen könnte, erfolgte die Messung von Hämoglobin in den Proben mittels Spektralanalyse, sowie die Auswertung anhand einer Standardkurve (Abbildung 9) (siehe Methodik). In keiner Serumprobe konnten Absorptionspeaks im Bereich aller drei relevanten Wellenlängen 414, 541 und 576 nm gemessen werden. Absorptionspeaks bei 414 nm wurden bis 0.6 akzeptiert. Die Proben der 22 Patienten mit Pankreaskarzinom, der 10 Gesunden, sowie der 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis konnten anhand dieser Kriterien in meine Studie eingeschlossen werden.

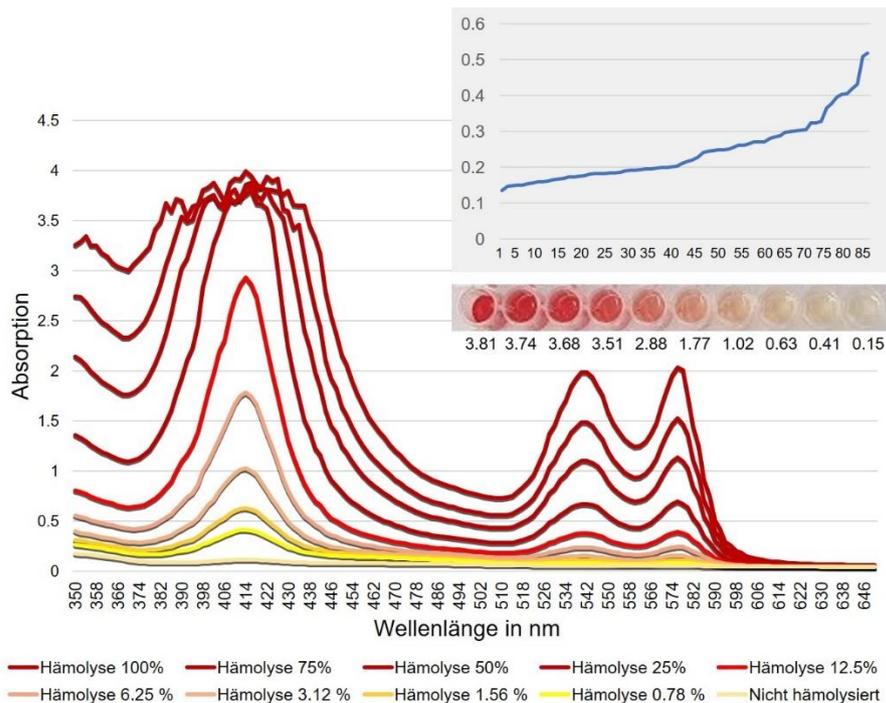


Abbildung 9: **Freies Hämoglobin in den Serumproben.** Die Messung der Hämolyse erfolgte mittels Spektralanalyse bei Wellenlängen von 350 bis 650 nm. Die Auswertung erfolgte anhand einer Standardkurve. Das Ausmaß der Hämolyse wurde anhand von Absorptionsspitzen bei 414 nm gemessen. Zusätzlich erfolgte Messungen bei 541 und 576 nm. Serumproben galten als hämolyseiert bei Absorptionspeaks von über 0.6 bei 414 nm beziehungsweise Absorptionspeaks bei allen drei relevanten Wellenlängen.

## 4.2 Vorkommen von miRNAs in Exosomen bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu Patienten mit chronischer Pankreatitis und Gesunden

Zunächst erfolgte die Erstellung einer hierarchischen Clusteranalyse, wie in einer Heatmap (Abbildung 10) dargestellt. Die Heatmap wurde aus den Daten der real time PCR zur Detektion von 47 exosomalen miRNAs bei 22 Patienten mit Pankreaskarzinom, 10

Patienten mit chronischer Pankreatitis und 10 gesunden Studienteilnehmern erstellt. Die Clusteranalyse erfolgte zur Darstellung potenzieller Cluster in Reihen (miRNAs) und Säulen (Serumproben). Signifikant hoch- und herunterregulierte miRNAs sind in rot (hoch) respektive in grün (herunter) dargestellt.



Abbildung 10: **Hierarchische Clusteranalyse mittels Heatmap von 47 miRNAs.** Signifikant hochregulierte miRNAs sind in grün, signifikant herunterregulierte miRNAs in rot dargestellt.

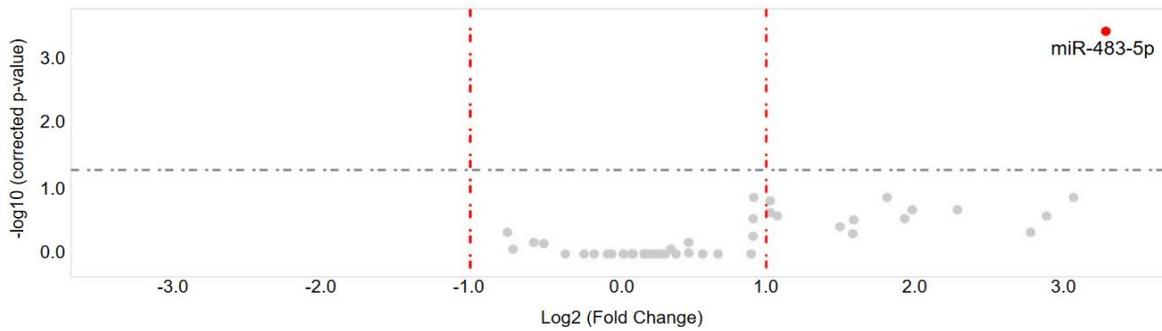
Abbildung 11 und Tabelle 5 zeigen die Ergebnisse der Messungen der miRNA Expression in Exosomen im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom verglichen mit jenen der Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Teilnehmern mittels quantitativer TaqMan real-time PCR-basierender miRNA Array Karten, welche insgesamt 45 unterschiedliche miRNAs von Interesse beinhalten.

Die Volcano-Plots mit  $\log_2$  (x-fache Veränderungen der Expressionsniveaus) auf der X-Achse, sowie die negativen  $\log_{10}$  Werte (korrigierte p-Werte) auf der Y-Achse zeigen alle herunter regulierten (linke Seite des Plots) und hoch regulierten (rechte Seite des Plots) Serumspiegel der exosomalen miRNAs bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich mit der Expression von gesunden Teilnehmern (A), Patienten mit chronischer Pankreatitis (B) und Patienten ohne Tumorerkrankung des Pankreas (Patienten mit chronischer

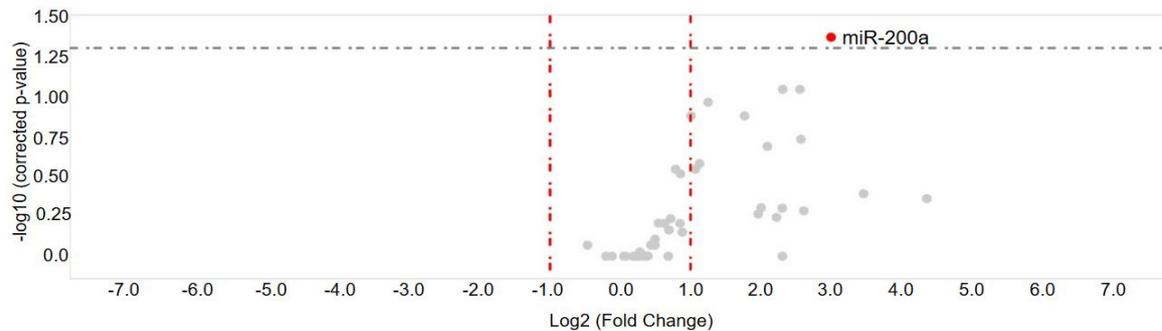
Pankreatitis+Gesunde) (C). Weiterhin werden Expressions-Unterschiede zwischen Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Teilnehmern verglichen (D).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Abbildung 11 und Tabelle 5, dass die Expression einer miRNA, der miR-483-5p bei Patienten mit Pankreaskarzinom signifikant erhöht ist verglichen mit der Expression bei gesunden Teilnehmern ( $p=0.00036$ ). Im Vergleich von Patienten mit Pankreaskarzinom mit Patienten mit chronischer Pankreatitis zeigte sich ebenfalls eine miRNA bei Patienten mit Pankreaskarzinom erhöht, nämlich die exosomale miR-200a ( $p=0.0042$ ). Eine zusätzliche Quantifizierung verglich Patienten mit Pankreaskarzinom mit Patienten ohne Tumorerkrankung (Patienten mit chronischer Pankreatitis und Gesunde). Hier fand sich eine signifikant erhöhte Expression von 3 exosomalen miRNAs bei Patienten mit Pankreaskarzinom, nämlich die miR-483-5p ( $p=0.00085$ ), miR-200a ( $p=0.0028$ ) und miR-99a ( $p=0.0032$ ). Kein Unterschied in der Expression zeigte sich im Vergleich der Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Teilnehmern.

