

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin  
Institut für Tumorbilogie

Prof. Dr. med. Klaus Pantel

## **Exosomales Vorkommen von miR-483, miR-99a und miR-27a bei Patienten mit Pankreaskarzinom unter einer Chemotherapie**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Sara Lange  
aus Karl-Marx-Stadt

Hamburg 2020

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: **30.03.2021**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: **Prof. Dr. Christian Kubisch**

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: **Priv.-Doz. Dr. Heidi Schwarzenbach**

<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Pankreas	2
1.2 Pankreaskarzinom	3
1.2.1 Klassifikation	3
1.2.2 Epidemiologie	5
1.2.3 Ätiologie	7
1.2.4 Klinisches Bild	7
1.2.5 Diagnostik	8
1.2.6 Therapie	9
1.2.6.1 Operation	10
1.2.6.2 Chemotherapie	13
1.3 Exosomen	16
1.3.1 Biogenese der Exosomen	17
1.3.2 Funktion von Exosomen	19
1.3.3 Exosomen in der Tumorbiologie	20
1.4 MiRNA	21
1.4.1 Biogenese und Funktion der miRNAs	21
1.4.2 Befreiung der miRNAs in die Blutzirkulation	24
1.4.3 MiRNAs bei Tumorpatienten	25
1.5 Ziel der Arbeit	27
<b>2 Materialien</b>	28
2.1 Blutproben	28
2.2 Kits	28
2.3 Puffer und Lösungen	28
2.4 Antikörper	31
2.5 Synthetische Oligonukleotide	31
2.5.1 Zu untersuchende miRNAs	31
2.6 Geräte	32

<b>3 Methoden</b>	33
3.1 Studienpopulation	33
3.2 Überprüfung der Serumproben auf Hämolyse	34
3.3 Exosomenisolation aus den Serumproben	34
3.4 Proteinanalyse	35
3.4.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	35
3.4.2 Western Blot	36
3.4.3 Immundetektion (Western Blot)	37
3.5 Extraktion der miRNAs	38
3.6 Konversion der miRNAs in cDNA	39
3.7 Preamplifikation der cDNA	40
3.8 MiRNA Expression	41
3.9 Normalisierung der Daten und statistische Analyse	41
<b>4 Ergebnisse</b>	43
4.1 Patienten	43
4.2 Hämolyse	45
4.3 Western Blot	46
4.4 Quantifizierung der exosomalen miR-483, miR-99a und miR-27a innerhalb der beiden Patientengruppen und bei gesunden Teilnehmern	47
4.5 Korrelation der exosomalen miR-483, miR-99a und miR-27a mit den klinisch-pathologischen Merkmalen der Patienten mit Pankreaskarzinom	48
4.6 Exosomale Niveaus der miR-483, miR-99a und miR-27a in Abhängigkeit vom Therapieverlauf	49
4.7 Korrelation der exosomalen miR-483, miR-99a und miR-27a mit den laborchemischen Parametern	52
4.8 Verlauf der Biomarker unter Chemotherapie	53
<b>5 Diskussion</b>	55
<b>6 Zusammenfassung</b>	60
<b>7 Abstract</b>	62

<b>8 Abkürzungsverzeichnis</b>	64
<b>9 Abbildungsverzeichnis</b>	69
<b>10 Tabellenverzeichnis</b>	71
<b>11 Referenzen</b>	72
<b>12 Danksagung</b>	82
<b>13 Lebenslauf</b>	83
<b>14 Eidesstattliche Versicherung</b>	84

# 1 Einleitung

Das Pankreaskarzinom ist eine maligne Tumorerkrankung, welche noch immer mit einer sehr schlechten Prognose einhergeht. Gründe hierfür sind eine späte klinische Manifestation, hohe Aggressivität und Metastasierungsrate sowie fehlende Screeninginstrumente. Die 5-Jahres Überlebensrate liegt abhängig vom Tumorstadium bei 10 - 30 % für Tumore im Anfangsstadium (Kang et al., 2014) beziehungsweise etwa 3 % für Tumore im fortgeschrittenen Stadium (American Cancer Society, 2019). Die einzige Möglichkeit, Patienten mit einem Pankreaskarzinom zu heilen, ist momentan die komplette Resektion des Tumors (R0-Resektion). Jedoch können derzeit nur etwa 20 % der Patienten, die an einem Pankreaskarzinom erkrankt sind, einer kurativen Operation zugeführt werden (Benson, 2007). Ein Fokus der aktuellen Forschung liegt auf der Suche nach Biomarkern, welche im Rahmen des Screenings als prognostischer Parameter sowie gegebenenfalls im Rahmen einer zielgerichteten Therapie eingesetzt werden können. Hierbei könnten mikroRNAs (miRNAs) eine entscheidende Rolle spielen. Diese sind kleine, nicht-kodierende RNA-Abschnitte, welche in der Regulation der transkriptionellen Expression von großer Bedeutung sind (Roth et al., 2010).

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression der miR-483, miR-99a und miR-27a bei Patienten mit Pankreaskarzinom zu untersuchen. Die Analyse geschieht im Vergleich zu Gesunden und Patienten mit einer chronischen Pankreatitis. Weiterhin wird die Expression dieser miRNAs im Verlauf einer Chemotherapie untersucht, um zu bestimmen, inwiefern sie als Verlaufsparemeter beim Pankreaskarzinom geeignet sind.

## 1.1 Pankreas

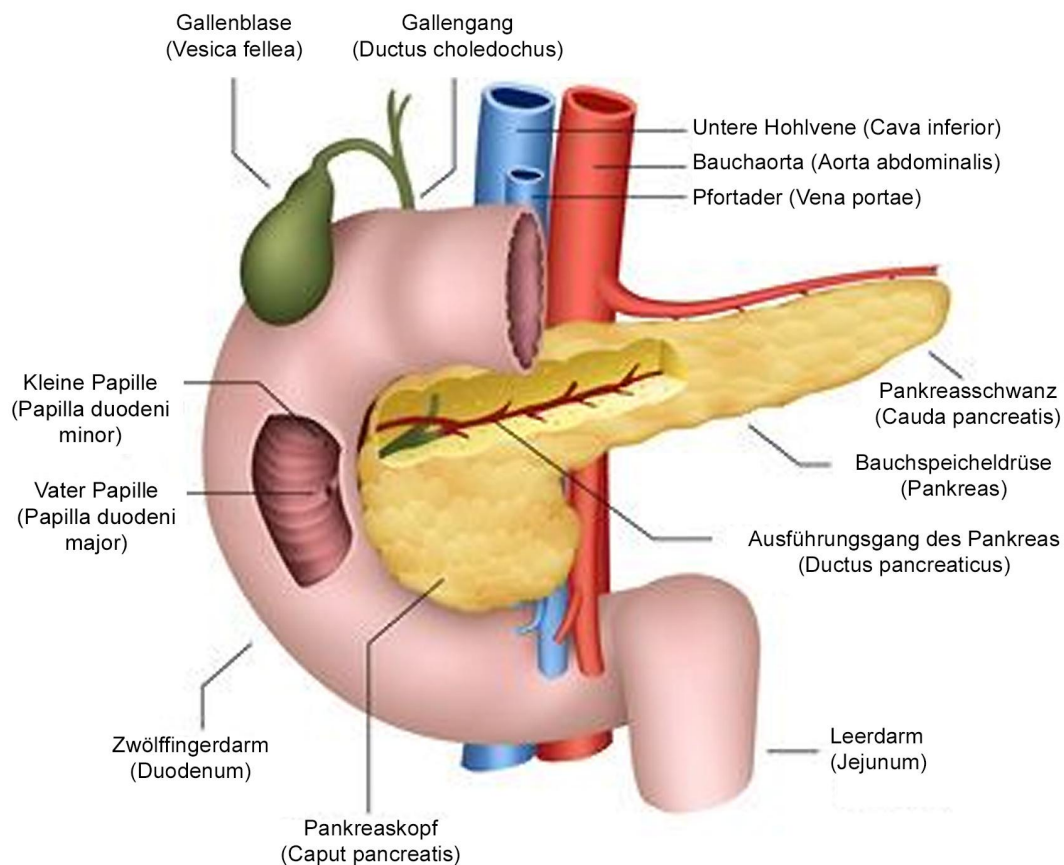


Abbildung 1: **Anatomie des Pankreas** (nach © bilderzweg - fotolia.com)

Das Pankreas ist eine retroperitoneal gelegene Drüse und grenzt an Magen, Milz und Nieren. Es ist mit dem Duodenum über den einmündenden Ductus pancreaticus verbunden. Über diesen werden die von den Azinuszellen produzierten und über die Gangepithelien sezernierten Verdauungsenzyme in das Duodenum abgegeben (Siewert et al., 2006). Aus diesem exokrinen (nach außen abgebenden) Organanteil entstehen je nach Literatur etwa 85 - 95 % der Karzinome (Birth et al., 2010). Die im Pankreas gelegenen Langerhans-Inseln produzieren Hormone wie Insulin oder Glukagon und geben diese schließlich ins Blut (endokrin) ab. Die prozentual geringe Anzahl der Tumore aus dem endokrinen Organanteil werden zu den neuroendokrinen Tumoren gezählt und sind nicht Inhalt dieser Arbeit. Das Pankreas wird unterteilt in Kopf, Körper und Schwanz. Im Kopf entstehen 65 %, im Körper 15 % und im Schwanz 10 % der Tumore (Reißfelder

et al., 2008). Da, wie in Abbildung 1 zu sehen ist, eine räumliche Nähe des Pankreas zur Aorta, dem Truncus coeliacus, der Arteria mesenterica superior, der Arteria lienalis sowie der Vena cava inferior und der Vena portae besteht, kommt es zur frühen Invasion des Tumors in das peripankreatische Gewebe. Oft liegt schon früh eine prognostisch ungünstige perineurale Infiltration vor (Siewert et al., 2006).

## **1.2 Pankreaskarzinom**

### **1.2.1 Klassifikation**

Wie in Tabelle 1 dargestellt, erfolgt die histologische Einteilung des Pankreaskarzinoms anhand der TNM-Klassifikation (Wittekind, 2017). Basierend auf dieser TNM-Klassifikation erfolgt die Einteilung laut der Union internationale contre le cancer (UICC) in die UICC-Stadien (Tabelle 2). Das UICC-Stadium ist letztlich prognosebestimmend. Diese Einteilung gilt allerdings nicht für sogenannte neuroendokrine Tumore (NET).



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

Primärtumor	
T1	Tumor begrenzt auf Pankreas
a	≤ 0,5 cm
b	≤ 1 cm
c	≤ 2 cm
T2	Tumor begrenzt auf Pankreas > 2 cm
T3	Tumor begrenzt auf Pankreas > 4 cm
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus, Arteria hepatica oder Arteria mesenterica superior
regionale Lymphknoten	
N0	kein positiver Lymphknoten von mindestens 12 resezierten Lymphknoten
N1	1 - 3 positive Lymphknoten / 12 resezierten Lymphknoten
N2	≥ 4 positive Lymphknoten / 12 resezierten Lymphknoten
Metastasen	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

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

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

## 1.2.2 Epidemiologie

Die Anzahl an Neuerkrankungen unterschieden sich im Jahr 2016 geschlechtsspezifisch kaum (3,9 % bei Frauen und 3,6 % bei Männern). Für Frauen liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 76 Jahren und für Männer bei 72 Jahren. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen war das Pankreaskarzinom mit etwa 8 % an Position 4 aller Krebssterbefälle (Robert-Koch-Institut, 2019).

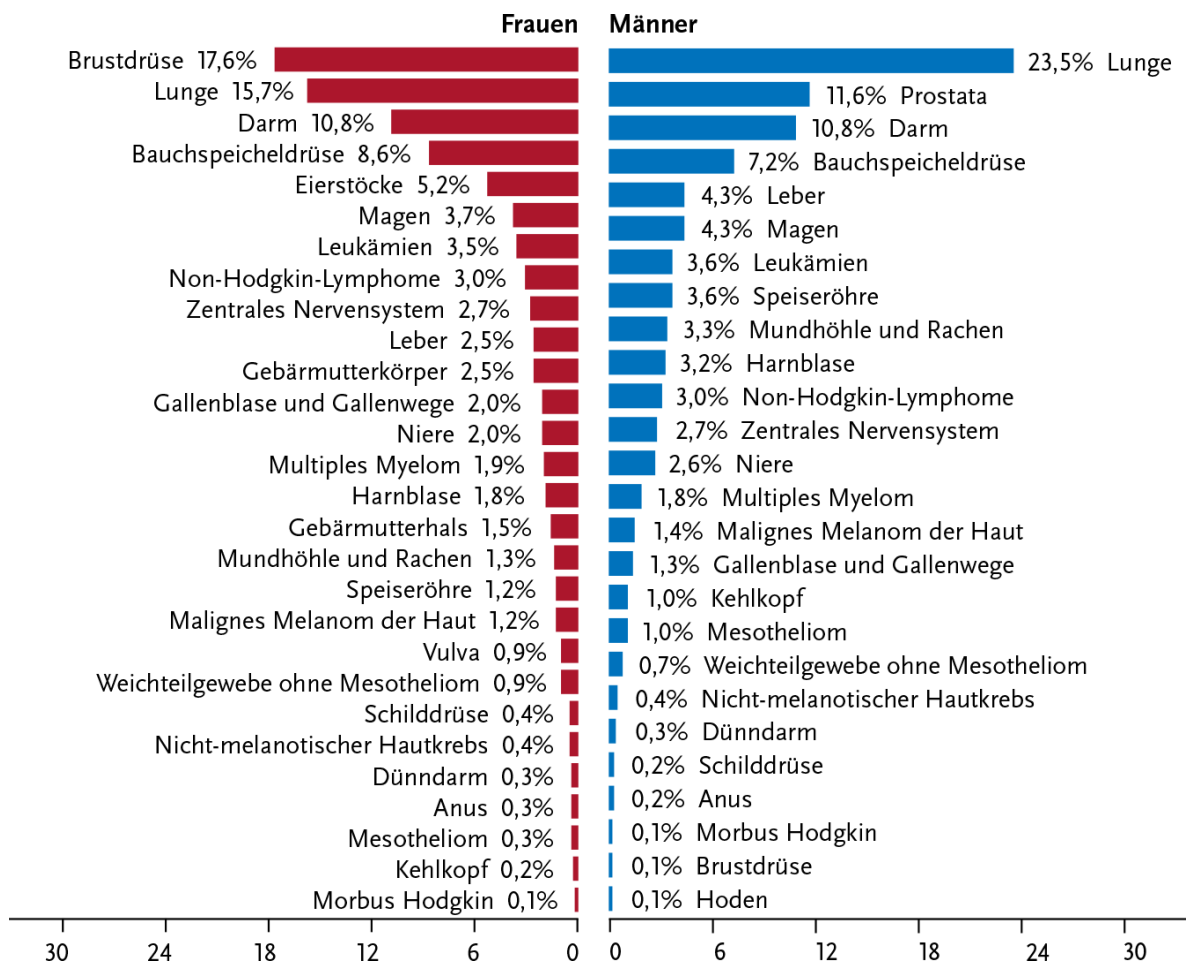


Abbildung 2: **Prozentualer Anteil der häufigsten Krebssterbefälle bei Frauen und Männern in Deutschland 2016** (Robert-Koch-Institut, 2019)

Die ungünstige Prognose des Pankreaskarzinoms lässt sich anhand der hohen Anzahl verstorbener Menschen von 16.000 bei einer Anzahl von 18.400 Neuerkrankten im Jahr 2016 in Deutschland bereits erahnen. Dementsprechend wies das Pankreaskarzinom nach dem Mesotheliom die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf.