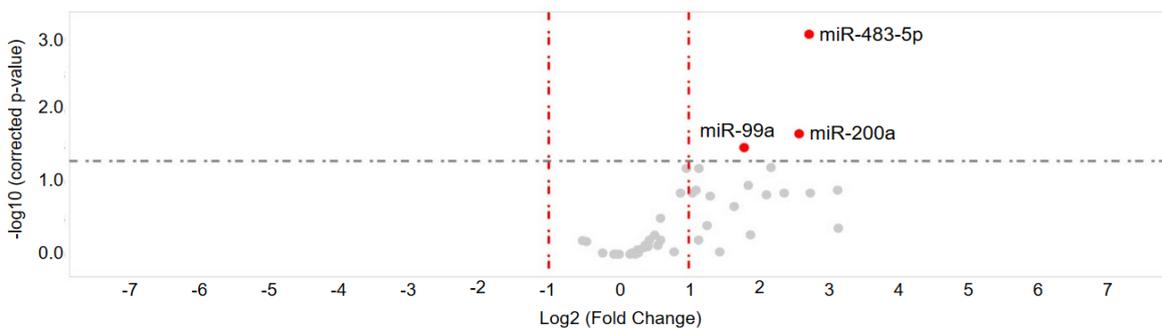
**A** 22 Patienten mit Pankreaskarzinom vs. 10 Gesunde



**B** 22 Patienten mit Pankreaskarzinom vs. 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis



**C** 22 Patienten mit Pankreaskarzinom vs. 20 Teilnehmer ohne Pankreaskarzinom



**D** 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis vs. 10 Gesunde

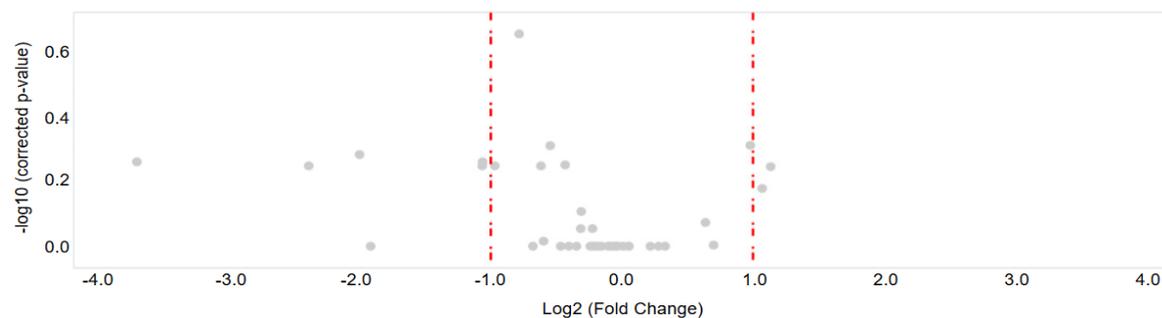


Abbildung 11: **Volcano Plots (korrigierte p-Werte vs. fold changes) mit 45 exosomalen miRNAs.** Vergleich der Expression exosomaler miRNAs von 22 Patienten mit Pankreaskarzinom mit 10 gesunden Teilnehmern (**A**), mit 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis (**B**), mit 20 Studienteilnehmern ohne Pankreaskarzinom (chronische Pankreatitis+Gesunde) (**C**), sowie zwischen 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis und 10 gesunden Teilnehmern (**D**). Die graue gestrichelte Linie präsentiert den Schwellenwert entsprechend dem p-Wert von  $p=0.05$ . Signifikant hochregulierte exosomale miRNAs sind als rote Punkte dargestellt. Graue Punkte präsentieren nicht-signifikante Veränderungen. Die p-Werte wurden kalkuliert mittels Student t-Test und korrigiert nach Benjamini und Hochberg.

Tabelle 5: **Signifikant deregulierte exosomale miRNAs** im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich mit Gesunden bzw. Patienten mit chronischer Pankreatitis.

miRNAs	Patienten mit Pankreaskarzinom (n=22) vs. Gesunde (n=10)	Patienten mit Pankreaskarzinom (n=22) vs. Patienten mit chronischer Pankreatitis (n=10)	Patienten mit Pankreaskarzinom (n=22) vs. Patienten ohne Pankreaskarzinom (n=20)	Patienten mit chronischer Pankreatitis (n=10) vs. Gesunde (n=10)
	p-Wert (fold-change)			
miR-200a	-	p=0.0042 (8.0)	p=0.0028 (6.0)	-
miR-483-5p	p=0.00036 (9.8)	-	p=0.00085 (6.6)	-
miR-99a	-	-	p=0.0032 (3.5)	-

Es werden nur miRNAs dargestellt, welche signifikant dereguliert sind, "-": nicht-signifikante Werte.

Um die Frage zu beantworten, ob die erhöhte Anreicherung der miR-483-5p in Exosomen bei Patienten mit Pankreaskarzinom nach R0-Resektion, das heißt also nach vollständiger Entfernung des Tumorgewebes, persistiert, wurde auch ein Vergleich dieser Patientengruppe mit den gesunden Teilnehmern durchgeführt. In die Auswertung wurden nur die Patienten nach R0-Resektion einbezogen, deren Serumprobe zeitnah nach ihrer Operation abgenommen wurde und die sich vor Beginn der adjuvanten Chemotherapie befanden (n=3). Wohl aufgrund der Größe der Kohorte konnte kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zwischen Pankreaskarzinompatienten und Gesunden in den exosomalen Niveaus der miR-483-5p entdeckt werden (Daten nicht gezeigt).

### 4.3 Korrelation der exosomalen Niveaus der miRNAs mit den CA 19-9 Werten

Das Tumorsprechen auf die Chemotherapie der Patienten mit Pankreaskarzinom wurde durch den CA 19-9 ermittelt. Ein Absinken des Tumormarkers CA 19-9 um mindestens 30 % vom Ausgangswert wurde als Remission interpretiert, während ein Anstieg des CA 19-9 um 20 % vom Ausgangswert als Progression gewertet wurde (siehe Methodik). Veränderungen des CA 19-9, die nicht in diesen Bereich fielen wurden als stabiler Verlauf gewertet (siehe auch unter Methoden, Eisenhauer et. al., 2009). Zuerst wurden die Korrelationen der exosomalen Niveaus der miR-483-5p, miR-200a und miR-99a mit den CA 19-9 Werten statistisch ausgewertet. Es zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen CA 19-9 und miR-200a (p=0.031), sowie CA 19-9 und miR-99a (p=0.005), das heißt je höher der CA 19-9 Wert, desto höher auch der exosomale Gehalt an miR-200a bzw. miR-99a. Allerdings sprechen die Korrelationskoeffizienten von r=0.341 für miR-99a, sowie r=0.286 für miR-200a für einen mittleren bzw. schwachen Effekt. Erfolg der

Ausschluss der ungewöhnlichen Werte für das CA 19-9 bzw. die jeweilige miRNA, welche in den Streudiagrammen der Abbildung 12 sichtbar werden, ergibt sich keine Korrelation mehr für die miR-200a ( $p=0.29$ ) bzw. miR-99a ( $p=0.102$ ) mit dem Tumormarker CA 19-9. Für die Korrelation zwischen CA 19-9 und miR-483-5p zeigte sich ebenfalls keine signifikante Korrelation. In Abbildung 12 sind die Streudiagramme der einzelnen Korrelationsanalysen dargestellt.

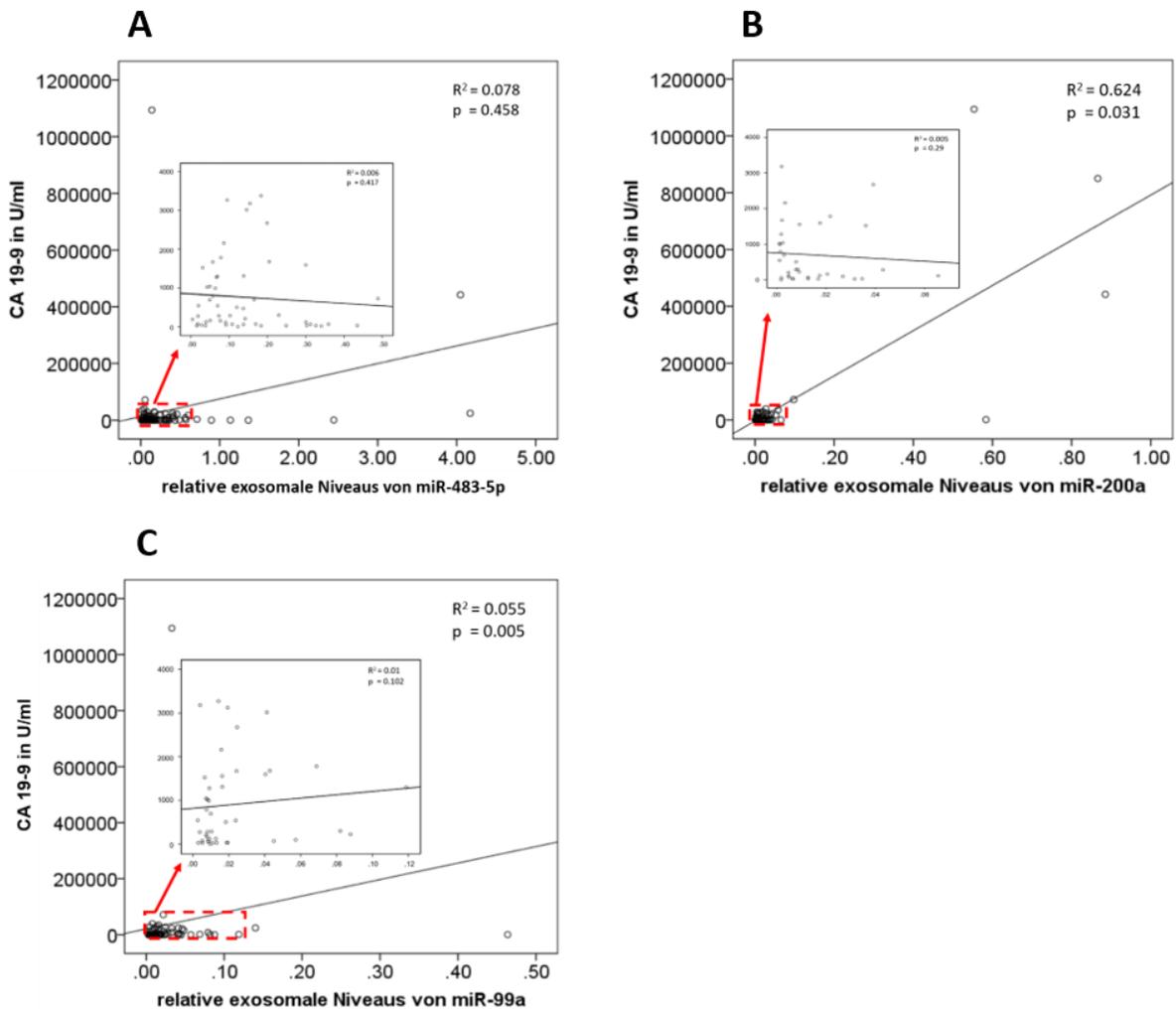


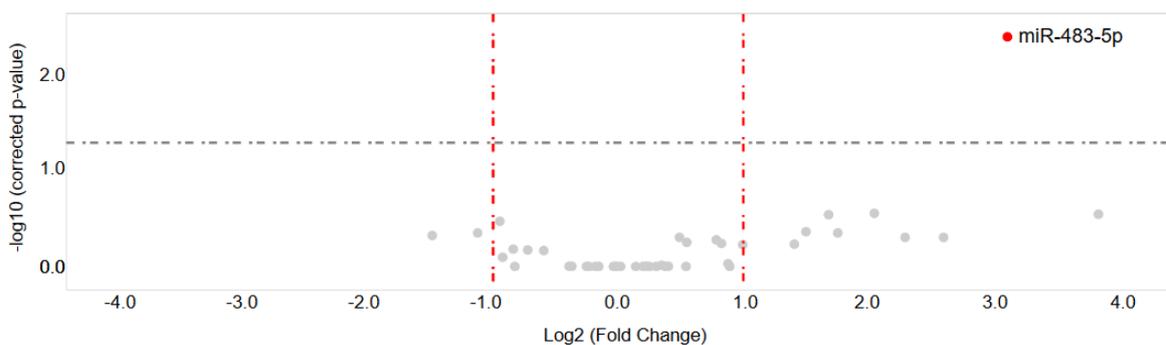
Abbildung 12: Korrelation der CA 19-9 Werte mit den exosomalen Niveaus von miR-483-5p (A), miR-200a (B) miR-99a (C) bei 22 Patienten mit Pankreaskarzinom. Im Streudiagramm ist eine Vergrößerung der Ansammlung der gestreuten Punkte in der linken Ecke zu sehen. Die p-Werte wurden kalkuliert mittels Spearman-Rho-Test.

#### 4.4 Vergleich der exosomalen Niveaus der miRNAs unter Berücksichtigung des Tumoransprechens

In einer Subgruppenanalyse wurden nun die Konzentrationen der miRNAs in Exosomen bei Patienten mit Pankreaskarzinom mit denjenigen der gesunden Teilnehmer unter Berücksichtigung des Tumoransprechens unter Chemotherapie verglichen. Hier fanden

sich bei 11 Patienten mit Pankreaskarzinom, welche unter der Chemotherapie eine Remission zeigten, in der Serumprobe vor Beginn der Chemotherapie signifikant erhöhte Spiegel der miR-483-5p in Exosomen ( $p=0.003$ ). Bei 10 Patienten, welche unter der durchgeführten Therapie einen Progress bzw. einen stabilen Verlauf zeigten, fand sich ebenfalls ein signifikant erhöhtes Vorkommen von miR-483-5p in Exosomen ( $p=0.028$ ). Diese statistische Auswertung zeigt, dass ein erhöhter Verpackungsmechanismus von miR-483-5p in Exosomen von Patienten mit Pankreaskarzinom stattfindet, aber diese exosomalen Spiegel nicht zwischen Therapieerfolg und Resistenz unterscheiden können (Abbildung 13).

**A** 12 Patienten mit Pankreaskarzinom mit Remission unter Chemotherapie vs. 10 Gesunde



**B** 10 Patienten mit Pankreaskarzinom mit Progress/stabilem Verlauf unter Chemotherapie vs. 10 Gesunde

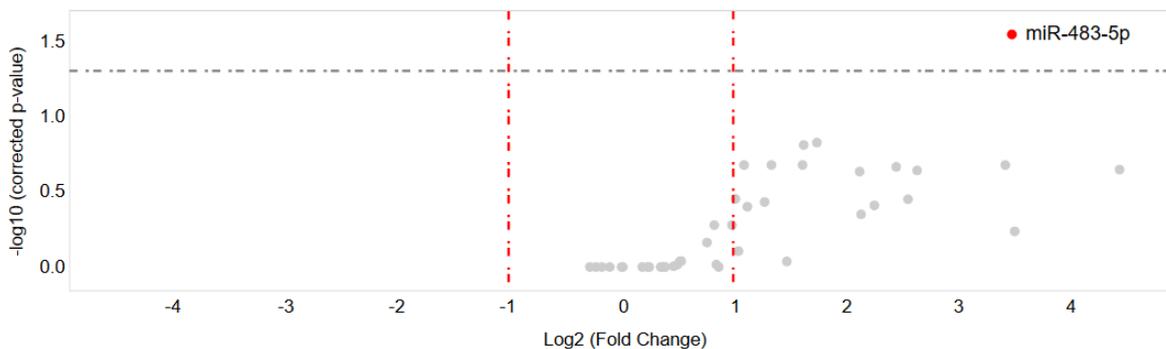


Abbildung 13: **Volcano Plots (korrigierte p-Werte vs. fold changes) mit 45 exosomalen miRNAs.** Vergleich der Expression exosomaler miRNAs von 12 Patienten mit Pankreaskarzinom und Remission unter Chemotherapie wie durch den CA 19-9 Wert bestimmt (**A**), sowie von 10 Patienten mit Pankreaskarzinom und Progress oder stabilem Verlauf unter Chemotherapie, wie durch den CA 19-9 Wert bestimmt (**B**) mit derjenigen von 10 gesunden Teilnehmern. Die graue gestrichelte Linie präsentiert den Schwellenwert entsprechend  $p=0.05$ . Signifikant herunterregulierte exosomale miRNAs sind als grüne Punkte dargestellt, während signifikant hochregulierte exosomale miRNAs als rote Punkte dargestellt sind. Graue Punkte präsentieren nicht-signifikante Veränderungen. Die p-Werte wurden kalkuliert mittels Student t-Test und korrigiert nach Benjamini und Hochberg.  $p=0.003$  (A),  $p=0.028$  (B)

## 4.5 Veränderung der miRNA Expression bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Verlauf der Chemotherapie

Wie in Abbildung 14 dargestellt, wurden zusätzlich Liniendiagramme erstellt, welche die Expression exosomaler miRNA im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom im Verlauf der Durchführung einer Chemotherapie vergleichen. Es wurden exosomale miRNAs im Serum vor Chemotherapie und während der Chemotherapie (3 Verlaufswerte: „Verlauf 1“, „Verlauf 2“, „Verlauf 3“) untersucht. Die Serumproben wurden jeweils im Abstand von etwa einem Monat unter Chemotherapie gewonnen. Hier zeigte sich, dass die Spiegel der miR-483-5p während der Chemotherapie signifikant erhöht blieben: vor Chemotherapie ( $p=0.00036$ , 9.8-fach), 1. Verlauf ( $p=0.0011$ , 8.8-fach), 2. Verlauf ( $p=0.00025$ , 12.2-fach), 3. Verlauf ( $p=0,00026$ , 10.4-fach). Das Vorkommen an exosomaler miRNA-483-5p zeigt sich bis zum ersten Verlauf im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Chemotherapie relativ konstant. Im weiteren Verlauf kommt es zunächst zu einem erhöhten Vorkommen exosomaler miRNA-483-5p, möglicherweise verursacht durch eine erhöhte Apoptose der Zellen, sowie Befreiung der Exosomen unter Chemotherapie. Anschließend sinkt das Vorkommen exosomaler miR-483-5p wieder. Diese Dynamik war allerdings nicht signifikant.

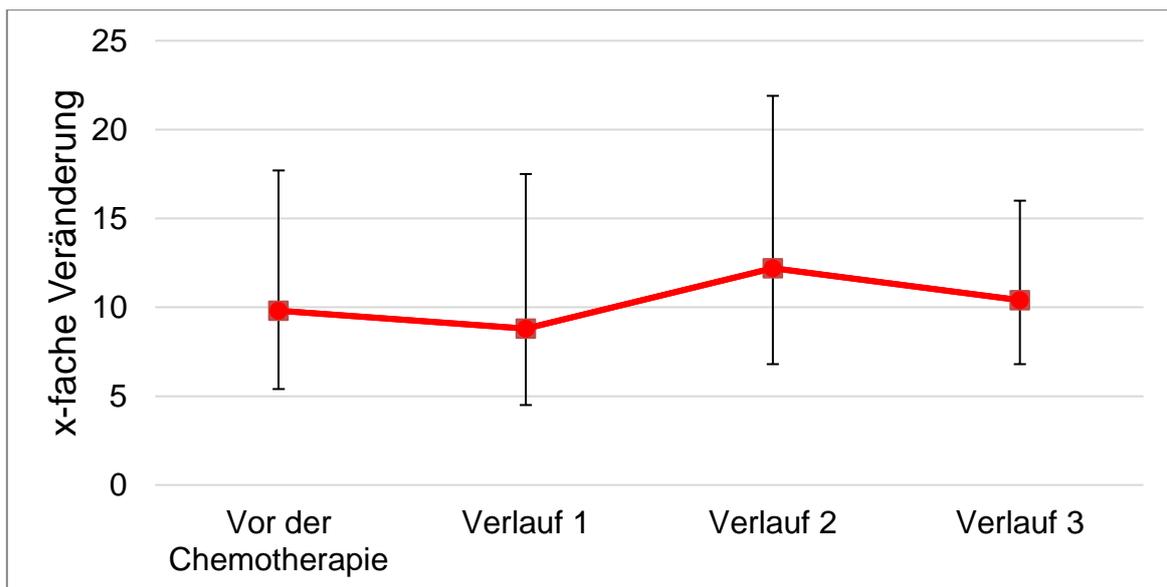


Abbildung 14: **Liniendiagramm: miR-483-5p Vorkommen im zeitlichen Verlauf.** Dargestellt sind die signifikant erhöhten Spiegel +/- Ranges der exosomalen miR-483-5-p bei 22 Patienten mit Pankreaskarzinom vor Beginn ( $p=0.00036$ ), sowie im Verlauf einer Chemotherapie ( $p=0.0011$ ,  $p=0.00025$ ,  $p=0,00026$ ) im Vergleich mit denjenigen der 10 gesunden Teilnehmern. Der zeitliche Verlauf (vor der Chemotherapie, Verlauf 1, Verlauf 2, Verlauf 3) ist auf der X-Achse dargestellt, die x-fache Veränderung der exosomalen Niveaus der miR-483-5p auf der Y- Achse.