Die Überlebensrate für das Pankreaskarzinom liegt für beide Geschlechter nach 5 Jahren bei nur 9 % (Robert-Koch-Institut, 2019).

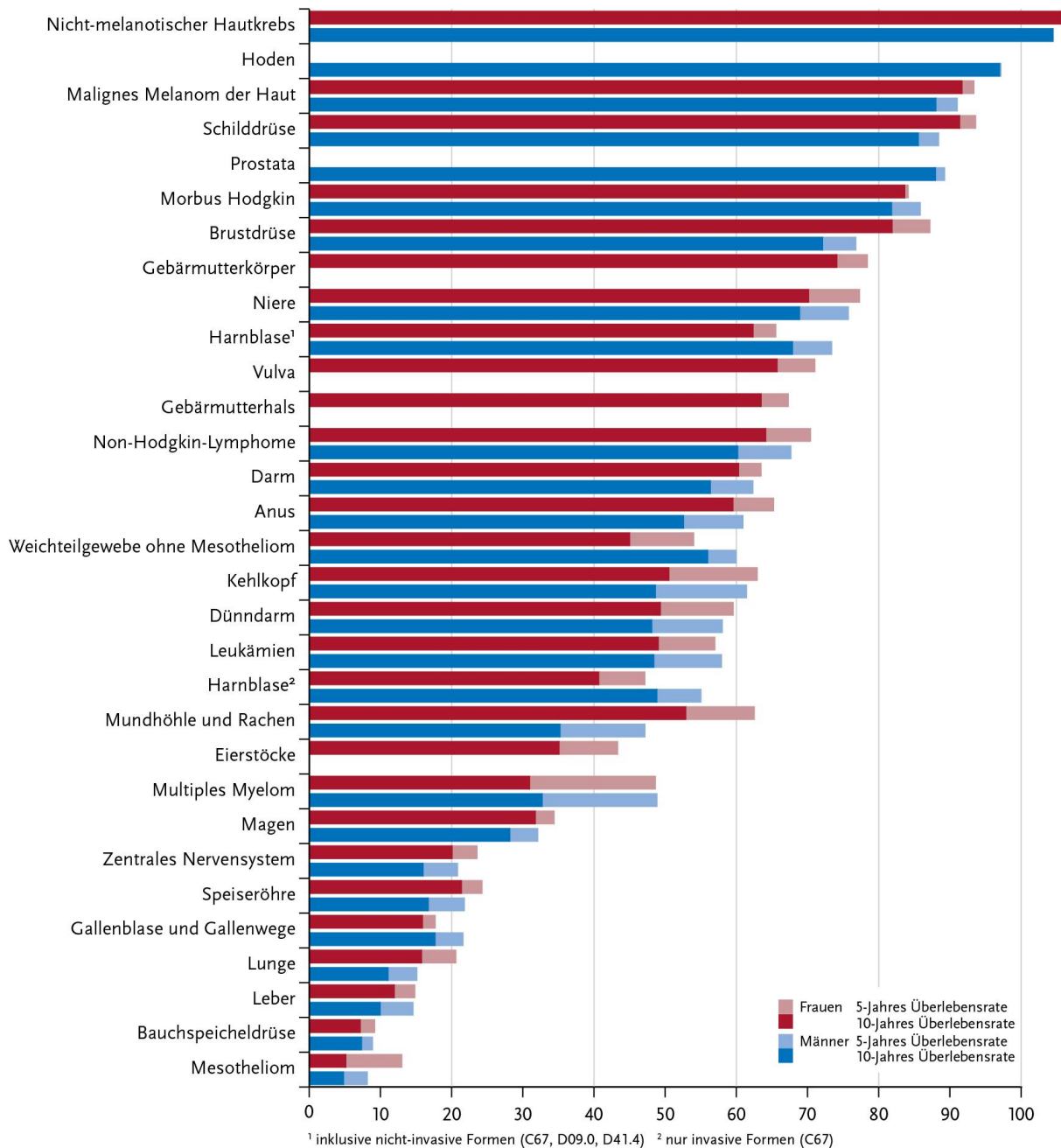


Abbildung 3: **Vergleich der Überlebensrate nach Lokalisation und Geschlecht, Deutschland 2015 - 2016** (Robert Koch-Institut, 2019)

### **1.2.3 Ätiologie**

Die Entstehungsmechanismen des Pankreaskarzinoms sind derzeit nicht abschließend geklärt. Gesichert sind in etwa eine Aktivierung des KRAS-Onkogen sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Reißfelder et al., 2008). Hinter einer familiären Häufung bei Verwandten 1. Grades könnten zum einen erbliche Faktoren wie eine BRCA-2-Mutation stecken, aber auch ein ähnlicher Lebensstil wäre denkbar. Hierbei spielt insbesondere das Rauchen als gesicherter Risikofaktor eine große Rolle. Ebenso wirken sich ein sehr hoher Alkoholkonsum und ein häufiger Verzehr von verarbeiteten Fleischwaren oder geräucherten Speisen negativ aus. Erkrankungen wie Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und eine chronische Pankreatitis können unter anderem aus einem gerade beschriebenen Lebensstil hervorgehen, erhöhen aber ebenfalls das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Des Weiteren werden Infektionen mit *Helicobacter pylori*, Hepatitis B oder auch HIV mit der Entstehung in Verbindung gebracht und Schadstoffe wie Pestizide, Herbizide und Fungizide, aber auch Chromverbindungen oder elektromagnetische Felder stehen in der Diskussion (Robert-Koch-Institut, 2019).

### **1.2.4 Klinisches Bild**

In der Regel verursacht das Pankreaskarzinom keine beziehungsweise eher unspezifische Frühsymptome, wie Appetitlosigkeit oder Verdauungsstörungen. Erst durch die Infiltration in das umliegende Gewebe kommt es beispielsweise zu Rücken- oder epigastrischen Schmerzen. Ein im fortgeschrittenen Stadium auftretendes typisches Erstsymptom ist ein schmerzloser Ikterus. Dieses Symptom entsteht durch eine tumorbedingte Abflussbehinderung des Ductus choledochus, welcher durch den Pankreaskopf zieht. Zur Ausbildung von Thrombosen kann es zum einen lokal bedingt durch eine Druckerhöhung auf die umliegenden Gefäße, aber auch im Rahmen eines paraneoplastischen Syndroms in entfernten Venen kommen. Sehr früh kommt es bereits

zur hepatischen Metastasierung, wodurch es unter anderem zu Symptomen eines portalen Hypertonus wie Aszites kommen kann (Siewert et al., 2006).

### 1.2.5 Diagnostik

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine Empfehlung bezüglich Screeningmethoden bei asymptomatischen Patienten in der Normalbevölkerung. Eine schnelle Diagnosestellung ist aus den oben genannten Gründen jedoch enorm wichtig und womöglich entscheidend für das Gesamtüberleben der Betroffenen. Besteht der Verdacht auf ein Pankreaskarzinom sollte nach Alter und Symptomen der Verdachtsgrad wie in der Tabelle 3 ermittelt und die entsprechenden diagnostischen Mittel eingeleitet werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

Tabelle 3: **Alter- und Verdachtsgradadaptiertes diagnostisches Vorgehen bei neu aufgetretenen Oberbauch- und Rückenschmerzen** (nach Leitlinienprogramm Onkologie, 2013)

Verdachtsgrad	Alter (Jahre)	Symptome	Vorgehen
Niedrig	< 50	nur Schmerz <sup>1</sup>	Sonographie bei Symptompersistenz
Mittel	< 50	Schmerz plus <sup>2</sup>	Sonographie, ggf. CT
	> 50	nur Schmerz <sup>1</sup>	Sonographie, ggf. CT
		Schmerz plus <sup>2</sup>	Sonographie, ggf. CT
Hoch	> 50	Schmerz plus <sup>2</sup>	Sonographie, ggf. CT / Endosonographie

<sup>1</sup> Neu aufgetretene Schmerzen, die lokalisiert/gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen und nachts wahrnehmbar sind, bedürfen altersunabhängig individuell einer weiteren Abklärung. Bei hohem Verdachtsgrad, ggf. auch bei negativer Sonographie, sollte eine komplementäre CT oder Endosonographie eingesetzt werden.

<sup>2</sup> Schmerz plus andere Symptome (Inappetenz, Gewichtsverlust, Schwäche)

Bildgebenden Verfahren wie die Abdomensonographie, Endosonographie und 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 in Kombination mit MRCP. Ist ein Tumor mittels Bildgebung diagnostiziert worden, empfehlen die Leitlinien die Bestimmung des Tumormarkers CA 19-9 (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Jedoch kann der Tumormarker CA 19-9 auch unter anderen Bedingungen, wie zum Beispiel bei einer Leberzirrhose oder bei einer Pankreatitis, erhöht sein. Für das duktales Pankreaskarzinom scheint CA 19-9 mit einer Sensitivität von 75,5 % und einer Spezifität von 77,6 % somit kein optimaler Screeningmarker zu sein (Loosen et al., 2017). Zur Beurteilung der systemischen Tumorausbreitung sind die Abdomensonographie sowie ein Röntgen-Thorax obligat, da Fernmetastasen meistens in der Leber, als Peritonealkarzinose oder etwas seltener in der Lunge auftreten. Weitere Untersuchungen wie die abdominelle Multidetektor-Computertomographie, eine Computertomographie des Thorax oder auch die Magnetresonanztomographie sind fakultativ einzusetzen. Im Falle einer Resektabilität des diagnostizierten Tumors, die durch die bildgebende Diagnostik beurteilt wird, empfehlen die Leitlinien keine vorherige Biopsie des Tumors. Ist der Tumor fortgeschritten und eine kurative Operation nicht mehr möglich, wird die Gewinnung von Tumorgewebe mittels Endosonographie empfohlen, um eine optimale zielgerichtete Tumorthherapie gewährleisten zu können (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

### **1.2.6 Therapie**

Für das therapeutische Vorgehen bei einem Pankreaskarzinom ist prinzipiell die Unterteilung in die Kategorien resektabler Tumor, lokal fortgeschrittener Tumor, lokal nicht mehr resektabler Tumor und das Vorliegen von Fernmetastasen bedeutsam (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

### 1.2.6.1 Operation

Laut der geltenden S3-Leitlinie gilt die operative Therapie noch immer als einzige Therapie mit einem potentiell kurativen Ansatz und somit sollten Patienten mit resektabel eingeschätztem Pankreaskarzinom einer Operation zugeführt werden. Grundvoraussetzung hierfür ist jedoch, dass keine Fernmetastasen vorhanden sind. Das Ziel der chirurgischen Therapie ist die vollständige Entfernung des Tumorgewebes im umliegend tumorfreien Gewebe (R0-Resektion) und bedeutet, dass an den Resektionsrändern keine Tumorzellen nachgewiesen werden dürfen (Tabelle 4). Für eine intraoperative Sicherung kann eine Schnellschnittuntersuchung eingeholt werden. Hierbei findet eine Begutachtung der Resektionsränder durch Pathologen bereits während der laufenden Operation statt. Ergibt sich die Notwendigkeit einer Nachresektion kann sich somit die Anzahl der kurativ resezierten Pankreaskarzinome erhöhen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

Tabelle 4: **Einteilung des Residualtumors (R) nach Tumorresektion** (nach Adzersen, 2010)

Residualtumor	
R0	Resektion des Tumors mit einer Manschette von gesundem Gewebe in allen Bereichen.
R1	Resektion des Tumors, der makroskopisch vollständig entfernt wurde, mikroskopisch jedoch den Schnitttrand erreicht.
R2	Der Tumor wurde nicht vollständig entfernt. Auch makroskopisch bleibt noch erkennbar Tumorgewebe zurück.

Trotz lokal fortgeschrittenem Primärtumor kann es zum Teil möglich sein kurativ zu operieren. Insbesondere im Fall einer Infiltration von venösen Gefäßen, wie zum Beispiel der Vena mesenterica superior, der Vena portae oder der Vena lienalis, ist eine en bloc Resektion möglich und sollte kein Ausschlusskriterium sein. Liegt dagegen eine Infiltration von arteriellen Gefäßen vor, zum Beispiel des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior, wird von einer Tumorresektion aufgrund der perioperativ hohen

Morbidität und Mortalität durch die Leitlinien abgeraten. Die Wahl des chirurgischen Verfahrens ist abhängig von der Lokalisation des Tumors innerhalb des Pankreas. Ein Tumor im Bereich des Pankreaskopfs wird in der Regel über eine klassische Whipple-Operation beziehungsweise eine pyloruserhaltende Duodenopankreatektomie reseziert. Sollte es zu einer Tumorausbreitung nach links kommen, kann eine totale Pankreatektomie notwendig sein. Eine Pankreaslinksresektion in Kombination mit einer Splenektomie wird bei einer Lokalisation des Tumors im Körper oder Schwanz durchgeführt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Bei initial nicht resezierbarem Befund ohne Fernmetastasen kann eine neoadjuvante Chemotherapie erfolgen. In Studien von Hackert et al. und Palmer et al. konnten 60 % der initial palliativen Patienten im Anschluss an die neoadjuvanten Therapie einer kurativen Tumorsektion zugeführt werden (Hackert et al., 2016; Palmer et al., 1994).



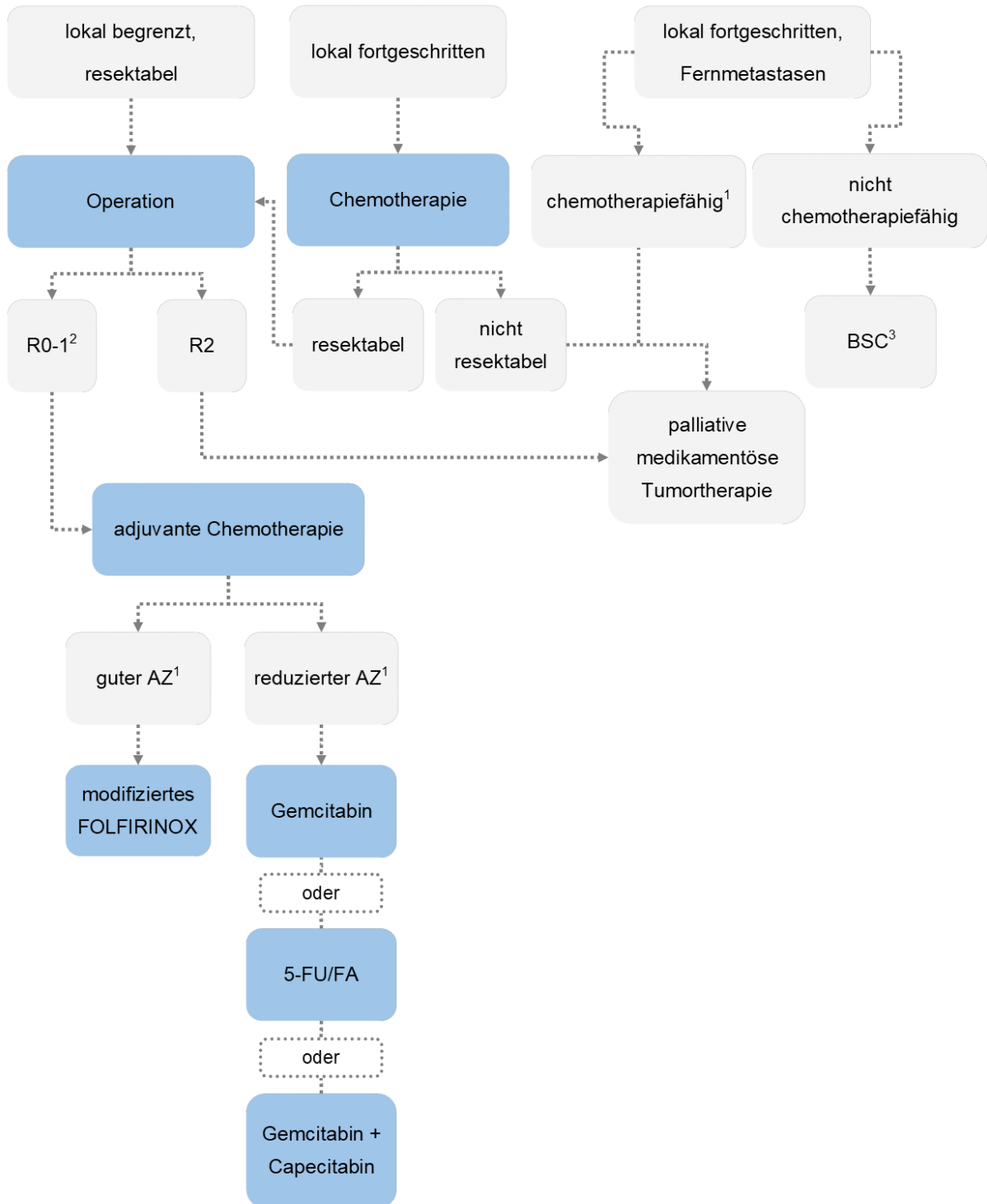


Abbildung 4: **Therapiestruktur beim Adenokarzinom des Pankreas**

<sup>1</sup> Beurteilung nach AZ = Allgemeinzustand; <sup>2</sup> R = Klassifikation des Zustands nach chirurgischer Resektion des Primärtumors; <sup>3</sup> BSC = Best Supportive Care (modifiziert nach Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018)

### 1.2.6.2 Chemotherapie

Nach erfolgter R0-Resektion soll laut Leitlinie eine adjuvante Chemotherapie wenn möglich spätestens sechs Wochen postoperativ begonnen werden. Empfohlen wird eine adjuvante Monotherapie mit Gemcitabin oder 5-Fluorouracil (5-FU)/Folinsäure für mindestens 6 Monate. Bei einer R1-Resektion soll eine additive Chemotherapie über sechs Monate durchgeführt werden. Die adjuvante Chemotherapie sollte nur bei Patienten die sich noch selbständig versorgen können, also mit einem ECOG-Performance Status von 0 - 2 (Tabelle 5), erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

Tabelle 5: **Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status**

ECOG-Status	
0	normal, Aktivität ohne Einschränkungen wie vor der Erkrankung
1	ambulant, kann sich selbst versorgen, Einschränkungen bei anstrengenden körperlichen Aktivitäten, leichte Haus- oder Büroarbeit möglich
2	ambulant, tagsüber mobil in mehr als 50 % der Zeit, kann sich selbst versorgen, nicht arbeitsfähig
3	> 50 % der Zeit bettlägerig, pflegebedürftig
4	bettlägerig, stationäre Behandlung erforderlich
5	Tod

Auch in palliativen Situationen, also bei bestehenden Fernmetastasen oder nicht mehr zu resezierenden Tumoren, ist eine Chemotherapie empfohlen, um eine längere Lebensdauer mit einer besseren Lebensqualität zu erreichen. Diesbezüglich nimmt die Leitlinie Bezug auf Studien von Palmer et al. und Glimelius et al., in welchen sich das mittlere Überleben von 15 auf 33 Wochen verlängerte, wenn die Patienten eine palliative Chemotherapie erhielten (Palmer et al., 1994; Glimelius et al., 1996). Therapie der Wahl ist auch hier laut Leitlinie eine Monotherapie mit Gemcitabin oder bei Patienten mit einem

ECOG-Status 0 oder 1 und einem Alter < 75 Jahren eine Kombinationstherapie mit 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX). Eine Kombination mit dem EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Erlotinib ist auch möglich. Im Fall des Nichtansprechens des Tumors unter der Erstlinientherapie wird eine Umstellung der Therapie auf 5-FU und Oxaliplatin empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Als die Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) im Jahr 2013 erschien, gab es bereits Studien bezüglich einer neuen Kombinationstherapie, welche jedoch noch keine Zulassung in Deutschland hatten und somit nicht in die Leitlinie aufgenommen werden konnten. Es handelt sich dabei um die Kombination aus nab-Paclitaxel mit Gemcitabin. Unter dieser Kombination konnte die Remissionsrate von 7 % unter einer Monotherapie mit Gemcitabin auf 23 % bei palliativen Patienten gesteigert werden (Tehfe et al., 2016). In der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. aus dem Jahr 2018 ist diese Therapie implementiert (Abbildung 5).

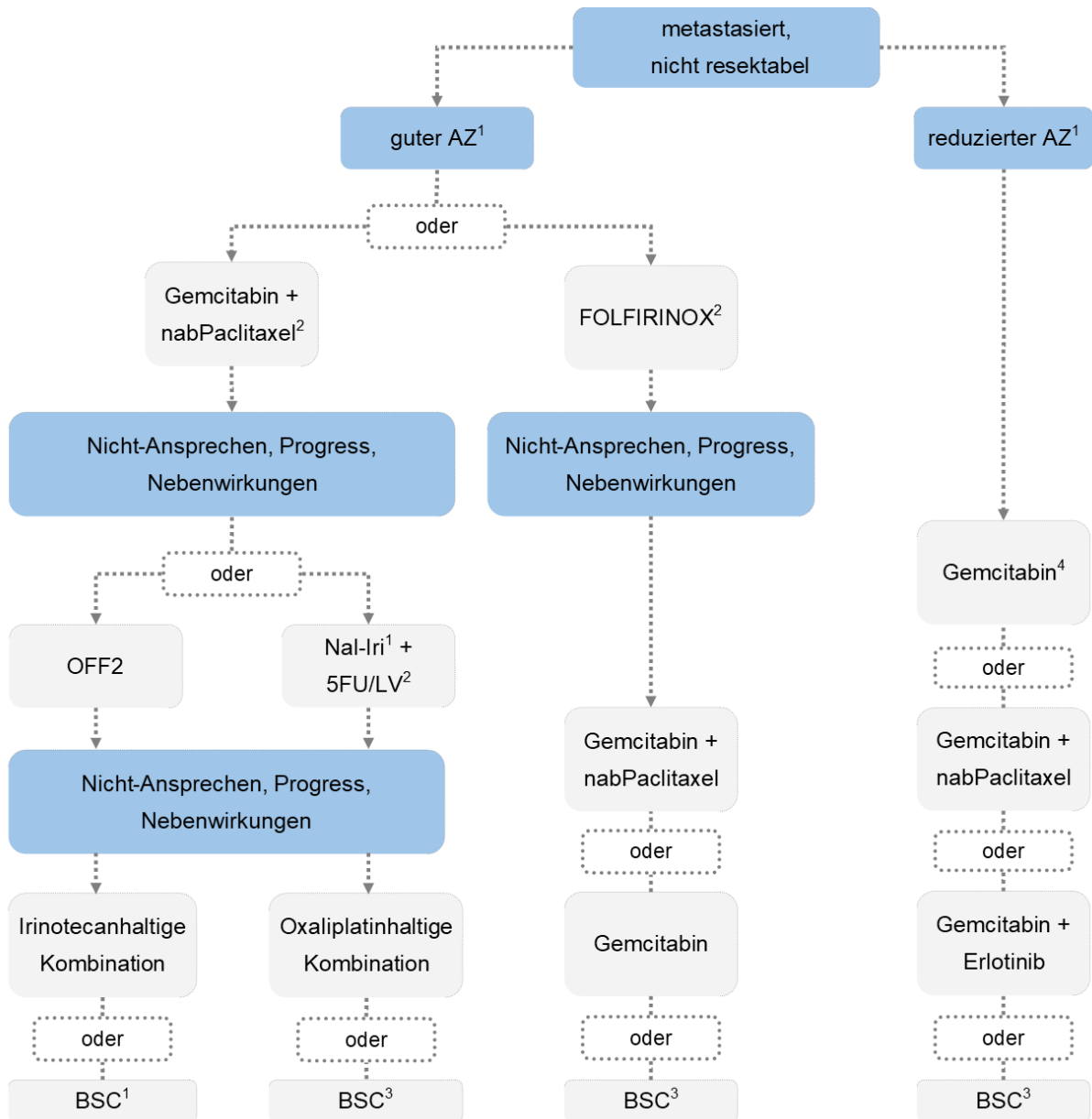


Abbildung 5: **Algorithmus für die palliative medikamentöse Tumorthherapie**

<sup>1</sup> Beurteilung nach AZ = Allgemeinzustand; <sup>2</sup> medikamentöse Tumorthherapie: BSC – Best Supportive Care; <sup>3</sup> BSC = Best Supportive Care; <sup>4</sup> Symptomlinderung möglich, keine Verlängerung der Überlebenszeit

FOLFIRINOX = 5-Fluorouracil, Folinsäure, Irinotecan, Oxaliplatin; nab-Paclitaxel = an Albumin-Nanopartikel gebundenes Paclitaxel; nal-Irinotecan = nanoliposomales Irinotecan;

OFF = 5-Fluorouracil, Folinsäure, Oxaliplatin (modifiziert nach Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018)

### 1.3 Exosomen

Exosomen gehören zu der Gruppe extrazellulärer Vesikel und sind mit einer Größe von etwa 50-130 nm in etwa so groß wie Viren. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Eigenschaften der verschiedenen extrazellulären Vesikel. Sie werden von diversen Zellen wie Thrombozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen, aber auch Tumorzellen gebildet. Durch Einschnürung der Zellmembran werden Moleküle der Ursprungszelle wie Proteine, DNA und RNA in Exosomen abgegeben. Sie werden in verschiedensten Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Speichel oder auch Aszites nachgewiesen und sind in interzellulären Signalkaskaden involviert (Lin et al., 2015). Insbesondere der Inhalt der Exosomen in Patienten kann die Krankheitslast und das Ansprechen der Therapie widerspiegeln. Somit dürfen Exosomen zukünftig in der Diagnostik bestimmter Erkrankungen, wie auch als prädiktive und therapeutische Moleküle, eine Rolle spielen. Hierfür ist auch die Stabilität der Exosomen von Vorteil. Bedingt durch die doppelwandige Lipidschicht können Exosomen bei 4 °C bis zu 96 Stunden unbeschadet aufbewahrt werden (Kahlert et al., 2015).

Tabelle 6: **Übersicht der Eigenschaften extrazellulärer Vesikel**

	Exosomen	Mikrovesikel	Apoptotische Körperchen
Größe	50 - 130 nm	100 - 1000 nm	500 - 4000 nm
Entstehung	Einstülpung der Endosomenmembran	Ausstülpung der Zellmembran	Abschnürung ganzer Zellteile
Inhalte	Lipide, mRNA, miRNA, Proteine (Rezeptoren, Tetraspanine, Zytokine u.a.)		Lipide, Organellen, DNA, Histone u.a.

### **1.3.1 Biogenese der Exosomen**

Exosomen haben ihren Ursprung innerhalb der Zellen im endosomalen System. Mittels clathrinvermittelter Endozytose werden zunächst Proteine der Zelloberfläche aufgenommen. Die entstandenen endozytotischen Vesikel bilden dann durch Reifungsprozesse die frühen und schließlich die späten Endosomen. Durch vielfache Einstülpungen der Endosomenmembran entstehen die intraluminalen Vesikel (ILVs) innerhalb der späten Endosomen. Es werden einerseits Proteine in die invaginierende Membran der ILVs eingebaut und andererseits zytosolische Komponenten in den ILVs eingeschlossen. Im weiteren Verlauf werden die späten Endosomen teilweise durch Lysosomen wieder abgebaut oder sie reifen zu großen multivesikulären Körpern (MVB). Durch die Fusion der MVBs mit der Plasmamembran werden die ILVs in den extrazellulären Raum ausgeschüttet. Die freigesetzten Vesikel werden als Exosomen bezeichnet (Hessvik et al., 2018; Keller, 2009).