Eine Subgruppenanalyse, welche 11 Patienten mit Pankreaskarzinom in Remission unter Chemotherapie mit 10 Gesunden vergleicht, zeigte ebenfalls ein signifikant hohes Vorkommen von miR-483-5p in Exosomen von Patienten mit Pankreaskarzinom vor der Chemotherapie ( $p=0.022$ , 7.8-fach) und während der Chemotherapie: 1. Verlauf ( $p=0.0004$ , 18.5-fach), 2. Verlauf ( $p=0.0004$ , 19.7-fach), 3. Verlauf ( $p=0.0004$ , 13.9-fach) (Abbildung 15). Auch hier findet sich im Verlauf der Chemotherapie zunächst ein Anstieg des Vorkommens der exosomalen miR-483-5p, sowie vom 2. bis zum 3. Verlauf wieder ein Absinken des Vorkommens.

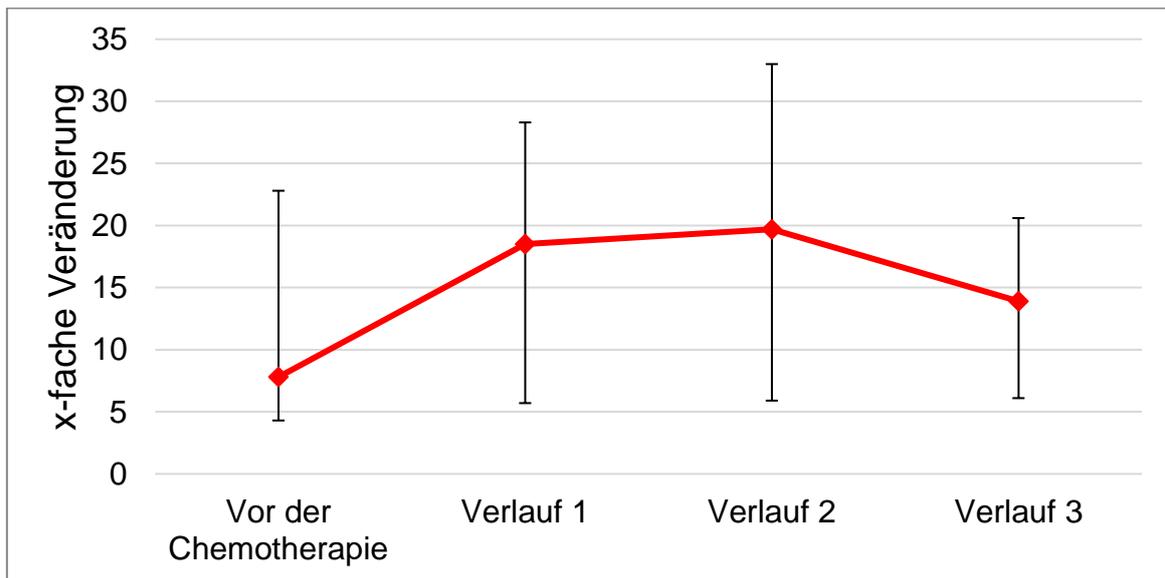


Abbildung 15: **Liniendiagramm: miR-483-5p Vorkommen im zeitlichen Verlauf.** Dargestellt sind die signifikant erhöhten Spiegel +/- Ranges der exosomalen miR-483-5p bei 11 Patienten mit Pankreaskarzinom mit Remission unter Chemotherapie vor Beginn ( $p=0.022$ ) sowie im Verlauf einer Chemotherapie ( $p=0.0004$ ,  $p=0.0004$ ,  $p=0.0004$ ) im Vergleich mit denjenigen der 10 gesunden Teilnehmern. Der zeitliche Verlauf (vor der Chemotherapie, Verlauf 1, Verlauf 2, Verlauf 3) ist auf der X-Achse dargestellt, die x-fache Veränderung der exosomalen Niveaus der miR-483-5p auf der Y-Achse.

In der Analyse, ob sich unter Durchführung der Chemotherapie bei den 11 Patienten mit Pankreaskarzinom, welche ein Progress unter Chemotherapie zeigten, die Expression der miR-483-5p veränderte, fand sich kein Hinweis auf eine signifikante Dynamik der miR-483-5p (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin zeigte sich auch in der Betrachtung der Verläufe der einzelnen Patienten mit Remission unter Chemotherapie ein sehr heterogenes Verhalten des Vorkommens der miR-483-5p. So kam es bei allen Patienten mit Remission zu einem signifikanten Abfall des CA 19-9 unter Chemotherapie, hiervon zeigten 3 Patienten einen signifikanten Abfall des Vorkommens der exosomalen miR-483-5p, 3 Patienten einen leichten Anstieg des

Vorkommens an exosomaler miR-483-5p und 5 Patienten zeigten nicht sicher zuzuordnende Verläufe (Daten nicht gezeigt).

#### **4.6 Vergleich der miRNA Expression zwischen den Subgruppen innerhalb der Patienten mit Pankreaskarzinom**

Zusätzliche Analysen der miRNA- Expression befassten sich mit dem Vergleich einzelner Subgruppen innerhalb der Patienten mit Pankreaskarzinom. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden für diese Auswertung nur Patienten mit einbezogen, welche sich zum Zeitpunkt der Studie in einer Erstlinientherapie befanden (n=15). Sowohl ein Vergleich zwischen den Patienten, welche sich einer Tumoroperation unterzogen hatten (n=4) und den nicht operierten Patienten (n=11), als auch zwischen den Patienten, bei denen der Tumor vollständig entfernt wurde (R0- Resektion) (n=3) und den nicht operierten Patienten zeigten keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Vorkommens der miRNAs in Exosomen (Daten nicht gezeigt).

Ebenfalls fand sich kein signifikanter Unterschied der miRNA-Konzentration in Exosomen zwischen den Patienten, welche positiv, d.h. mit einer Remission der Tumorerkrankung (CA 19-9 Abfall um > 30 % gegenüber den Ausgangswerten) auf die durchgeführte Erstlinientherapie reagierten (n=7) und den Patienten, welche eine Progression bzw. einen stabilen Verlauf unter Chemotherapie zeigten (n=8) (Daten nicht gezeigt).

Ein Vergleich des Vorkommens der miRNAs in Exosomen zwischen den Patienten mit Lymphknotenbefall und den Patienten mit Fernmetastasen war nicht möglich, weil nur ein Patient mit isoliertem Lymphknotenbefall in dieser Subgruppe vorhanden war. Bei Betrachtung aller Patienten, unabhängig der Therapielinie und Operation, fand sich kein Unterschied in der Expression der exosomalen miRNAs zwischen Patienten mit Lymphknotenbefall und Patienten mit Fernmetastasierung. Auch zwischen den Patienten ohne Lymphknotenbefall oder Metastasierung (n=3) und den Patienten mit Lymphknotenbefall oder Metastasierung (n=17) zeigte sich kein Expressionsunterschied. Ebenfalls zeigte der statistische Vergleich der miRNA-Expression unter Einbezug der Überlebenszeit bei Patienten mit einem Gesamtüberleben unter 12 Monaten (n=10) mit den Patienten mit einem Gesamtüberleben über 12 Monate (n=12) keine Signifikanz (Daten nicht gezeigt).

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede im Vorkommen von miRNAs in Exosomen von Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu demjenigen von Patienten mit chronischer Pankreatitis und Gesunden zu detektieren. Das Pankreaskarzinom gehört aufgrund seiner recht späten Diagnosestellung, des invasiven Wachstums und hohen Metastasierungspotentials zu den Krebserkrankungen mit einer sehr schlechten Prognose (Ilic et. al., 2016). Grund für die späte Diagnosestellung sind, abgesehen von einer meist erst spät einsetzenden Symptomatik, auch fehlende Screening-Verfahren. Der einzige aktuell validierte Biomarker für das Pankreaskarzinom ist der Tumormarker CA 19-9, der in der Verlaufskontrolle eingesetzt wird, aber angesichts seiner nicht ausreichenden Sensitivität und Spezifität für die Diagnostik nur bedingt und für das Screening überhaupt nicht geeignet ist (Loosen et. al., 2017). Umso wichtiger ist es Biomarker zu detektieren, welche eine hohe Sensitivität und Spezifität für das Pankreaskarzinom aufweisen, um einerseits die Früherkennung eines Pankreaskarzinoms zu fördern und somit mehr erkrankte Patienten der momentan einzigen Heilungschance zuzuführen, nämlich der kurativen Operation. Andererseits, um möglichst frühzeitig zu erkennen, ob durchgeführte Therapien wirksam sind und so optimal die Möglichkeit der sequenziellen Therapie ausschöpfen zu können. Weiterhin bieten Biomarker auch gegebenenfalls eine Angriffsfläche für so genannte zielgerichtete Therapien.