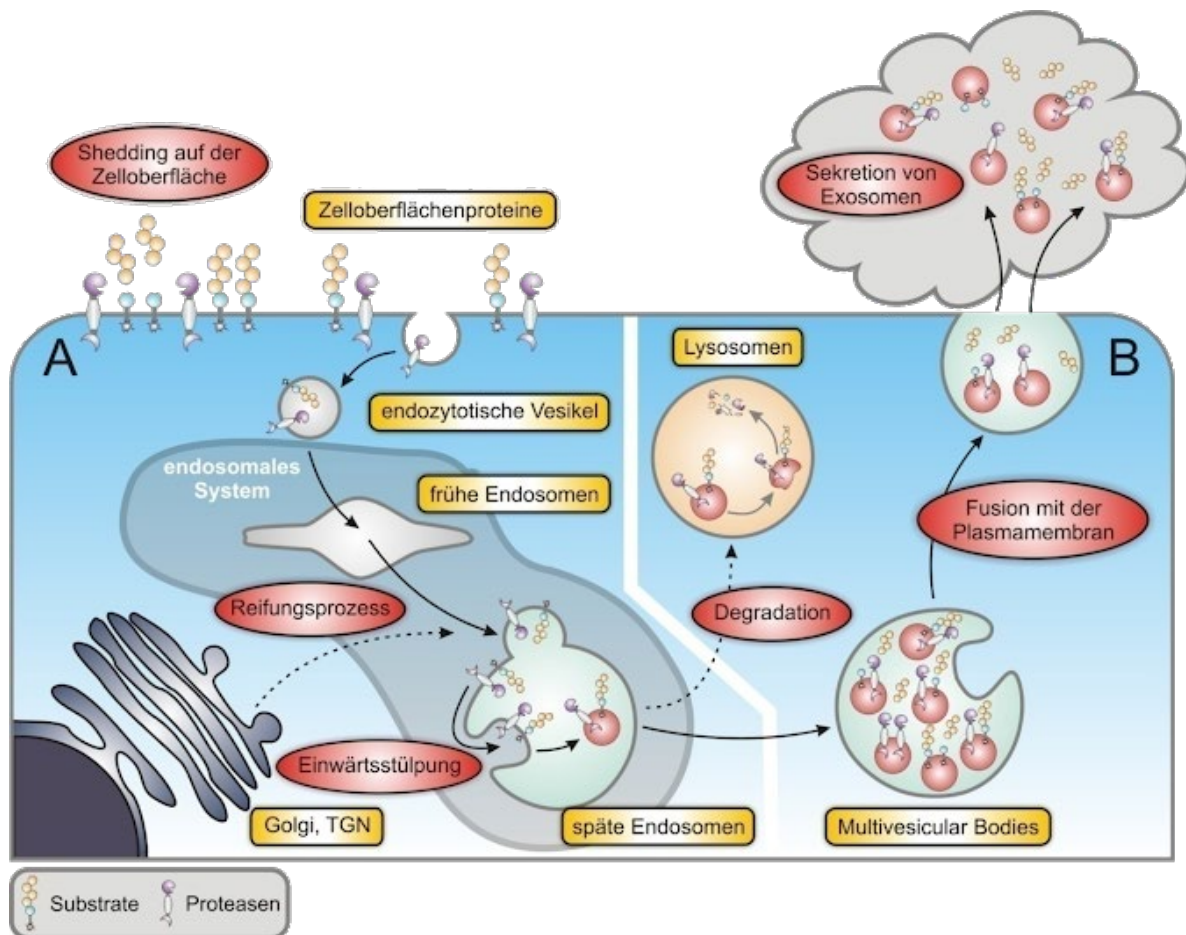


Abbildung 6: **Schematische Darstellung der Biogenese von Exosomen**

A: Zelloberflächenproteine werden durch clathrinvermittelte Endozytose in endozytotische Vesikel aufgenommen. Diese reifen zu frühen Endosomen. Während der Reifung der frühen zu späten Endosomen kommt es zusätzlich zu einer Aufnahme von neu synthetisierten Proteinen aus dem Golgi-Apparat bzw. dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). In den späten Endosomen kommt es zur Einwärtsstülpung der Membran und der damit verbundenen Anreicherung von intraluminalen Vesikeln (ILVs).

B: Die späten Endosomen können verschiedene Stoffwechselwege einschlagen. Durch Fusion mit Lysosomen können die Inhalte der Endosomen proteolytisch abgebaut werden. Kommt es zur weiteren Anreicherung von ILVs, so entstehen aus den späten Endosomen die Multivesicular-Bodies. Durch Fusion mit der Plasmamembran werden die ILVs freigesetzt und fortan als Exosomen bezeichnet (nach Keller, 2009).

### **1.3.2 Funktion von Exosomen**

Exosomen sind an der Zell-zu-Zell-Kommunikation beteiligt und können den Geno- wie auch den Phänotyp ihrer Zielzelle verändern. Nach der Befreiung der Exosomen in den extrazellulären Raum migrieren sie zu einer benachbarten oder entfernten Zelle. Durch Verschmelzen der Exosomenmembran mit der Zytoplasmamembran dieser Zielzelle werden exosomale Proteine zu Bestandteilen der Zelloberfläche. Auf diese Weise ist es möglich, Rezeptoren interzellulär zu transferieren. Des Weiteren können Proteine und Nukleinsäuren in die Zielzelle transportiert werden, welche dann die Proteinexpression und Signalwege innerhalb der Zelle beeinflussen und schließlich zu veränderten Zellfunktionen führen. Ebenso können Exosomen mittels Liganden an Rezeptoren der Zielzelle binden und somit die Signalkaskaden direkt stimulieren. Die besonderen Wirkungsweisen sind von den Ursprungszellen abhängig. Zum Beispiel sind Exosomen, welche von immunkompetenten dendritischen Zellen sezerniert werden, an der Regulation der Immunantwort beteiligt.



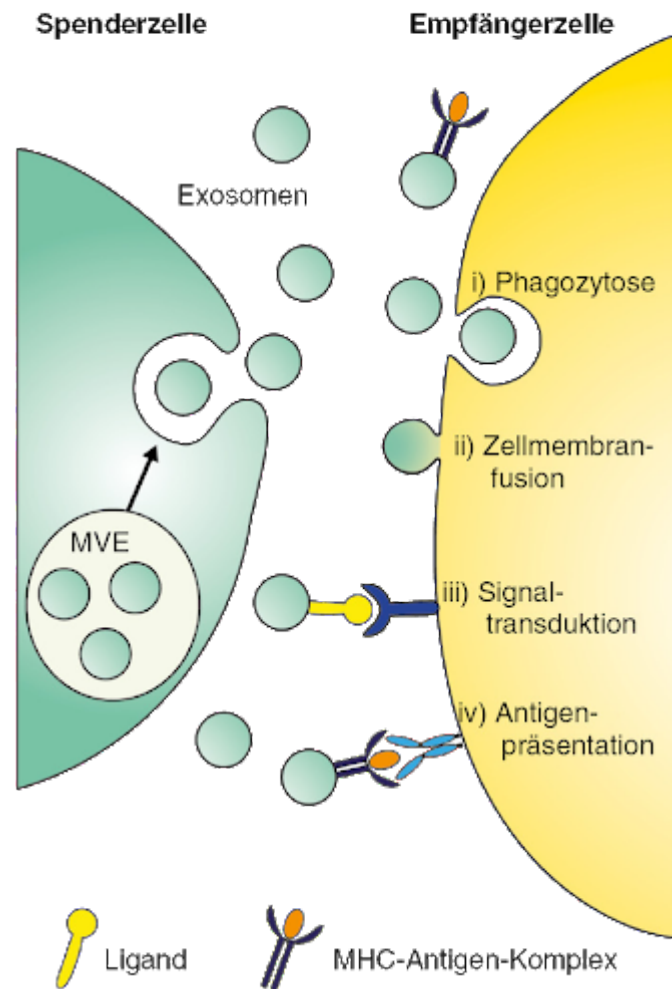


Abbildung 7: **Extrazelluläre Vesikel können auf verschiedenen Wegen die Empfängerzelle beeinflussen.** Sie verschmelzen mit der Empfängerzelle durch Phagozytose (i) oder Zellmembranfusion (ii). Sie können auch an Oberflächenrezeptoren (iii) binden und direkt die Signalkaskade aktivieren. Eine weitere Funktion ist die Antigenpräsentation, indem sie an den MHC-Antigen-Komplex binden (nach Reiners et al., 2017).

### 1.3.3 Exosomen in der Tumorbilogie

Neben der physiologischen Bedeutung sind Exosomen an der Pathogenese maligner Erkrankungen beteiligt. Sie beeinflussen das Wachstum, die Metastasierung sowie immunologische Prozesse und haben somit Einfluss auf die Tumorprogression (Maia et

al., 2018). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten vermehrt Exosomen ausschütten und es hierdurch zu einer Steigerung der Motilität von Tumorzellen und in Folge zu einem beschleunigten Tumorwachstum kam (Luga et al., 2012). Insgesamt betrachtet gibt es Hinweise, dass die Exosomenniveaus im Blut von Patienten mit malignen Erkrankungen im Vergleich zu Gesunden erhöht sind und ihr Kargo verändert ist. Studien wiesen auf ein dereguliertes Vorkommen von miRNAs in Exosomen von malignen Zellen im Vergleich zu gesunden Zellen hin. Anhand dieser Erkenntnisse verdeutlicht sich das mögliche therapeutische und diagnostische Potential von Exosomen (Melo et al., 2014; Kalluri, 2016).

## **1.4 MiRNA**

Erstmals wurde in den 90er Jahren der Nachweis von miRNAs erbracht (Lee et. al., 1993). Sie wurde initial als small temporal RNA bezeichnet. Dem Namen entsprechend gehören sie zu den kurzkettigen RNAs und bestehen aus nur 18 - 25 Nukleotiden. MiRNAs gehören zu der Gruppe der nicht-kodierenden RNAs und machen lediglich etwa 1 - 2 % des menschlichen Genoms aus. Trotz des scheinbar geringen Anteils sind sie mit ihrer regulatorischen Funktion an nahezu allen zellulären Prozessen beteiligt (Bartel et al., 2004). Sie regulieren unter anderem Prozesse wie etwa die posttranskriptionelle Genexpression oder auch die Apoptose (Kloostermann et al., 2006). Veränderungen in der Expression der miRNAs sind mit der Entstehung verschiedener Krankheiten wie auch der Tumorentstehung assoziiert und bieten zukünftig möglicherweise einen Ansatz zielgerichteter Tumorthherapie (Roth et al., 2010).

### **1.4.1 Biogenese und Funktion der miRNAs**

MiRNAs wie auch alle anderen RNAs werden von der DNA im Zellkern transkribiert. Das durch den Enzymkomplex Polymerase II entstandene Transkript wird als pri-miRNA (primary miRNA) bezeichnet (Borchert et al., 2006). Aus dieser pri-miRNA wird noch im

Zellkern mittels eines weiteren enzymatischen Komplexes, der RNase III "Drosha" und dem Protein DGCR8 (DiGeorge Critical Region 8), die Vorläufer-miRNA pre-miRNA (precursor miRNA) geschnitten (Han et al., 2006). Diese pre-miRNA wird mit Hilfe von Exportin 5 (XPO5) aktiv aus dem Zellkern ins Zytoplasma geschleust. Im Zytoplasma befindet sich die RNase III "Dicer", welche aus der pre-miRNA kurze doppelsträngige Fragmente schneidet (Lund et al., 2004). Diese reifen miRNA-Stränge binden an Argonautenproteine (AGO). Der an AGO gebundene miRNA-Strang wird als Leitstrang bezeichnet und verbleibt als Komplex, während der komplementäre Strang abgebaut wird. Der Komplex aus AGO und miRNA-Leitstrang bindet an den RNA-induzierten silencing complex (RISC) und bildet somit den miRNA-induzierten silencing complex (miRISC). Sind die Sequenzen der im RISC gebundenen miRNA komplementär zu der in der 3'-untranslatierten Region (3' UTR) ihrer Ziel-mRNA, wird die mRNA gespalten und somit eine Translation verhindert. Hierbei führt eine partielle Komplementarität zur translationalen Repression oder zur Deadenylierung, wodurch die Translation gestört wird. Eine vollständige Komplementarität wird durch AGO 2 katalysiert und bewirkt einen vollständigen Abbau der Ziel-mRNA (Guo et al., 2010).

Neben der inhibitorischen Funktion haben miRNAs auch eine stimulierende Funktion in der Genexpression. Hierbei kommt es zu einer Bindung der miRNA an die Promotorregion des Gens und daraus folgend zur Aktivierung der Genexpression. MiRNAs können die Expression verschiedener Zielgene, wie zum Beispiel von Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, Signalproteinen und Transportern regulieren (John et al., 2004). Damit einhergehend beeinflussen miRNAs zelluläre Prozesse wie etwa die Apoptose, Differenzierung aber auch die Proliferation (Catalonotto et al., 2016; Bartel et al., 2004).

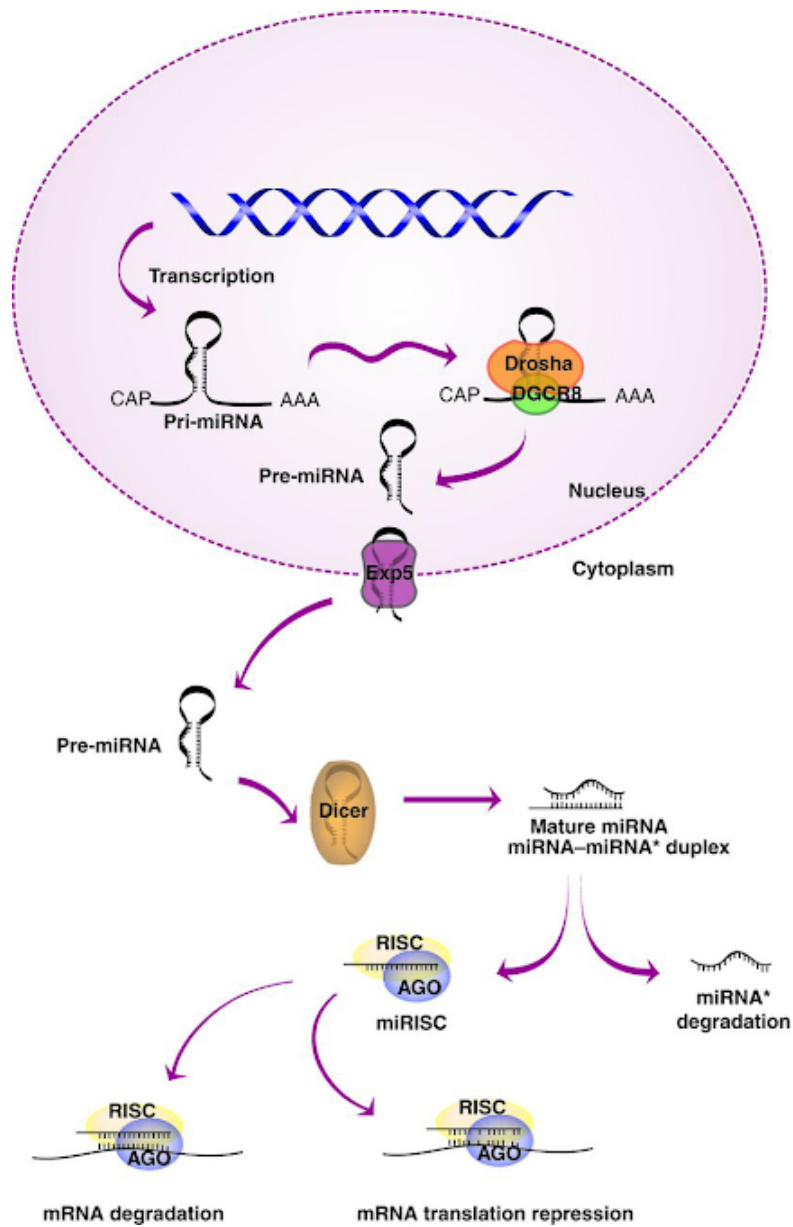


Abbildung 8: **Biogenese und Funktion der miRNAs**

MiRNAs werden zuerst als lange primäre Transkripte (pri-miRNAs) im Kern transkribiert und später von Drosha und dem Cofaktor DGCR8 in die pre-miRNA geschnitten. Über Exportin 5 wird die pre-miRNA ins Zytoplasma geschleust und von Dicer zu einer reifen doppelsträngigen miRNA synthetisiert. Der RNA-induzierte Silencing-Komplex (RISC) rekrutiert den miRNA-Leitstrang, welcher an einem Argonautenprotein (AGO) gebunden ist. Der komplementäre miRNA-Strang wird abgebaut. Abhängig von der miRNA-mRNA-Komplementarität baut die miRNA die Ziel-mRNA ab oder hemmt deren Translation (nach Gámez et al., 2014).

### 1.4.2 Befreiung der miRNAs in die Blutzirkulation

MiRNAs werden durch verschiedene Mechanismen in die Blutzirkulation ausgeschüttet. Einerseits werden sie zusammen mit Zellbestandteilen im Rahmen eines programmierten Zelltods (Apoptose) freigesetzt. Hierbei entstehen fragmentierte Zellreste und apoptotische Körper, einschließlich RNA-Transkripte und kurze DNA-Fragmente. Im Fall des eher zufällig ablaufenden Zelltods (Nekrose) werden lange DNA-Stränge befreit. Sowohl die von apoptotischen als auch die von nekrotischen Zellen freigesetzten RNA-Transkripte bilden Komplexe mit spezifischen RNA-bindenden Proteinen. Diesbezüglich komplexieren miRNAs mit dem AGO2-Protein. Neben den eben beschriebenen passiven Prozessen der Freisetzung von miRNAs in die Blutbahn gibt es auch eine aktive Sekretion. Hierbei verschmelzen multivesikuläre Körper mit der Plasmamembran der Zellen und geben somit einen Teil der intrazellulär gebildeten miRNAs, die ebenfalls an Proteinkomplexe gebunden sind, in extrazellulären Vesikeln wie etwa den Exosomen in ihre Umgebung ab (Schwarzenbach et al., 2014).

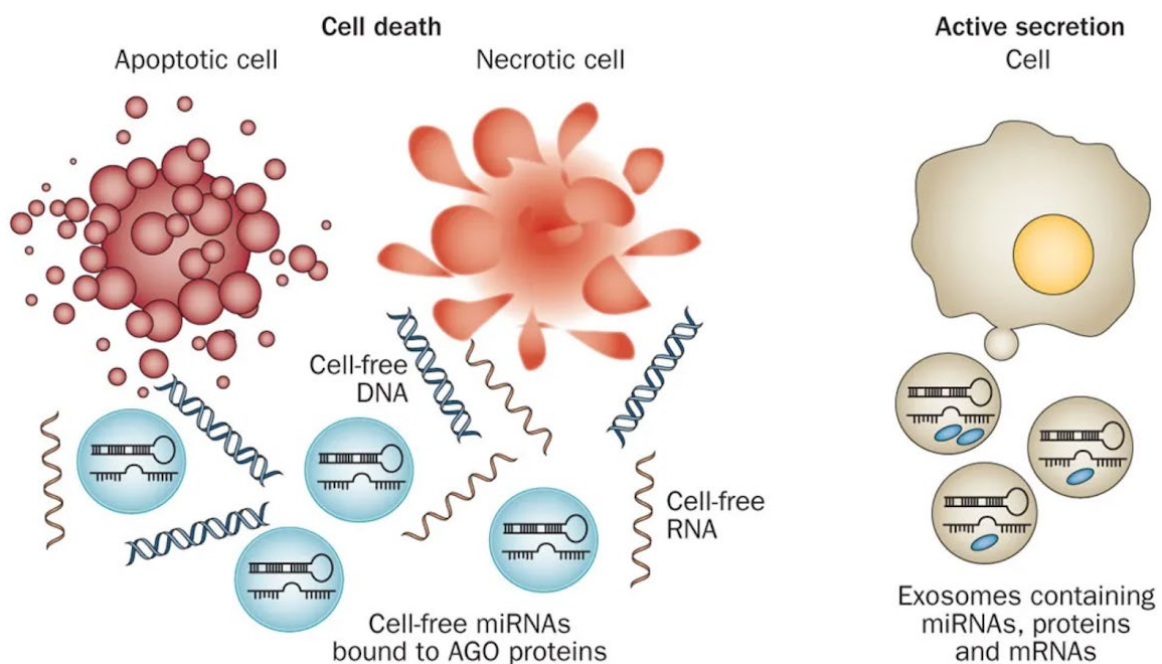


Abbildung 9: **Aktive und passive Befreiung der miRNAs in die Blutzirkulation** (nach Schwarzenbach et al., 2014)

### 1.4.3 MiRNAs bei Tumorpatienten

Während der Tumorentwicklung, Progression und Metastasierung sind viele miRNAs dereguliert und ihre aberrante Expression kann in Körperflüssigkeiten, Tumorgeweben und Exosomen nachgewiesen werden (Schwarzenbach et al., 2014; Schwarzenbach, 2015). Im Jahr 2002 wurde erstmals durch Calin et al. ein Zusammenhang zwischen einer deregulierten miRNA und einer malignen Erkrankung beschrieben. In dieser Studie handelte es sich um eine herunterregulierte miRNA bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (Calin et al., 2002). Seither konnte für zahlreiche weitere maligne Erkrankungen, wie auch für das Pankreaskarzinom, eine Assoziation mit deregulierten miRNAs gezeigt werden (Rawat et al., 2019; Luga et al., 2012; Roth et al., 2010). Als OnkomiR bezeichnet man miRNAs, welche an der Repression der Transkription von Tumorsuppressorgen beteiligt sind. Ein erhöhtes Niveau an OnkomiRs bewirkt demnach eine Herunterregulation der Expression von Tumorsuppressorgen. Dem gegenüber stehen Tumorsuppressor-miRNAs, welche die Expression von Onkogenen inhibieren. Eine Reduktion von Tumorsuppressor-miRNAs führt somit zu einer Überexpression der Onkogene (Hammond, 2006). Es wurden zahlreiche Beispiele für die Herunterregulierung der Expression von Tumorsuppressor-miRNAs mit einer simultanen Aufregulierung der Expression von OnkomiRs in verschiedenen Tumoren in der Literatur beschrieben (Schwarzenbach et al., 2014; Schwarzenbach, 2015). Beispielsweise wurde in einer Analyse von Xu et al. ein Zusammenhang zwischen der miR-143 und dem Pankreaskarzinom gezeigt. Die Expression der miR-143 war im Tumorgewebe verglichen mit dem angrenzenden Pankreasgewebe signifikant reduziert (Xu et al., 2018). Durch Pramanik et al. und Kent et al. wurde eine inverse Korrelation zwischen Kras und der Expression der miR-143 beobachtet. Das onkogene aktive Kras führte zur Repression des miR-143/145-Clusters beim Pankreaskarzinom, was vom Ras-Responsive-Element-Bindungsprotein (RREB) 1 abhing, welches die miR-143/145-Expression negativ regulierte (Pramanik et al., 2011; Kent et al., 2013). Das Kras-Protein spielt eine

entscheidende Rolle in der Regulierung der Proliferation und Differenzierung von Zellen. Durch eine Überexpression und Aktivierung von Kras kommt es zur Phosphorylierung nachgeschalteter Kinasen, wie MAP kinase extracellular signal-regulated kinase (MEK) und extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 und somit zu einer unkontrollierten Proliferation (Alberts et al., 2003).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Bisher gibt es für das Pankreaskarzinom keine Früherkennungsmaßnahmen. Bedingt durch die häufig späte klinische Manifestation kommt es meist erst im fortgeschrittenen Stadium zur Diagnosestellung. Um ein Therapieansprechen oder Nichtansprechen rasch zu detektieren, besteht der dringende Bedarf nach diagnostischen und prädiktiven Biomarkern. Ziel dieser Arbeit ist es, das exosomale Vorkommen der miR-483, miR-99a und miR-27a im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom mit demjenigen von Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Probanden zu vergleichen, um zu bestimmen ob diese miRNAs als diagnostische und prognostische Marker für das Pankreaskarzinom geeignet sind. Des Weiteren soll die exosomale Expression der miR-483, miR-99a und miR-27a im Verlauf einer Chemotherapie untersucht werden, um zu bestimmen, inwiefern sie als Verlaufsparemeter beim Pankreaskarzinom geeignet sind. Für diese Untersuchungen sollen TaqMan real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und statistische Analysen durchgeführt werden. Die Exosomen-Präparation wird durch Western-Blot verifiziert.



## **2 Materialien**

### **2.1 Blutproben**

Die Serumproben der 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis als auch die Proben der 36 Patienten mit Pankreaskarzinom stammen aus der Biomaterialbank des Zentrums für klinische und experimentelle Tumormarker - Diagnostik und Therapie GmbH. Die Serumproben der als Vergleichsgruppe dienenden 10 gesunden Teilnehmer, entstammen der Blutbank des Instituts für Tumorbilogie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf.

### **2.2 Kits**

ExoQuick TC (BioCat, Heidelberg, Deutschland)

ExoQuick exosome precipitation solution (BioCat, Heidelberg, Deutschland)

TaqMan miRNA ABC Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

TaqMan Universal Master Mix II (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

qPCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

### **2.3 Puffer und Lösungen**

APS - Ammoniumpersulfat (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

Ethanol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande)

Glycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)

IGEPAL (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Isopropanolol (2-Propanolol) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Luminol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Methanol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande)  
Milchpulver (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
NaCl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
Nukleasefreies Wasser (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
p-Cumarsäure (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)  
ProtoGel 30 % (National Diagnostics, Atlanta, USA)  
Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)  
RIPA Puffer - Radio immunoprecipitation assay buffer (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
SDS - Sodium dodecyl sulfate (Affymetrix USB, Santa Clara, USA)  
TEMED - Tetramethylethylenediamine (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)  
Transfer membran Fluoro Trus PVDF (Pall Laboratory, New York, USA)  
Tween 20 (Merck, Darmstadt, Deutschland)

#### ECL-Lösung 1

p-Cumarsäure	0,2 mM
Luminol	1,25 mM
Tris (pH 8,5)	100 mM
H <sub>2</sub> O	8,85 ml

#### ECL-Lösung 2

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,06 %
Tris (pH 8,5)	100 mM
H <sub>2</sub> O	9 ml

#### Laemmli Laufpuffer (5x)

Glycin	960 mM
Tris	125 mM
SDS	17 mM
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

### Lysepuffer für Exosomen

NaCl	150 mM
IGEPAL CA-630	1 %
Natrium-Deoxycholat	0,5 %
SDS	0,1 %
Tris (pH 7,6)	50 mM
Protease-Inhibitor-Cocktail	1x
H <sub>2</sub> O	100 ml

### Milchlösung (6 %)

TBST (1x)	100 ml
Milchpulver	6 g

### PBS (1x) (pH 7,2 – 7,4)

NaCl	128 mM
KCl	2 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM

### TBS (10x)

NaCl	50 mM
Tris	150 mM
pH-Wert mit HCl einstellen auf 7,6	
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

### TBST (1x)

TBS 10x	100 ml
H <sub>2</sub> O	900 ml
Tween 20	1000 µl

### Transferpuffer (1x)

Tris	48 mM
Glycin	39 mM
SDS	0,037 %
M <sub>3</sub> OH	20 %
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

## **2.4 Antikörper**

### primärer Antikörper

Anti-CD63, C-terminal, polyklonal (ABGENT, San Diego, USA)

### sekundärer Antikörper

Anti-Kaninchen, HRP, Schwein, polyklonal (Dako, Glostrup, Dänemark)

## **2.5 Synthetische Oligonukleotide**

Zur Quantifizierung der miRNAs wurden spezifische TaqMan MikroRNA Assays (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) ausgewählt.