In dem von mir untersuchten Panel an miRNAs zeigte sich ein signifikant höheres Vorkommen der miR-483-5p in Exosomen im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom als von Gesunden. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch im Verlauf der Chemotherapie wider. Weiterhin fand sich ein signifikant höheres Vorkommen der exosomalen miR-200a im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom als von Patienten mit chronischer Pankreatitis. Hier zeigte sich kein Unterschied bezüglich des exosomalen Vorkommens der miR-483-5p, was bedeuten könnte, dass die exosomale miR-483-5p eher tumorspezifisch ist und die exosomale miR-200a fähig ist, zwischen bös- und gutartigen Tumoren zu unterscheiden. Falls die Patienten mit chronischer Pankreatitis und die Gesunden zu Studienteilnehmern ohne Pankreaskarzinom als Vergleichsgruppe zusammengefasst wurden, dann waren die miR-483-5p, miR-200a und die miR-99a in Exosomen von Patienten mit Pankreaskarzinom signifikant angereichert. Diese Ergebnisse zeigen wieder, dass die Verpackung dieser drei miRNAs in Exosomen eher tumorspezifisch ist, aber sie weisen auch auf die kleine Studienpopulation hin. Deshalb ist es unbedingt nötig, diese Auswertung an größeren Studienpopulationen zu wiederholen.

Soweit mir bekannt ist wurde die Deregulation der miR-483-5p noch nicht in Patienten mit Pankreaskarzinom oder Pankreatitis untersucht. Jedoch zeigten Studien eine veränderte Expression der miR-483-5p bei anderen Erkrankungen, beispielsweise im Serum bei Patienten mit systemischer Sklerose, im Plasma von Patienten mit Karzinomen der Nebenniere oder auch im Serum von Patienten mit Insulinresistenz und Adipositas (Decman et. al., 2019, Chouri et. al., 2018, Gallo et. al., 2018). Wang et al. entdeckte, dass miR-483-5p bevorzugt in Exosomen in der pleuralen Effusion von Patienten mit Adenokarzinom der Lunge verpackt wird, in Vergleich zu Patienten mit tuberkulösen oder anderen gutartigen Läsionen (Wang et. Al., 2017). Diese Entdeckung bestätigt meine Daten, die zeigen, dass miR-483-5p eher in Exosomen von Patienten mit Pankreaskarzinom verpackt wird als in Exosomen von Patienten mit einer gutartigen Pankreatitis. Also scheint die Verpackung von miR-483-5p eher tumorspezifisch zu sein. Des Weiteren zeigten Warnecke-Eberz et. al., dass miR-483-5p auch in Exosomen von Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus überpräsentiert ist (Warnecke-Eberz et. al., 2015)

MiR-483-5p scheint die Expression von IGF-2 (Insulin-like Growth-Faktor 2) durch seine direkte Bindung an eine Promoterregion der IGF-2 mRNA hoch zu regulieren. Dabei bindet miR-483-5p direkt an die 5` UTR (untranslatierter Bereich) der mRNA (Liu et. al., 2013). IGF-2 wiederum stimuliert die DNA- und RNA-Synthese sowie die Proliferationsrate zahlreicher Zellen und ist vor allem für die fetale Entwicklung von Bedeutung. IGF-2 wird bei unterschiedlichen Karzinomen vermehrt exprimiert, hierzu zählen beispielweise Mamma-, Ovarial-, Prostatakarzinom (Brouwer-Visser et. al., 2015) und auch das hepatozelluläre Karzinom (Tang et al, 2017). Beim hepatozellulären Karzinom scheint die erhöhte Expression des IGF-2 aus einer vermehrten Transkription der P3 mRNA zu resultieren. Tang et al zeigten in ihrer Studie, dass sowohl miR-483-5p als auch P3 mRNA im Tumorgewebe von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom im Vergleich mit gesundem Lebergewebe vermehrt exprimiert werden. Diese Studie konnte auch nachweisen, dass die Genexpression direkt durch die Bindung der miR-483-5p an die 5`UTR der P3 mRNA stimuliert wird (Tang et al, 2017). Cui et. al. untersuchten die Funktion der miR-483-5p beim kolorektalen Karzinom. Auch hier fanden sie eine erhöhte Expression der miR-483-5p im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom im Vergleich zu Gesunden. Weiterhin korrelierte die Expression von miR-483-5p auch positiv mit der Expression von IGF-2 (Cui et. al., 2016) Diese Untersuchungsergebnisse zeigen die besondere Eigenschaft von miRNAs, dass sie nicht nur die Translation ihrer Ziel-mRNA durch ihre Bindung an die 3`UTR posttranskriptionell inhibieren, aber auch die Translation ihrer Ziel-mRNA durch ihre Bindung an die 5`UTR erhöhen können. Des Weiteren besteht eine enge positive

Korrelation von miR-483-5p mit IGF-2 in mehreren Tumortypen. Deshalb würde es interessant sein, die Beziehung von miR-483-5p mit IGF-2 beim Pankreaskarzinom auch zu untersuchen, um so zeigen, ob diese Korrelation ein allgemeiner Aspekt bei Karzinomen ist.

In meiner Studie konnten die Spiegel der exosomalen miR-99a zwischen Patienten mit und denjenigen ohne Pankreaskarzinom differenzieren. Auch Dhayat et. al. entdeckte eine Überexpression von miR-99a bei Gemcitabine-resistenten PDAC-Zelllinien. (Dhayat et. al., 2015), Stroese et. al. fanden sowohl im Gewebe als auch im Plasma von Patienten mit Pankreaskarzinom, ein erhöhtes Vorkommen der miR-99a im Vergleich zu Gesunden (Stroese et. al., 2018). Diese Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, dass miR-99a eventuell eine OnkomiR ist. Jedoch zeigten andere Studien, die die Expression und Funktion der miR-99a bei anderen Tumorerkrankungen untersucht haben, eher eine herunterregulierte Expression der miR-99a, und interpretierten die miR-99a eher als Tumorsuppressor. So zeigten Zhu et. al. in ihrer Studie an Tumorgewebe, dass miR-99a bei Patienten mit kolorektalem Karzinom signifikant herunterreguliert war im Vergleich zu Gesunden. Weiterhin zeigte die Studie, dass miR-99a direkt die Expression von mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) hemmt. MTOR selbst ist eine Proteinkinase, welche die Proteinexpression und das Zellwachstum fördert und an der Entstehung des kolorektalen Karzinoms beteiligt ist (Zhu et. al., 2019). Überdies fanden Zhang et. al. in ihrer Studie, dass miR-99a im Gewebe von Patienten mit Ovarialkarzinom auch signifikant herunterreguliert war. Die geringe Expression der miR-99a korrelierte mit einer schlechten Prognose der Patienten. In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass miR-99a über die Inhibierung von mTOR die Proliferation beim Ovarialkarzinom hemmt, und über die Suppression des Gens HOXA1 (HomeboxA1) die epitheliale-mesenchymal Transition (EMT) hemmt, welche bei Tumorpatienten ein wichtiger erster Schritt zur Metastasierung ist (Zhang et. al., 2019). In Magenkarzinom-Zelllinien zeigten Xu et. al. ebenfalls eine tumorsuppressive Wirkung der miR-99a, die den IGF-1 Rezeptor inhibierte (Xu XL et. al., 2019). Diese anscheinend diskrepanten Daten können dadurch erklärt werden, dass verschiedene Tumorarten und Quellen (Tumorgewebe oder verschiedene Flüssigbiopsien) untersucht wurden. Außerdem sollte man auch die verschiedenen angewandten Techniken, die Normalisierung der Daten und die Größe der Kohorte berücksichtigen. Meine Ergebnisse, die ein hohes Vorkommen von miR-99 in Exosomen zeigen, spiegeln natürlich nicht diese Expressionsanalysen wider, sondern weisen auf ein vermehrtes Verpacken dieser miRNA in Exosomen hin.

In meiner Studie konnten auch die Spiegel der exosomalen miR-200a zwischen den Patienten mit und denjenigen ohne Pankreaskarzinom differenzieren, sowie in einer weiteren Analyse zwischen Patienten mit Pankreaskarzinom und Patienten mit chronischer Pankreatitis. Es gibt zahlreiche Publikationen über miR-200a. Eine Überexpression der miR-200a konnte sowohl in Tumorgewebe und Serum bei Patienten mit PDAC entdeckt werden als auch in Pankreaskarzinom-Zelllinien (Diaz-Riascos et. al., 2019; Kent et. al., 2009, Li et. al., 2010). Mehrere Studien haben die Funktion der miR-200a beim Pankreaskarzinom untersucht. MiR-200a scheint über die Hemmung der Expression der Transkriptionsfaktoren ZEB (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox) 1 und ZEB2 als Tumorsuppressor zu wirken. ZEB1 und ZEB2 hemmen direkt die Expression von E-Cadherin. Eine herunterregulierte Expression von E-Cadherin ist ein Schlüsselfaktor für die EMT und somit auch für die Metastasierung (Gregory et. al., 2008, Korpál et. al, 2008). Diaz-Riascos et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass einerseits miR-200a im Tumorgewebe von Pankreaskarzinompatienten vermehrt exprimiert wird, andererseits, dass diese Expression insbesondere von den duktalem Zellen erfolgt. Weiterhin zeigte diese Studie eine positive Korrelation zwischen der Expression der miR-200a und E-Cadherin, sowie eine negative Korrelation zwischen miR-200a und ZEB1 wie auch ZEB2. Diese Ergebnisse sprechen für eine Inhibierung der EMT durch miR-200a (Diaz-Riascos et. al., 2019). Ähnlich konnten Lu et. al. nachweisen, dass eine hohe Expression vom miR-200a in Pankreaskarzinom-Stammzellen in einer Runterregulation von ZEB1, sowie Hochregulation von E-Cadherin resultiert und somit Migration und Invasion hemmt (Lu et. al. 2014). Von Interesse ist, dass Li et. al. in ihrer Studie zeigten, dass in einigen Zelllinien trotz fehlender Expression von ZEB auch die E-Cadherin Expression vermindert war. Diese Ergebnisse sprechen dafür das die Expression von E-Cadherin auch auf andere Weise beim Pankreaskarzinom reguliert wird (Li et. al., 2010).