### Exogene Kontrolle (spike-in)

cel-miR 39

### Endogene Kontrolle

hsa-miR-484

### **2.5.1 Zu untersuchende miRNAs**

hsa-miR-483

hsa-miR-99a

hsa-miR-27a

## 2.6 Geräte

DynaMag - Magnetständer (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Elektrophoresekammer (Bioplastics, Landgraaf, Niederlande)

Gefrierschrank –20 °C (Liebherr, Kirchdorf, Deutschland)

Kühlschrank (Liebherr, Kirchdorf, Deutschland)

Laborzentrifuge Heraeus Multifuge 3 SR (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

Mikrozentrifuge MiniStar (VWR Radnor, Pennsylvania, USA)

MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Global Medical Instrumentation, Ramsey, USA)

Monochromat Nano Quant infinite (Tecan, Männedorf, Schweiz)

qPCR CFX96 (Bio-Rad, Hercules, USA)

Real Time PCR 7300 HT 384 block (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

Röntgenfilmentwickler Curix60 (AGFA, Mortsel, Belgien)

Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Tischzentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Vortex-Genie 2 (Scientific industries, New York, USA)

XCell II Blot Modul (Life technologies, Darmstadt, Deutschland)

XCell SureLock Mini-Cell device (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

## 3 Methoden

### 3.1 Studienpopulation

Für diese Studie wurden Daten und Blutserum von Patienten aus den Jahren 2008 - 2018 analysiert. Insgesamt wurden Serumproben von 36 Patienten mit Pankreaskarzinom, 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis und 10 gesunden Teilnehmern ausgewertet.

Patienten mit Pankreaskarzinom mussten für den Einschluss in die Studie über 40 Jahre alt sein und an einem diagnostizierten Pankreaskarzinom erkrankt sein. Das Vorliegen weiterer Tumorerkrankungen führten zum Ausschluss aus der Studie. Patienten mit chronischer Pankreatitis mussten ebenfalls über 40 Jahre alt sein und an einer diagnostizierten chronischen Pankreatitis leiden. Die Auswahl der gesunden Teilnehmer erfolgte nach Selbstauskunft. Abhängig vom Gesamtüberleben wurden 4 - 5 Serumproben von Patienten mit Pankreaskarzinom für diese Studie analysiert. Die erste Probe wurde vor Beginn einer Chemotherapie gewonnen, Proben 2 - 4 wurden etwa alle vier Wochen während der Chemotherapie gewonnen und Probe 5 wurde kurz vor dem Tod des Patienten abgenommen. Die Untersuchung aller Proben erfolgte nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission (Nr.: WF-64/16). Tabelle 8 fasst die demographischen, klinischen und histopathologischen Eigenschaften der 36 Patienten mit Pankreaskarzinom, 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis und 10 gesunden Teilnehmer zusammen. Im Vergleich der Patienten mit Pankreaskarzinom mit den Patienten mit chronischer Pankreatitis fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Alter und in der Geschlechterverteilung. Die gesunden Teilnehmer waren allerdings signifikant jünger als die Patienten mit chronischer Pankreatitis. Ein Tumorsprechen auf die Therapie wurde durch den Verlauf des Tumormarkers CA 19-9 bestimmt. Dies geschah anhand der modifizierten RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) 1.1 Kriterien. Ein Abfall von CA 19-9 um  $> 30\%$  vom Ausgangswert war demnach als Ansprechen definiert, während ein Nicht-Ansprechen bei einem Anstieg von CA 19-9 um  $> 25\%$  vom Ausgangswert vorlag. Veränderungen des CA 19-9 innerhalb

des eben beschriebenen Bereichs (CA 19-9 Abfall um < 30 % oder Anstieg um < 25 %) wurden als stabiler Verlauf unter der Chemotherapie gewertet (Eisenhauer et al., 2009).

### **3.2 Überprüfung der Serumproben auf Hämolyse**

Die Serumproben der Studienpopulation wurden zu Beginn sämtlich auf Hämolyseanzeichen untersucht, um eine Beeinflussung der Messungen von exosomaler miRNAs durch lysierte Zellen zu vermeiden. Als Standardkurve zur Detektion hämolysierter 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). 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 (> 0,5) wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

### **3.3 Exosomenisolation aus den Serumproben**

Die Isolation von Exosomen mit dem ExoQuick® Exosome Isolation and RNA Purification Kit wurden anhand des modifizierten Protokolls der Firma System Biosciences (SBI) 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 einen neuen Tube übertragen und erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 3000 g zentrifugiert. Jeweils 500 µl der Serumprobe wurden in einen neuen Tube übertragen und 120 µl ExoQuick® hinzugegeben. Die Tubes wurden invertiert und schließlich für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Hierdurch kam es zum Ausfallen der Exosomen, welche sich im nächsten

Zentrifugationsschritt 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 mit 1500 g bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Mit einer Pipette wurde die restliche Flüssigkeit schließlich abpipettiert.

### **3.4 Proteinanalyse**

Der Nachweis zum Vorhandensein von Exosomen in den Serumproben erfolgte mittels Western Blot. Dies ist ein Verfahren zum Nachweis spezifischer Proteine in einem Proteingemisch.

#### **3.4.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Mit der Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es möglich, Proteine eines Proteingemischs entsprechend ihrem Molekulargewicht und der elektrischen Ladung zu trennen. Nach Anschluss eines elektrischen Feldes laufen alle negativ geladenen Proteine im Gel zum Pluspol. Hierbei unterscheidet sich die Laufgeschwindigkeit der Proteine jedoch nach dem Molekulargewicht. Proteine mit einem niedrigen Molekulargewicht laufen schneller durch das Gel als Proteine mit einem hohen Molekulargewicht. Das Gel besteht aus einem Sammelgel und dem Trenngel. Das Sammelgel ermöglicht es, die beladenen Proteine während der ersten Minuten der Elektrophorese zu einer engen Bande zu konzentrieren. Somit startet die Trennung der Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten vom gleichen Punkt aus, sobald sie in das Trenngel eintreten. Für die Auftrennung wurden entsprechend der Tabelle 7 zunächst das Sammel- und das Trenngel angefertigt.



Tabelle 7: **Zusammensetzung der Elektrophoresegele**

	Sammelgel	Trenngel (10 %)
ddH <sub>2</sub> O	1,4 ml	2,5 ml
30 % Polyacrylamide	335 µl	3 ml
1 M Tris (pH 6,8)	250 µl	
1,5 M Tris (pH 8,8)		1,9 ml
10 % SDS	20 µl	75 µl
TEMED	2,5 µl	3 µl
10 % APS	20 µl	75 µl

Jeweils 30 µg des Proteingemischs (Exosomen, Kapitel 3.3) wurden in RIPA-Puffer gelöst und aufgetragen. Im Anschluss wurden die Gele in die XCell SureLock Mini-Kammer eingespannt und die Kammer mit dem Laemmli Laufpuffer befüllt. Die Laufzeit betrug 2 Stunden bei 125 V.

### 3.4.2 Western Blot

Um die Proteine nach der Auftrennung zu identifizieren, muss ein Transfer auf eine feste Trägermembran erfolgen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung in einer Elektrophoresekammer senkrecht zur Laufrichtung des Gels wandern die Proteinbanden aus dem Gel heraus und gelangen auf die Membran, wo sie gebunden werden. Dieses Verfahren wird als Blotting bezeichnet.

Nach der Trennung der Proteine erfolgte der Transfer der Polypeptidbanden auf eine 0,45 µm Polyvinyliden Fluorid (PVDF) Membran. Hierfür wurde das Blot Modul XCell II wie in Abbildung 10 dargestellt aufgebaut. Anschließend wurde die Membran 1 Minute lang mit Methanol aktiviert, 3 Minuten lang mit doppelt destilliertem Wasser inkubiert und für 5 Minuten in Transferpuffer eingeweicht. Die Schwämme und das Filterpapier wurden ebenfalls mit Transferpuffer eingeweicht. Die zusammengebaute Kammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und mit Leitungswasser zum Abkühlen umgeben. Der Transfer erfolgte über 1 Stunde bei 25 V. Im Anschluss wurde die Membran für 1 Stunde bei

Raumtemperatur mit einer 6%igen Milchlösung in einem 50 ml Tube inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern.

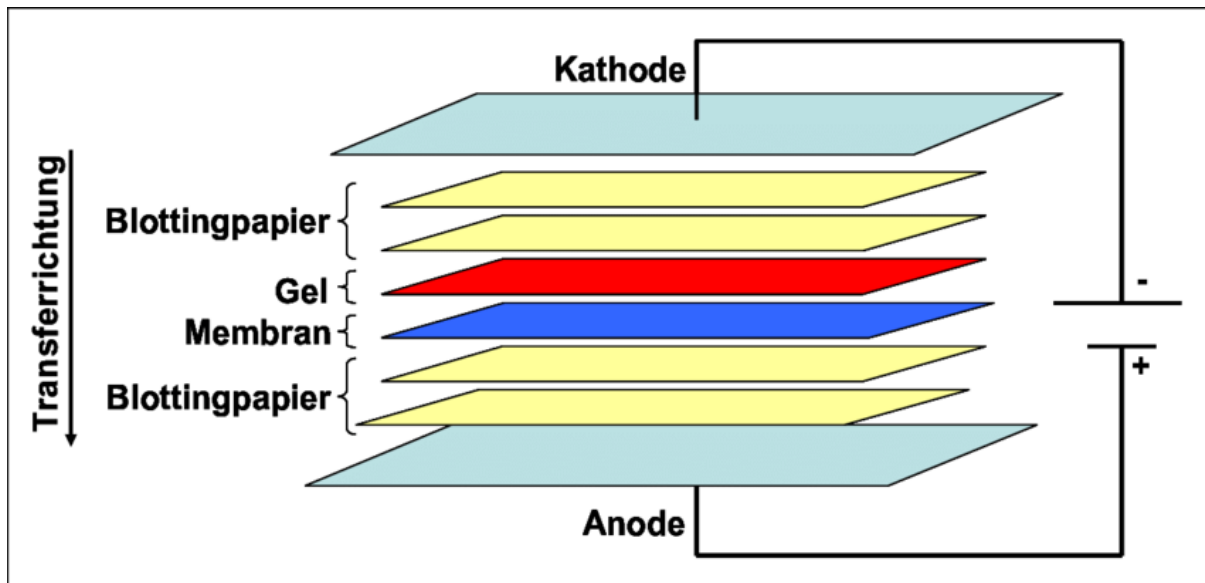


Abbildung 10: **Schematischer Aufbau für den Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF Membran** (nach Bruennert, 2010). Der Transfer der negativ geladenen Proteine verläuft von der Kathode (-) zur Anode (+). Das Blottingpapier (Schwämme und Filterpapier) sorgen für einen steten Kontakt zwischen dem Gel und der Membran.

### 3.4.3 Immundetektion (Western Blot)

Die Proteinanalyse wurde unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers CD63 durchgeführt. CD63 ist ein Transmembranprotein der Exosomen und dient als spezifischer exosomaler Marker.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran und dem Blocken unspezifischer Proteinbindungen wurde die Membran zunächst dreimal mit TBST für je 10 Minuten gewaschen und schließlich über Nacht bei 4 °C mit 5 µl des Antikörpers CD63 (1 : 1000) in 5 ml 6%iger Milchlösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran wieder dreimal mit TBST für je 10 Minuten gewaschen und mit 2,5 µl des Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers Anti-Kaninchen Immunglobulin in 5 ml 6%iger Milchlösung bei

Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang für je 10 Minuten mit TBST wurde die Membran abschließend mit einer 1 : 1 Mischung aus einer ECL-Lösung 1 und einer ECL-Lösung 2 überzogen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper bewirkte in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid eine Oxidation des Luminolreagenz der ECL-Lösung 1. Die chemiluminiszierenden Signale wurden mit photosensitiven Röntgenfilmen nachgewiesen. Die Belichtungszeit betrug ca. 1 Minute. Die Filme wurden im Röntgenfilmentwickler Curix 60 entwickelt.

### **3.5 Extraktion der miRNAs**

Die Extraktion der miRNAs erfolgte durch den TaqMan microRNA ABC Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Abbildung 11). Hierfür wurden die gewonnenen Exosomen zunächst in 100 µl Phosphate-Buffered Saline (PBS) für 10 Minuten gelöst. Nach Zugabe von 150 µl Lyse-Puffer konnten die Exosomenpellets resuspendiert werden. Die als exogene Kontrolle fungierende cel-miR 39 wurde mit nukleasefreiem Wasser auf ein Verhältnis von 1 : 4000 verdünnt. Je 2 µl dieser Verdünnung wurden zu der Exosomensuspension gegeben, für 10 Sekunden auf dem Vortexer gemischt und kurz auf Eis gelagert. Mittels der im Kit enthaltenen Beads war es möglich, die spezifischen miRNAs einzufangen. Hierfür wurden Beads für eine Minute auf dem Vortexer durchmischt und für jede Probe 100 µl der Beads in einen LoBind 1,5 ml-Tube gegeben. Die Tubes wurden auf einen magnetischen Ständer (DynaMag) gestellt, damit sich die Beads an die Wand der Tubes anlagerten und nach 1 Minute der Überstand vorsichtig abpipettiert werden konnte. Die 500 µl-Proben wurden in die Tubes mit den Beads übertragen, mit Hilfe des Vortexers durchmischt und bei 30 °C für 40 Minuten im Thermoshaker inkubiert. Die miRNAs wurden nun an die Beads gebunden. Nach 1 Minute auf dem magnetischen Ständer konnte der Überstand abpipettiert werden. Es folgten mehrere Waschvorgänge, um DNA, Proteine, Verunreinigungen und die restliche Lösung zu entfernen. Begonnen wurde mit 100 µl einer ersten Waschlösung (Wash Buffer 1), die

zu den Proben hinzugefügt wurde. Um die Beads in Lösung zu bringen, wurde die Probe mit dem Vortexer durchmischt, kurz zentrifugiert und bei Raumtemperatur für 1 Minute inkubiert. Wieder wurde nach einer Minute auf dem Magnetständer der Überstand abpipettiert. Darauf folgend wurde dieser Waschvorgang nun zweimal mit einer weiteren Waschlösung (Wash Buffer 2) wiederholt. Am Ende der Waschvorgänge wurde jegliche Flüssigkeit abpipettiert. Um die miRNAs nun in Lösung zu bringen, wurden 20 µl Elutionsbuffer 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 miRNAs enthielt, abpipettiert werden und in einem neuen Tube auf Eis gelagert werden.