In meiner Studie konnte die Anreicherung der exosomalen miR-200a ebenfalls zwischen Patienten mit Pankreaskarzinom und Patienten mit chronischer Pankreatitis differenzieren. Jedoch in der Studie von Li et.al. zeigte sich kein Unterschied in der Expression der miR-200a zwischen Patienten mit Pankreaskarzinom und chronischer Pankreatitis (Li et. al., 2010). Diese Daten belegen schön, dass die Expression von miRNAs nichts mit dem Verpackungsmechanismus der miRNAs in die Exosomen zu tun hat, und dass unabhängig von ihrer Expression die miRNAs selektiv in Exosomen verpackt werden. Folglich wird der Wirkungsmechanismus der miRNAs durch beides, ihrer Expression und Verpackung in die Exosomen, kontrolliert.

Trotz signifikant erhöhtem Vorkommen der miRNA-483-5p in Exosomen von Patienten unter Chemotherapie mit Tumorremission zeigte unsere Analyse, dass diese miRNA als

Verlaufsp parameter für das Therapieansprechen nicht geeignet ist. Verglichen zum Ausgangswert vor der Chemotherapie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Niveaus dieser exosomalen miRNA im Verlauf der Chemotherapie, trotz Remission des Tumors. Eine Analyse der Korrelation zwischen CA 19-9 Wert und exosomaler Anreicherung der miR-483-5p zeigte keine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Parametern. Für miR-200a und miR-99a fand sich dagegen eine positive Korrelation mit CA 19-9, welche allerdings nach Ausschluss ungewöhnlicher Werte nicht mehr dargestellt werden konnte. Auch für miR-200a und miR-99a veränderte sich das exosomale Vorkommen im Verlauf der Chemotherapie nicht signifikant. Diese Ergebnisse sprechen zwar für ein erhöhtes Vorkommen der exosomalen miR-483-5p bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu Gesunden, aber sie scheint als Verlaufsp parameter beziehungsweise zur Detektion des Therapieansprechens nicht geeignet zu sein.

Zusammenfassend zeigen meine Daten eine selektive Verpackung von miR-483-5p, miR-200a und miR-99a in Exosomen von Patienten mit Pankreaskarzinom, Patienten mit Pankreatitis und gesunden Individuen. Im Vergleich zu Gesunden ist miR-483-5p signifikant in Exosomen von Patienten mit Pankreaskarzinom angereichert und eignet sich für die Detektion des Pankreaskarzinoms, aber nicht als Verlaufsp parameter, genauso gut wie die CA 19-9 Messungen. Die exosomale miR-200a kann signifikant zwischen Patienten mit Pankreaskarzinom und Patienten mit Pankreatitis differenzieren und ihre exosomale Niveaus in Patienten mit Pankreaskarzinom sind nur erhöht, wenn sie mit beiden Kohorten der Patienten mit Pankreatitis und gesunden Individuen verglichen wird.

In Zukunft sind weitere Studien notwendig, insbesondere mit einem größeren und homogeneren Patientenkollektiv, um meine Ergebnisse zu bestätigen. Auch interessant wäre es das Vorkommen dieser miRNAs in Exosomen mit dem Vorkommen der zellfreien miRNAs in der Blutzirkulation zu vergleichen, wie auch mit der Expression dieser miRNAs im Tumorgewebe, um zu analysieren, ob die Expression dieser miRNAs im Primärtumor mit der Ausschüttung der miRNAs in die Blutzirkulation oder der selektiven Verpackung dieser miRNAs in die Exosomen korreliert.

## 6. Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom gehört aufgrund seiner recht späten Diagnosestellung, des invasiven Wachstums und hohen Metastasierungspotentials zu den Krebserkrankungen mit einer sehr schlechten Prognose. Zu Zeit ist CA 19-9 der einzige validierte Biomarker für das Pankreaskarzinom. Jedoch ist er nicht spezifisch, und kann auch bei benignen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Leberzirrhose oder Pankreatitis, erhöht sein. Deshalb sind neue nicht-invasive Marker für die frühe Entdeckung des Pankreaskarzinoms, wie auch für die Untersuchung des Therapieansprechens nötig. Exosomale miRNAs könnten solche Marker werden, da ihre Expression häufig bei Tumorpatienten dereguliert ist. MiRNAs sind kleine, nicht-kodierende RNA Moleküle. Sie inhibieren die Proteinexpression ihrer Ziel-mRNAs und modulieren so wichtige Signalwege, die zur Transformation der Zellen führen kann. Sie werden entweder passiv durch Apoptose und Nekrose oder aktiv in Exosomen ins Blut befreit. Exosomen sind an der Zell-zu-Zell Kommunikation beteiligt, Sie transportieren u.a. miRNAs, von Zelle zu Zelle und sind so an der Tumorgenese, Progression und Metastasierung beteiligt.

Ziel dieser Arbeit war es, Veränderungen in den miRNA Spiegel in Exosomen im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Menschen zu untersuchen. Weiterhin sollte über Verlaufsmessungen während einer Chemotherapie die Dynamik der miRNA Niveaus in den Exosomen von Patienten mit Pankreaskarzinom gemessen werden.

Das Vorkommen von 45 miRNAs in Exosomen von 22 Patienten mit Pankreaskarzinom vor und während der Chemotherapie im Abstand von jeweils 4 Wochen (insgesamt 4 Serumproben pro Patient) und von jeweils 10 Gesunden und Patienten mit chronischer Pankreatitis wurden durch real-time PCR unter Verwendung von Arraykarten gemessen. Die erhaltenen Daten wurden statistisch mit den klinischen Parametern der Pankreaspatienten, sowie die Subgruppen miteinander verglichen.

Bei Patienten mit Pankreaskarzinom fand sich eine signifikante Anreicherung von miR-483-5p in Exosomen im Vergleich zu Gesunden, während die exosomale miR-200a fähig war, zwischen Patienten mit Pankreaskarzinom und Patienten mit Pankreatitis zu differenzieren. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Tumormarker CA 19-9 und miR-483-5p, allerdings eine positive Korrelation zwischen den CA 19-9 Werten und dem exosomalen Vorkommen von miR-200a sowie miR-99a. Eine Dynamik des Vorkommens dieser exosomalen miRNAs während der Chemotherapie zeigte sich nicht, wobei ihre Niveaus im Therapieverlauf relativ konstant blieben.

Meine Ergebnisse zeigen eine selektiv angereicherte Verpackung von miR-483-5p in Exosomen von Patienten mit Pankreaskarzinom. Da miRNAs von Zelle zu Zelle durch

Exosomen transportiert werden können, können sie möglicherweise ihre Gastzellen modulieren und so die Tumorprogression unterstützen. Auch das konstant angereicherte exosomale Vorkommen der miRNAs während der Chemotherapie könnte somit auf die schlechte Prognose dieser Patienten hinweisen.

## **Summary**

Due to the late diagnosis, invasive growth and high metastatic potential, pancreatic cancer is a tumor with one of the poorest outcomes. Actually, the tumor marker CA 19-9 is the only validated biomarker for pancreatic cancer. However, CA 19-9 is not specific and can also be elevated in benign diseases, for example liver cirrhosis or pancreatitis. Therefore, new non-invasive markers are necessary for early detection of pancreatic cancer as well as examination of the therapy response. MiRNAs could be such markers, because their expression is often deregulated in tumor patients. MiRNAs are small, non-coding RNA molecules. They are involved in inhibition of protein expression of their target mRNAs and so modulate important signaling pathways that may lead to cell transformation. They are released into the blood circulation either passively, by apoptosis or necrosis, or actively in exosomes. Exosomes are involved in cell-to-cell communication. They transport among other molecules miRNAs from cell to cell and therefore, are involved in tumorigenesis, progression and metastasis.

The aim of this study was to examine alterations of the miRNA levels in exosomes of patients suffering from pancreatic cancer compared to those of patients with chronic pancreatitis and healthy individuals. In addition, the dynamics of miRNA levels in the exosomes of patients with pancreatic carcinoma via course measurements during chemotherapy were planned to measure.

The occurrence of 45 miRNAs in exosomes of 22 patients with pancreatic carcinoma before and during chemotherapy at intervals of 4 weeks (a total of 4 serum samples per patient) and 10 healthy individuals and 10 patients with chronic pancreatitis were measured by real-time PCR using array cards. The data obtained were statistically compared with the clinical parameters of pancreatic cancer patients, as well as between the subgroups.

In patients with pancreatic cancer miR-483-5p was significantly enriched in exosomes compared with those of healthy individuals, whereas exosomal miR-200a was able to differ between patients with pancreatic cancer and patients with pancreatitis. No correlation between tumor marker CA 19-9 and miR-483-5 was found, but there was a positive correlation of the CA 19-9 values with the occurrence of miR-200a and miR-99a in exosomes. There was no significant dynamic response of miRNA occurrence during chemotherapy, and their exosomal levels remained constant.

My results show a selectively enriched packaging of miR-483-5p in exosomes of pancreatic patients. Since miRNAs can be transported from cell to cell by exosomes, they may be able to modulate their guest cells and thus, support tumor progression. The constant exosomal levels of these miRNAs during chemotherapy may point to the poor prognosis of these patients.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AGO	Argonaute family of protein
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CT	Computertomographie
DGCR8	Drosha and DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EMT	Epitheliale-mesenchymale-Transition
GLUT	Glucosetransporter
IGF	Insulin like growth factor
IGFR	Insulin like growth factor receptor
IPMN	Intraduktale muzinöse Neoplasie
HOXA1	HomeoboxA1
K-RAS	Kirsten rat sarkoma
MCN	Muzinöse zystische Neoplasie
miRISC	miRNA induced silencing complex
miRNA	micro Ribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MRCP	Magnetresonanztomographie mit Cholangiopankreatikographie
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MVP	Multivesikuläre Körper
NET	Neuroendokriner Tumor
PanIn	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
pre-miRNA	precursor-miRNA
pri-miRNA	primary-miRNA

RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RNA	Ribonukleinsäure
UICC	Union internationale contre le cancer
UTR	untranslatierter Bereich
WHO	World Health Organization
ZEB	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
5-FU	5-Fluoruracil

## 8. Referenzen

American Cancer Society (2019): Cancer Facts & Figures 2019. Atlanta: American Cancer Society [Online im Internet.] URL: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf> [Stand: 07.01.2020, 22:47]

Bailey, J., Hendley, A., Lafaro, K. et. al. (2016): p53 mutations cooperate with oncogenic Kras to promote adenocarcinoma from pancreatic ductal cells. *Oncogene* 35, 4282–4288.