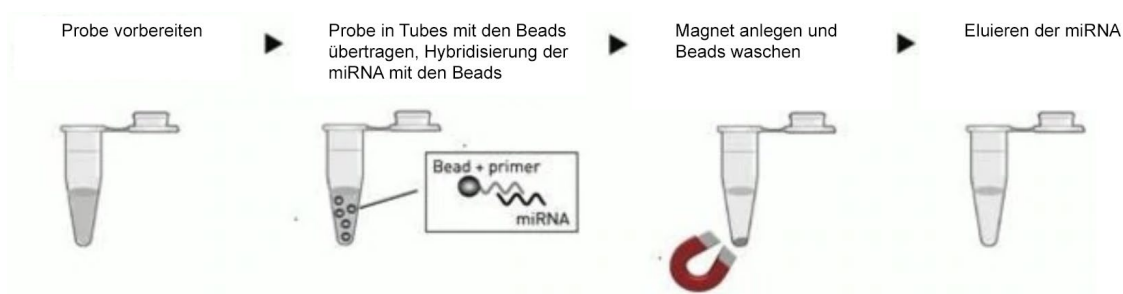


Abbildung 11: **Arbeitsablauf mit dem TaqMan® miRNA ABC Purification Kit** (nach Thermo Fisher Scientific, 2020)

### 3.6 Konversion der miRNAs in cDNA

Die gewonnenen miRNAs wurden anschließend sofort mittels reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte anhand des modifizierten Protokolls “for Creating Custom RT and Pre-amplification Pools using TaqMan MicroRNA Assays” (Life Technologies). Hierfür wurde für jede zu analysierende miRNA (miR-483, miR-99a und miR-27a) ein Pool aus dem entsprechendem Primer und den Kontrollprimern der miR-484 und cel-miR-39 zusammengestellt. Je 10 µl der im TaqMan® MicroRNA Assay enthaltenen 5x RT Primer wurden zu 970 µl 1x TE (Tris EDTA) hinzugefügt. In dem Primer Pool mit einem Gesamtvolumen von 1000 µl (für die jeweils zu analysierende miRNA und

die beiden Kontroll-miRNAs) ergab sich somit eine Endkonzentration von 0,05 für die einzelnen Primer. Es folgte die Zusammenstellung des Reaktionsmix für die reverse Transkription auf Eis. Pro Probe wurden 4 µl RT Primer Pool, 0,2 µl dNTPs mit dTTP (100 mM), 2 µl MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl), 1 µl 10x RT Buffer, 0,13 µl RNase Inhibitor (20 U/µl) und 0,67 µl nukleasefreies Wasser benötigt. Zu dem 8 µl Reaktionsmix wurden 2 µl der zu analysierenden RNA hinzugefügt und schließlich wurden die Proben 5 Minuten auf Eis inkubiert. Mit dem MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler 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 bei 4 °C.

### **3.7 Preamplifikation der cDNA**

Um die Menge der cDNA zu erhöhen, wurde ein im "Protocol for Creating Custom RT and Preamplification Pools using TaqMan MicroRNA Assays" beschriebener Preamplifikationsschritt durchgeführt. Zunächst wurde hierfür ein Primer Pool (Pre Amp Primer Pool) mit den 20x TaqMan® MicroRNA Assays vorbereitet. Je 10 µl der 20x TaqMan® MicroRNA Assays wurden mit 970 µl 1x TE kombiniert, um schließlich eine Endkonzentration von 0,2 für jeden Primer in einem Gesamtvolumen von 1000 µl zu ergeben. Der im Folgenden zusammengestellte Reaktionsmix der Preamplifikation beinhaltete 0,8 µl des RT-Produkts, 4 µl TaqMan® PreAmp Master Mix (2x), 1,2 µl PreAmp Primer Pool und 2 µl nukleasefreies Wasser. Die PCR erfolgte mittels des MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cyclers, wobei die Proben in den folgenden Schritte preamplifiziert wurden: 1. Zyklus = 10 Minuten bei 95 °C, 2 Minuten bei 55 °C, 2 Minuten bei 72 °C; 2. - 17. Zyklus = 15 Sekunden bei 95 °C, 4 Minuten bei 60 °C; 18. Zyklus = 10 Minuten bei 99,9 °C und abschließend bei 4 °C.

### 3.8 MiRNA Expression

Im letzten Schritt wurden schließlich die Expressionsniveaus der einzelnen miRNAs mittels Echtzeit PCR (RT-PCR) analysiert. Um den Reaktionsmix für die RT-PCR zu präparieren wurden 0,5 µl 20x TaqMan® MicroRNA Assay, 5 µl TaqMan® Universal Master Mix II, No AmpErase UNG (2x), 4 µl nukleasefreies Wasser und schließlich 0,5 µl verdünntes Preamplifikationsprodukt auf Eis kombiniert. Die RT-PCR durchlief folgende Schritte: 1. Zyklus = 10 Minuten bei 95 °C; 40 Zyklen = 15 Sekunden bei 95 °C, 60 Sekunden bei 60 °C und abschließend bei 4 °C.

### 3.9 Normalisierung der Daten und statistische Analyse

Die Datensammlung, Weiterverarbeitung und Berechnungen sowie die Erstellung von Liniendiagrammen erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft Excel für Office 365 MSO). Für alle statistischen Auswertungen wurde SPSS software package, Version 24.0 (SPSS Inc. Chicago, IL), verwendet.

Die bereinigten Daten der miRNA Expression wurden mittels  $\Delta\Delta Cq$  Methode wie folgt kalkuliert: im ersten Schritt wurde für jede untersuchte Probe der Cq Mittelwert der Referenz-miRNA (miR-484) vom Cq Wert der zu untersuchenden miRNA subtrahiert ( $\Delta Cq = Cq \text{ Ziel-miRNA} - Cq \text{ Referenz-miRNA}$ ). Nach dieser Normierung wurde vom  $\Delta Cq$  Wert der Probe der Cq Mittelwert der Kontroll-miRNA (miR-39) abgezogen, was  $\Delta\Delta Cq$  ergibt. Anschließend ergab sich aus der arithmetischen Formel  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

Die relative Expression und die p-Werte wurden mittels Benjamini und Hochberg Methode transformiert. Die Berechnung des Unterschiedes der relativen Expression der miRNAs innerhalb der Subgruppen erfolgte mittels Student t-Test. Die Korrelationen der miR-483, miR-99a und miR-27a mit den Patientencharakteristika wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet, um einen nichtparametrischen Vergleich mit zwei unabhängigen Variablen ermitteln zu können. Die Korrelationsanalyse für den Verlauf der Chemotherapie erfolgte mit Hilfe des nichtparametrischen Wilcoxon-Test. Des Weiteren

wurde die Korrelation zwischen den miRNAs und den CA 19-9 Werten mittels Spearman-Rho-Test ermittelt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patienten

Insgesamt wurden Serumproben von 36 Patienten mit Pankreaskarzinom, 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis sowie von 10 gesunden Probanden untersucht. Demographische und klinische Daten sind in Tabelle 8 zusammengetragen. In dem Kollektiv der Patienten mit einem Pankreaskarzinom befanden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 27 Patienten im Tumorstadium T3 und 8 Patienten bereits im Stadium T4. Trotz des fortgeschrittenen Stadiums wurden insgesamt 18 der in die Studie eingeschlossenen Patienten initial einer Operation mit kurativem Ansatz unterzogen. Bei wiederum 11 dieser Patienten war eine vollständige Entfernung des Tumors (R0-Resektion) möglich. Drei weitere Patienten unterzogen sich einer Operation, wobei sich intraoperativ beim fortgeschrittenen Stadium eine palliative Situation ergab und somit keine Tumorsektion durchgeführt wurde. 15 Patienten mit Pankreaskarzinom waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits in einer palliativen Situation. Ein Lymphknotenbefall gab es bei 22 Patienten und eine Metastasierung bei 21 Patienten. Bei einem Patienten fehlten die Angaben bezüglich des TNM-Stadiums.

Alle 18 Patienten mit palliativem Therapieansatz standen vor dem Beginn einer palliativen Erstlinientherapie. Bei 11 der kurativ operierten Patienten wurde zum Zeitpunkt der Untersuchung eine adjuvante Erstlinientherapie durchgeführt und bei 4 eine Zweitlinientherapie. Die Patienten mit Pankreaskarzinom hatten ein Gesamtüberleben von etwa 17 Monaten, wobei am Ende der Datensammlung 3 Patienten noch am Leben waren. Patienten, welche sich einer kurativen Operation unterzogen, hatten hierbei die höchste Überlebensrate mit durchschnittlich 27 Monaten nach Diagnosestellung.



**Tabelle 8: Demographische und klinische Eigenschaften der Studienpopulation**

	Patienten mit Pankreaskarzinom n = 36 (100 %)	Patienten mit chronischer Pankreatitis n = 10 (100 %)	Gesunde Teilnehmer n = 10 (100 %)
<b>Geschlecht</b>			
weiblich	12 (33,3 %)	4 (40 %)	6 (60 %)
männlich	24 (66,6 %)	6 (60 %)	4 (40 %)
<b>Alter</b>			
Range	41 - 82	52 - 79	46 - 73
Median	62,5	69,5	54
<b>TNM Stadium (n = 35)</b>			
T3	27 (77 %)		
T4	8 (22,9 %)		
N1	22 (62,8 %)		
M1	21 (60 %)		
N1 + M1	14 (40 %)		
<b>Gesamtüberleben in Monaten</b>			
Range	4 - 93		
Median	12		
<b>Noch lebend (n = 3)</b>			
Range	26 - 93		
Median	31		
<b>Verstorbene Patienten (n = 33)</b>			
6 Monate	9 (27,3 %)		
7 - 12 Monate	8 (24,2 %)		
13 - 24 Monate	8 (24,2 %)		
25 Monate	8 (24,2 %)		
<b>Chemotherapie (n = 36)</b>			
Erstlinie bei nicht operierten Patienten	18 (50 %)		
Erstlinie nach OP	11 (30,6 %)		
Zweitlinie nach OP	4 (11,1 %)		
Drittlinie nach OP	2 (5,6 %)		
neo-adjuvant	1 (2,8 %)		
<b>OP in kurativer Absicht (n = 18)</b>			
R0 - Resektion	11 (61,1 %)		
R1 - Resektion	6 (33,3 %)		
R2 - Resektion	1 (5,6 %)		

Überleben nach OP in Monaten		
	Median	Range
kurative Operation (n = 18)	27,8	5 - 93
Operation, nicht kurativ (n = 3)	8,7	6 - 10
keine Operation (n = 15)	12,7	4 - 42

Tumorentwicklung nach CA 19-9 (n = 35)	
Remission	20 (57,1 %)
Progression	15 (42,9 %)

## 4.2 Hämolyse

Eine Hämolyse der Serumproben hätte Einfluss auf die Quantifizierung der miRNAs und musste somit ausgeschlossen werden. Mittels Spektralanalyse konnte der Hämoglobinwert der Proben ermittelt werden. Mit steigender Hämolyse wird mehr Hämoglobin frei und es kommt zu einer stärkeren Absorption, insbesondere bei einer Wellenlänge von 414 nm. Anhand einer Standardkurve konnten die Absorptionspeaks bei den Wellenlängen 414, 541 und 576 nm abgelesen und schließlich beurteilt werden. Die tolerierte Obergrenze lag bei 0,6. Proben von 5 Patienten wiesen einen zu hohen Wert auf und wurden somit nicht analysiert.

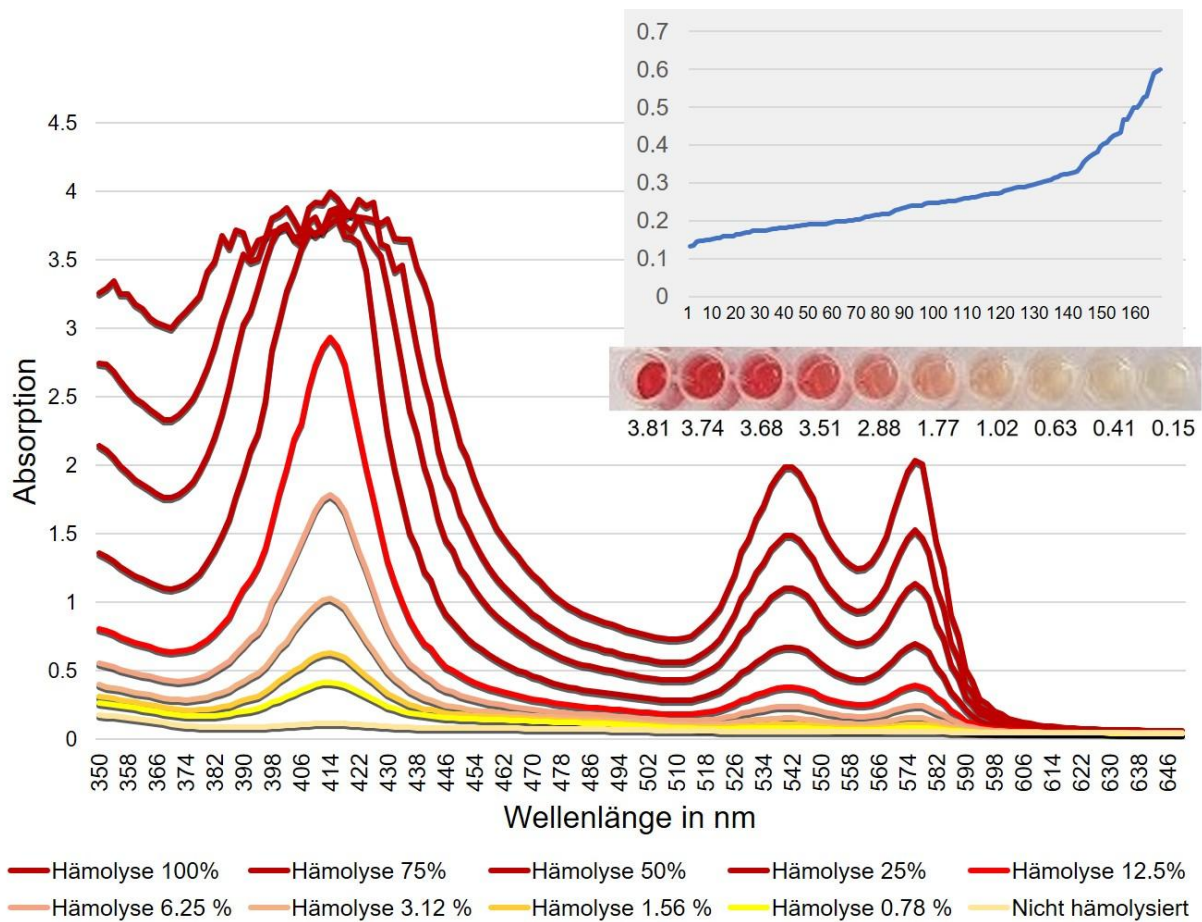


Abbildung 12: **Messung der Hämolysen in den Serumproben**

Durch zunehmende Hämolysen enthält eine Probe zunehmend mehr freies Hämoglobin, welches die Absorption beeinflusst. Mittels Spektralanalyse bei Wellenlängen von 350 bis 650 nm erfolgte die Hämolysenmessung und die Auswertung erfolgte anhand einer Standardkurve. Serumproben galten als hämolysiert bei Absorptionspeaks von über 0,6 bei 414 nm beziehungsweise in den weiteren relevanten Wellenlängen von 541 und 576 nm.