Bartel DP (2004): MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* Volume 116, Issue 2, Pages 281-297.

Benson AB (2007): Adjuvant therapy for pancreatic cancer: one small step forward, *JAMA* 297(3):311-3.

Bergmann U, Funatomi H, Yokoyama M et. al. (1995): insulin-like growth factor I Overexpression in human pancreatic cancer: evidence for Autocrine and Paracrine roles. *Cancer Res.* 55, 2007-2011.

Berthois Y, Delfino C, Metellus P et al (2014): Differential expression of miR200a-3p and miR21 in grade II–III and grade IV gliomas. Evidence that miR200a-3p is regulated by O<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase and promotes temozolomide responsiveness. *Cancer Biol Ther.* 15(7): 938–950.

Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH et al (2010) WHO classification of tumours of the digestive system. 4. Aufl. World Health Organization (WHO), International Agency for Research on Cancer (IARC).

Brouwer-Visser J, Huang GS (2015): IGF2 signaling and regulation in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 26, 371–377.

Catalonotto C, Cogoni C, Zardo, G (2016): MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Function. *Int J Mol Sc.* 13;17(10)

Chouri E, Servaas N, Bekker C et. al. (2018) : Serum microRNA screening and functional studies reveal miR-483-5p as a potential driver of fibrosis in systemic sclerosis. *J Autoimmun.* 89:162-170

Corcoran C, Friel A, Duffy M et. al. (2011): Intracellular and Extracellular MicroRNAs in Breast Cancer. *Clinical Chemistry.* Volume 57, Issue 1, 18–32.

Costa JG, de Jesus VHF, Camandaroba MPG et. al. (2019) : Characteristics and survival of older patients with metastatic pancreatic cancer: a retrospective analysis of the AC Camargo Cancer Center experience. *Ther Adv Med Oncol.* 11: 1758835919874650. doi: 10.1177/1758835919874650

Cui H, Liu Y, Jiang J et. al. (2016): IGF2-derived miR-483 mediated oncofunction by suppressing DLC-1 and associated with colorectal cancer. *Oncotarget.* 26; 7(30)

Daoud A, Mulholland EJ, Cole G, McCarthy HO (2019): MicroRNAs in Pancreatic Cancer: biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators. *BMCCancer* 19:1130.

Decman A, Bancos I, Khanna A et. Al. (2019): Comparison of plasma and urinary microRNA-483-5p for the diagnosis of adrenocortical malignancy. *J Biotechnol.* 297:49-53.

Dhayat S, Mardin W, Seggewiß J et. al. (2015): MicroRNA Profiling Implies New Markers of Gemcitabine Chemoresistance in Mutant p53 Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS One.* 10(11): e0143755.

Diaz-Riascos ZV, Ginesta M, Fabregat J et. al. (2019): Expression and Role of MicroRNAs from the miR-200 Family in the Tumor Formation and Metastatic Propensity of Pancreatic Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* 17:491-503.

Di Magliano MP, Logsdon CD (2013) : Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. *Gastroenterology.* 144(6):1220-9.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J et. al. (2009): New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 45:228–47.

Ferrone CR, Marchegiani G, Hong T et. al. (2015): Radiological and surgical implications of neoadjuvant treatment with FOLFIRINOX for locally advanced and borderline resectable pancreatic cancer. *Ann Surg.* 261(1):12-7.

Gallmeier E, Gress TM (2018): Duktales Adenokarzinom des Pankreas. *Der Internist.* 59, 805-822.

Gallo W, Esguerra JLS, Eliasson L, Melander O (2018): miR-483-5p associates with obesity and insulin resistance and independently associates with new onset diabetes mellitus and cardiovascular disease. *PLoS One*; 13(11) : e0206974.

Gironella M, Seux M, Xie MJ et. al. (2007): Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(41): 16170–16175.

Glimelius B, Hoffman K, Sjöden PO et. al. (1996): Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol.* 7(6):593-600.

Gluszko A, Szczepanski M, Ludwig N et. al. (2019): Exosomes in Cancer: Circulating Immune-Related Biomarkers. *Biomed Res Int.* 2019: 1628029.

Gregory PA, Bert AG, Paterson EL et. al. (2008): The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 10(5):593-601.

Grobbelaar C, Ford AM (2019): The Role of MicroRNA in Paediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia: Challenges for Diagnosis and Therapy. *Journal of Oncology*, Volume 2019, Article ID 8941471.

Gurunathan S, Kang, MH, Jeyaraj M et. al. (2019): Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells.* 8 (4), 307

Hackert T, Sachsenmaier M, Hinz U et. al. (2016): Locally Advanced Pancreatic Cancer: Neoadjuvant Therapy With Folfirinox Results in Resectability in 60% of the Patients. *Ann Surg.* 264(3):457-63.

Pettersen Hessvik N, Llorente A (2018): Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci.* 75(2): 193–208.

Hu Y, Ou Y, Wu K et. al. (2012): miR-143 inhibits the metastasis of pancreatic cancer and an associated signaling pathway. *Tumour Biol.* 33(6):1863-70.

Ilic M, Ilic I (2016) Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 22(44): 9694–9705

Janssen QP, Buettner S, Suker M et. al. (2019): Neoadjuvant FOLFIRINOX in patients with borderline resectable pancreatic cancer: a systematic review and patient-level meta-analysis. *JNCI.* Volume 111 (8), 782–794.

Jiao LR, Frampton AE, Jacob J et. al. (2012): MicroRNAs Targeting Oncogenes Are Down-Regulated in Pancreatic Malignant Transformation from Benign Tumors. *PLoS One.* 7(2): e32068.

Jonas S und Izaurralde E (2015): Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics.* 16 (7), 421–433.

Kalluri R und Weinberg RA (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119 (6): 1420-1428

Kalluri, R (2016): The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest.* 126(4): 1208–1215.

Kang MJ, Jang JY, Chang YR, Kwon W et. al. (2014): Revisiting the concept of lymph node metastases of pancreatic head cancer: number of metastatic lymph nodes and lymph node ratio according to N stage. *Ann Surg Oncol.* 21(5):1545-51.

Kent OA, Mullendore M, Wentzel EA et. al. (2009): A resource for analysis of microRNA expression and function in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Biol Ther.* 8(21): 2013–2024.

Klimstra DS (2007): Nonductal neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol.* 20 Suppl 1:S94-112

Kloosterman WP und Plasterk R (2006): The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. *Developmental Cell* 11 (4), 441–450.

Kojima M, Sudo H, Kawauchi J et. al. (2015): MicroRNA Markers for the Diagnosis of Pancreatic and Biliary-Tract Cancers. *PLOS ONE.* 10 (2) : e0118220.

Korpál M, Eil B, Bufa F et. al. (2008): Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat Med.* 17(9): 1101–1108.

Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y et. al. (2010): Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. *J Biol Chem.* 285(23): 17442–17452.

Krämer-Albers, E, Frühbeis, C (2013): Lieferung auf Abruf: Exosomen als „Care“-Pakete von Gliazellen für gestresste Neurone. *NeuroForum* 04/13, 146

Kwan J, Psarianos P, Bruce JP et.al. (2016): The complexity of microRNAs in human cancer, *Journal of Radiation Research.* 57 Suppl 1, 106-111.

Lai X, Wang M, McElyea SD et. al. (2017): A microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 1. 393: 86–93

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75, 843–854.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2013): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, AWMF Registernummer: 032-010OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.ht>

Li A, Omura N, Hong SM et. al. (2010): Epigenetic silencing of transcription factor SIP1 in pancreatic cancer cells is associated with elevated expression and blood serum levels of microRNAs miR-200a,b, *Cancer Res.* 70(13): 5226–5237.

Lin J, Li J, Huang B et. al. (2015): Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *Scientific World Journal* Volume 2015.

Liu J, Gao K, Du Y et. al. (2012): Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *Int. J. Cancer.* 131, 683–691.

Liu M, Roth A, Yu M et. al. (2013): The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal promoters and enhances tumorigenesis. *Genes Dev.* 27(23): 2543–2548.

Liu Y, Ma Y, Zhang J et. al. (2019): Exosomes: A Novel Therapeutic Agent for Cartilage and Bone Tissue Regeneration. *Dose Response.* 17(4) :1559325819892702

Loosen SH, Neumann UP, Trautwein C et. al (2017): Current and future biomarkers for pancreatic adenocarcinoma. *Tumor Biology.* 39(6), 1-11.

- Lowenfels AB, Maisonneuve P (2006): Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 20(2):197-209.
- Lu Y, Lu J, Li X et. al. (2014): MiR-200a inhibits epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer stem cell. *BMC Cancer.* 14:85
- Madhavan B, Yue S, Galli U et. al. (2015): Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *Int. J. Cancer.* 136 (11), 2616–2627.
- Mahsa S, Jalal R, Ahmadian MR (2019): From basic researches to new achievements in therapeutic strategies of KRAS-driven cancers. *Cancer Biol Med.* 16(3): 435–461.
- Matszyama H, Suzuki HI (2019): Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 24;21(1).
- McAndrews K, Kalluri R (2019) : Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer. *Mol Cancer.* 18: 52.
- Mohan R, Mao Y, Zhang S et. al. (2015): Differentially Expressed MicroRNA-483 Confers Distinct Functions in Pancreatic  $\beta$ - and  $\alpha$ -Cells. *J Biol Chem.* 290(32): 19955–19966.
- Maia J, Caja S, Moraes M et. al. (2018): Exosome-Based Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment, *Front. Cell Dev. Biol,* Vol. 6, Art. 18
- Melo S, Sugimoto H, O`Connell J et. al. (2014): Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell.* 26(5), 707–72.
- Melo S, Luecke L, Kahlert C et. al. (2015): Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* volume 523, 177–182.
- Miyame M, Komatsu S, Ichikawa D et. al. (2015): Plasma microRNA profiles: identification of miR-744 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 113(10):1467-76.
- Neoptolemos JP, Palmer D, Ghaneh P et. al. (2017): Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet.* 389:1011-24.

- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y et. al. (2018): Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinology*, 3;9:402.
- Oken MM, Creech RH, Tormey DC et. al. (1985): Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 5(6):649-55.
- Olson SH, Kurtz RC (2013): Epidemiology of pancreatic cancer and the role of family history. *J Surg Oncol*.107(1):1-7.
- Palmer KR, Kerr M, Knowles G et. al. (1994): Chemotherapy prolongs survival in inoperable pancreatic carcinoma. *Br J Surg*. 81(6):882-5
- Park JK et. al. (2009): Antisense inhibition of microRNA-21 or -221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma, *Pancreas*. 38(7): e190-9.
- Pelzer U, Schwaner I, Stieler J et. al. (2011): Best supportive care (BSC) versus oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (OFF) plus BSC in patients for second-line advanced pancreatic cancer: a phase III-study from the German CONKO-study group, *Eur J Cancer*. 47(11):1676-81.
- Rawat M, Kadian K, Gupta Y et. al. (2019): MicroRNA in Pancreatic Cancer: From Biology to Therapeutic Potential. *Genes (Basel)*. 10(10): 752.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). (2019) *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 12. Ausgabe, Berlin.
- Roth C, Rack B, Müller V et. al. (2010) : Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.*;12(6):R90.
- Saliani M, Jalal R, Ahmadian MR (2019): From basic researches to new achievements in therapeutic strategies of KRAS-driven cancers. *Cancer Biol Med*. 16(3):435-461.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U (Hrsg.) et.al. (2014): *Prometheus, Innere Organe*, Thieme, 2014, S. 216.
- Schwarzenbach H, Nishida N, Calin G et.al. (2014): Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*.11(3):145-56.
- Schwarzenbach H (2015): The clinical relevance of circulating, exosomal miRNAs as biomarkers for cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 15:9, 1159-1169.

Schwarzenbach,H, Gahan, P (2019): MicroRNA Shuttle from Cell-To-Cell by Exosomes and Its Impact in Cancer. *Non-Coding RNA*, 5(1), 28.

Shao B, Wang X, Zhang L et. al. (2019): Plasma microRNAs Predict Chemoresistance in Patients With Metastatic Breast Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*; 18: 1-9.

Silbernagel S, Pape HP, Kurtz A (Hrsg.) (2005): *Physiologie*. Thieme Verlag, 5. überarbeitete Auflage, S. 437

Stroese AJ, Ullerich H, Koehler G et. al. (2018): Circulating microRNA-99 family as liquid biopsy marker in pancreatic adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 144, 2377-2390.

Tang S, Chen Y, Yi T et. al. (2017): MiR-483-5p promotes IGF-II transcription and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 8(59), 1-18.

Thery C, Zitvogel L, Amigorena S (2002): Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. *Nature*. 2, 569-579.

Urbanelli L, Magini A, Brozzi A et. al. (2013): Signaling Pathways in Exosomes Biogenesis, Secretion and Fate. *Genes*. 4(2), 152-170.

Valadi H, Ekström K, Bossios A et.al. (2007): Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*. 9 (6), 654–659.

Villarroya-Beltri C, Gutierrez-Vazquez, C, Sanchez-Cabo Fet. al. (2013): Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*. 4:2980.

Wang Y, Xu YM, Zou YQ et. al. (2017): Identification of differential expressed PE exosomal miRNA in lung adenocarcinoma, tuberculosis, and other benign lesions. *Medicine (Baltimore)*;96(44): e8361.

Warnecke-Eberz U, Chon SH, Hölscher AH et. al. (2015): Exosomal onco-miRs from serum of patients with adenocarcinoma of the esophagus: comparison of miRNA profiles of exosomes and matching tumor. *Tumour Biol*. 36(6): 4643-53.

WHO (2018) [Online im Internet.] URL: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/13-pancreas-fact-sheet.pdf> [Stand 07.01.2020, 22:47]

- Winter JM, Brennan MF, Tang LH et. al. (2012): Survival after Resection of Pancreatic Adenocarcinoma: Results from a Single Institution over Three Decades. *Ann Surg Oncol* 19(1):169–175.
- Wittekind C (Hrsg.). *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. 8. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH, 2017.
- Xu L, Yuan X, Ni J et. al. (2019): Gain of microRNA-103 triggers metastatic behavior by targeting ubiquitin specific peptidase 10 in pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 12(4):1214-1223.
- Xu XL, Guo AX, Pan QY et. al. (2019): MiR-99a suppresses cell migration and invasion by regulating IGF1R in gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 23(17):7375-7382.
- Yachida S, Iacobuzio-Donahue C (2009) The Pathology and Genetics of Metastatic Pancreatic Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 133(3),413-422.
- Yu S, Lu Z, Liu C et. al. (2010): miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 70(14):6015-25.
- Zarkavelis G, Kotoula V, Koliou GA et. al. (2019): Genetic mapping of pancreatic cancer by targeted next-generation sequencing in a cohort of patients managed with nab-paclitaxel-based chemotherapy or agents targeting the EGFR axis: a retrospective analysis of the Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG). *ESMO Open*. 4(5)
- Zhang Y, Yang J, Li H et. al. (2015): Tumor markers CA19-9, CA242 and CEA in the diagnosis of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 8(7), 11683–11691.
- Zhang J, Li S, Li L et. al. (2015): Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 13(1): 17–24.
- Zhang L, Liu XL, Yuan Z et. al. (2019): MiR-99a suppressed cell proliferation and invasion by directly targeting HOXA1 through regulation of the AKT/mTOR signaling pathway and EMT in ovarian cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 23(11):4663-4672.
- Zhu P, Liu J, Lu M et. al. (2019): Influence and mechanism of miR-99a suppressing development of colorectal cancer (CRC) with diabetes mellitus (DM). *Onco Targets Ther*. 12: 10311–10321.
- Ziljstra A, di Vizio D (2018): Size matters in nanoscale communication. *Nat Cell Biol*. ;20(3):228-230.

## 9. Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Pankreas .....	2
Abbildung 2: Anzahl der Krebs-Neuerkrankungen und Krebs-Todesfälle weltweit .....	3
Abbildung 3: Karzinogenese beim PDAC.....	4
Abbildung 4: Klassifikation extrazellulärer Vesikel (EV) nach Grösse.....	10
Abbildung 5: Mechanismus der Freisetzung von Mikrovesikeln, Exosomen und Apoptotischen Körpern .....	11
Abbildung 6: Gen-Silencing durch miRNAs.....	13
Abbildung 7: Biosynthese der miRNA und Exosomen-Shuttle von Zelle zu Zelle .....	14
Abbildung 8: Mechanismus der Befreiung der miRNA in die Blutzirkulation .....	15
Abbildung 9: Freies Hämoglobin in den Serumproben .....	26
Abbildung 10: Hierarchische Clusteranalyse mittels Heatmap von 47 miRNAs .....	27
Abbildung 11: miRNA Vorkommen bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu Gesunden und Patienten mit chronischer Pankreatitis .....	29
Abbildung 12: Korrelation CA 19-9 mit exosomalen Niveaus von miR-483-5p, miR-200a und miR-99a .....	31
Abbildung 13: miRNA Vorkommen bei Patienten mit Pankreaskarzinom und Remission unter Chemotherapie im Vergleich zu Gesunden und Patienten mit chronischer Pankreatitis.....	32
Abbildung 14: miR-483-5p Vorkommen im zeitlichen Verlauf bei Patienten mit Pankreaskarzinom .....	33
Abbildung 15: miR-483-5p Vorkommen im zeitlichen Verlauf bei Patienten mit Pankreaskarzinom und Remission unter Chemotherapie.....	34

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:TNM Klassifikation des Pankreaskarzinoms .....	5
Tabelle 2:UICC/AJCC Tumorstadien .....	5
Tabelle 3: ECOG Performance Status .....	9
Tabelle 4: Demographische und klinische Eigenschaften der Studienpopulation .....	25
Tabelle 5: Signifikant dysregulierte exosomale miRNAs im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich mit Gesunden bzw. Patienten mit chronischer Pankreatitis.....	30

## 10. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Pantel danken, Leiter des Instituts für Tumorbiologie, Universitätsklinikum Eppendorf, für die Möglichkeit, meine Promotion an dem unter seiner Leitung stehenden Institut durchführen zu können.

Mein besonderer Dank geht an Frau PD Dr. Heidi Schwarzenbach für ihre ausgezeichnete Betreuung, die guten Ratschläge und die Hilfe bei der Auswertung und Abfassung der Arbeit. Weiterhin ihrer MTA Bettina Steinbach und ihrer ehemaligen Labormitarbeiterin Ines Stevic, welche mich in die Mysterien der Laborarbeit eingearbeitet haben und immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Vielen Dank auch an meine «Twinsa» Sara Lange. Die Arbeit mit Dir hat unglaublich viel Spaß gemacht.

Zu guter Letzt danke ich insbesondere meiner fantastischen Familie. Meinem Vater Prof. Dr. Rainer Klapdor, welcher mich mein Leben lang in allen Bereichen immer großartig unterstützt hat, mir einen sehr guten Einblick in die klinische Betreuung von Patienten mit Pankreaskarzinom und entsprechend wichtige Anregungen für meine Doktorarbeit gegeben hat. Meinen Brüdern Rüdiger Klapdor und Friedrich Ewald Klapdor, die einfach immer da sind, wenn ich sie brauche.

## 11. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## **12. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....