### 4.3 Western Blot

Mittels Western Blot wurde das Vorkommen der Exosomen in den Serumproben von Patienten mit Pankreaskarzinom verifiziert. Das Vorhandensein der Exosomen wurde durch den Antikörper gegen den exosomalen Marker CD63, ein Oberflächenprotein der Exosomen, nachgewiesen und ist in Abbildung 13 dargestellt. In allen 8 dargestellten Proben sind die in der 55 kD Bande befindlichen Exosomen vorhanden, jedoch variiert die Menge im Verlauf der Chemotherapie. Patient 1 hatte in der Probe vor Beginn der

Chemotherapie (a) noch eine vergleichsweise schmale Bande. Im Verlauf der Chemotherapie (b und c) kam es zunächst zum Anstieg der Exosomenmenge, um schließlich wieder abzufallen (d). Dem gegenüber steht der Verlauf der Exosomenbefreiung von Patient 2 mit einem kontinuierlichen Anstieg der Menge an Exosomen im Therapieverlauf. Möglicherweise bewirkte die Chemotherapie eine verstärkte Befreiung von Exosomen.

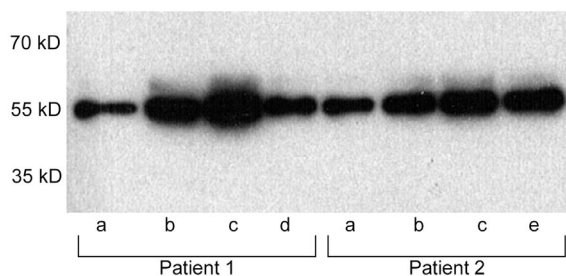


Abbildung 13: **Immundetektion isolierter Exosomen aus Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom**

Mittels Western Blot wurde das Transmembranprotein CD63 in den Serumproben im Verlauf der Chemotherapie detektiert. Die 55 kD Bande enthält die Exosomen. Der Verlauf der Therapie ist wie folgt gekennzeichnet: a ist vor Beginn der Chemotherapie; b, c und d sind 3 Verlaufsproben unter Chemotherapie mit je einem Abstand von etwa 1 Monat.

#### **4.4 Quantifizierung der exosomalen miR-483, miR-99a und miR-27a innerhalb der beiden Patientengruppen und bei gesunden Teilnehmern**

Mittels TaqMan Real-Time-PCR wurde das exosomale Vorkommen der miR-483, miR-99a und miR-27a im Serum der Probanden quantifiziert. In Abbildung 14 ist anhand der dargestellten Boxplots erkennbar, dass die exosomalen Niveaus der Patienten mit Pankreaskarzinom sowie mit chronischer Pankreatitis im Vergleich zu den Gesunden erhöht ist. Ein signifikanter Unterschied der exosomalen Transkriptmenge konnte für die miR-483 sowohl zwischen Patienten mit einem Pankreaskarzinom und Gesunden ( $p = 0,013$ , A), für die exosomale miR-99a zwischen Patienten mit Pankreaskarzinom und

gesunden Probanden ( $p = 0,001$ , B) sowie zwischen Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Probanden ( $p = 0,004$ , C) gezeigt werden (Abbildung 14).

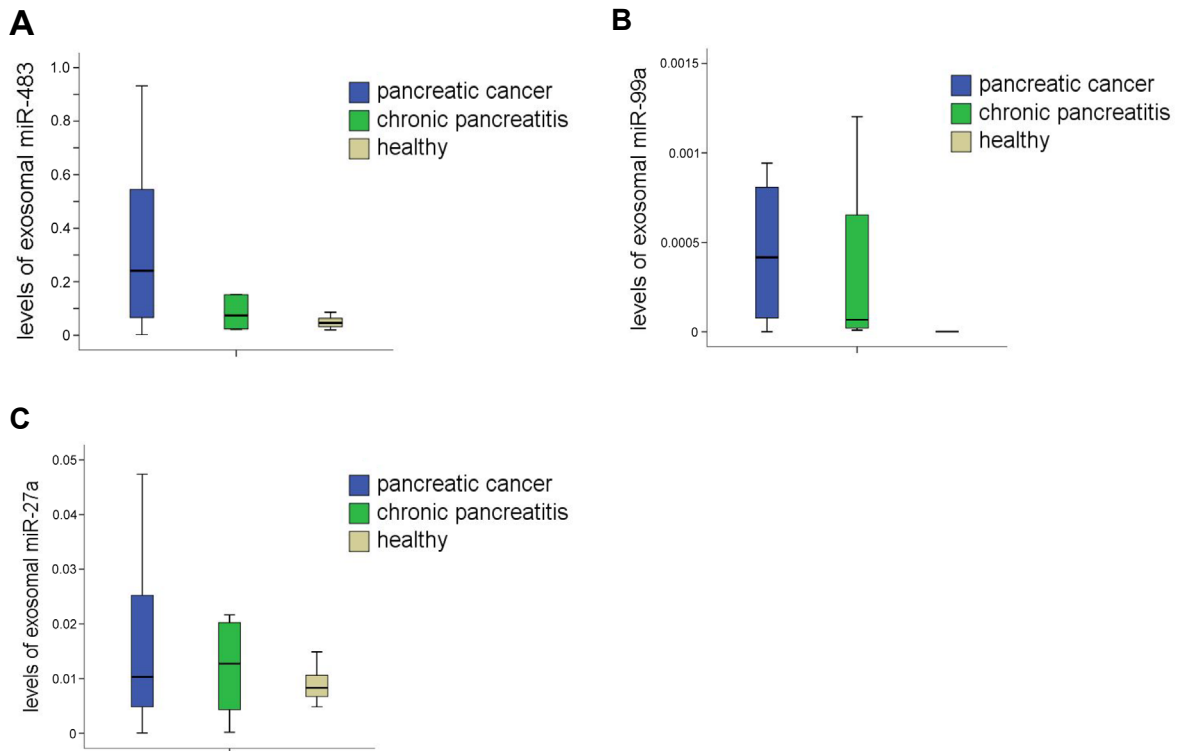


Abbildung 14: **Niveaus der exosomalen miR-483 (A), miR-99a (B) und miR-27a (C)** gemessen im Serum von 36 Patienten mit Pankreaskarzinom, 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis und 10 gesunden Teilnehmern. Signifikanzen wurden für die exosomale miR-483 zwischen Patienten mit Pankreaskarzinom und gesunden Probanden ( $p = 0,013$ ), für die exosomale miR-99a zwischen Patienten mit Pankreaskarzinom und gesunden Probanden ( $p = 0,001$ ) und zwischen Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Probanden ( $p = 0,004$ ) errechnet. Die Kalkulation der p-Werte erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

#### 4.5 Korrelation der exosomalen miR-483, miR-99a und miR-27a mit den klinisch-pathologischen Merkmalen der Patienten mit Pankreaskarzinom

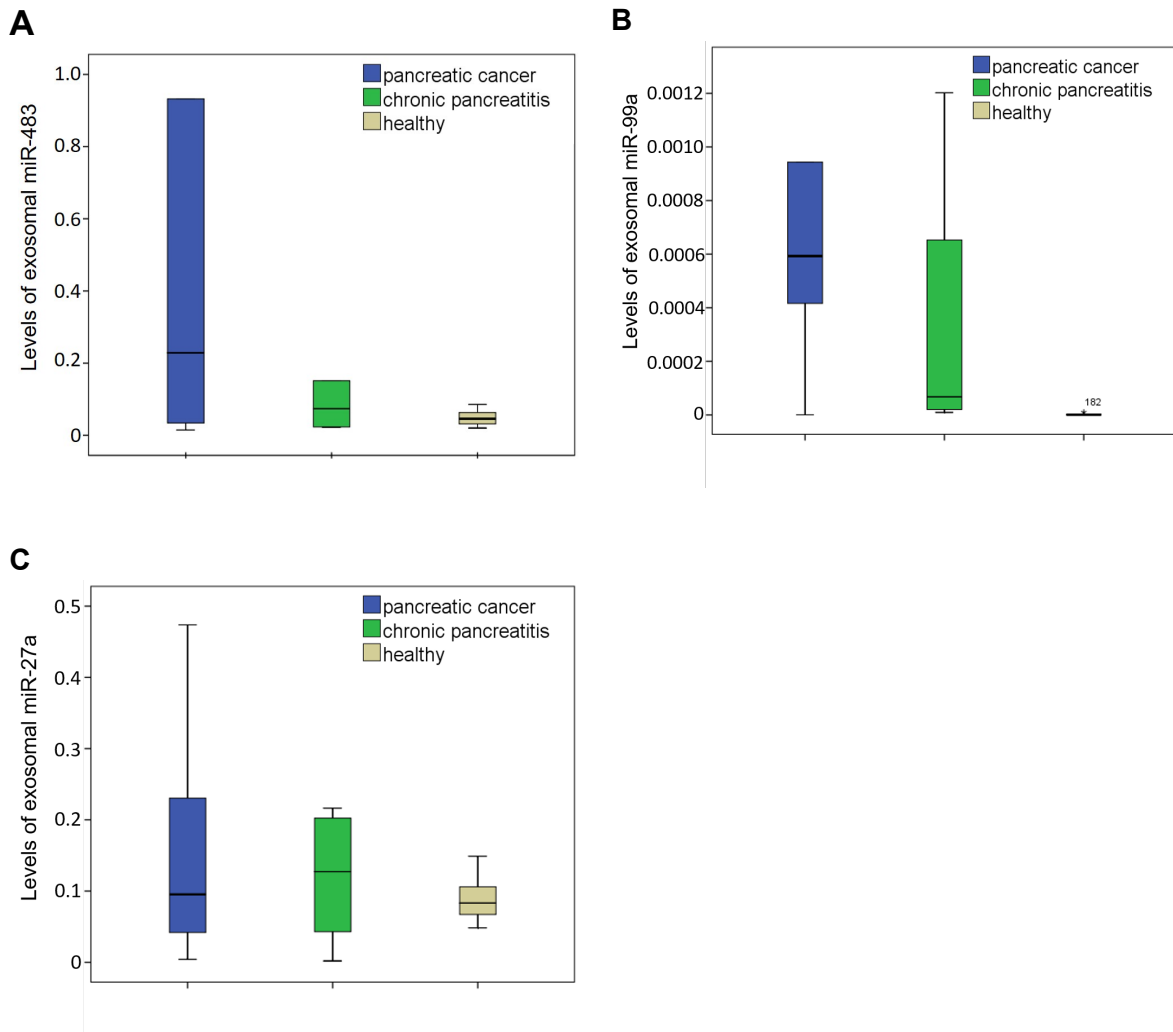
In umfangreichen Korrelationsanalysen mit klinischen sowie pathologischen Merkmalen der Patienten mit Pankreaskarzinom wurde die Signifikanz der exosomalen Niveaus der miR-483, miR-99a und miR-27a mit diesen Parametern analysiert. Hierfür wurden die

relativen Konzentrationen der exosomalen miRNAs in den Serumproben der 36 Pankreaskarzinompatienten mit dem Tumorstadium sowie dem Lymphknoten- und Metastasierungsstatus korreliert. Die Korrelationsanalyse erfolgte mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test. Für keinen der genannten Parameter konnte eine signifikante Korrelation gefunden werden (Daten nicht dargestellt).

Aufgrund der heterogenen Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom wurden in einer Subgruppenanalyse weiterhin nur Patienten unter Erstlinientherapie betrachtet. Hier fand sich kein Unterschied in der Expression der exosomalen miR-483, miR-99a und miR-27a zwischen Patienten mit adjuvanter Erstlinientherapie nach Tumorresektion (n = 11) und Patienten unter Erstlinientherapie ohne Operation (n = 18) (Daten nicht gezeigt).

#### **4.6 Exosomale Niveaus der miR-483, miR-99a und miR-27a in Abhängigkeit vom Therapieverlauf**

Eine weitere Analyse sollte untersuchen, ob die exosomalen Niveaus der miRNAs mit einem Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie assoziiert sind. Insgesamt zeigten 20 Patienten mit Pankreaskarzinom unter Chemotherapie einen Abfall des Tumormarkers CA 19-9 um mindestens 30 %, was somit einer Remission entspricht (s. a. Methodik). 15 Patienten zeigten einen Progress unter der Chemotherapie, also eine Zunahme des CA 19-9 um mindestens 20 % oder einen stabilen Verlauf (s.a. Methodik). Wie in Abbildung 15 dargestellt, fand sich auch bei Betrachtung dieser Gruppen sowohl für die Patienten mit Remission unter Chemotherapie ( $p = 0,046$  bzw.  $p = 0,003$ ) als auch bei Patienten mit Progress bzw. stabilem Verlauf unter Chemotherapie ( $p = 0,021$  bzw.  $p = 0,001$ ) ein signifikant höheres Vorkommen der exosomalen miR-483 und miR-99a im Vergleich zu gesunden Probanden. Weiterhin zeigte sich in beiden Gruppen das Vorkommen der exosomalen miR-99a im Vergleich der Patienten mit chronischer Pankreatitis mit den gesunden Teilnehmern signifikant erhöht (jeweils  $p = 0,002$ ).



**Abbildung 15: Vergleich der Niveaus der exosomalen miR-483 (A), miR-99a (B) und miR-27a (C) im Serum von 20 Patienten mit Pankreaskarzinom und Remission unter Chemotherapie**

Verglichen werden die Patienten mit Pankreaskarzinom in Remission mit Patienten mit chronischer Pankreatitis sowie mit gesunden Probanden. Es fand sich ein signifikant höheres Vorkommen der exosomalen miR-483 ( $p = 0,046$ ) und miR-99a ( $p = 0,003$ ) bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich mit Gesunden sowie für die miR-99a bei Patienten mit chronischer Pankreatitis verglichen mit Gesunden ( $p = 0,002$ ). Kalkulation der p-Werte erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

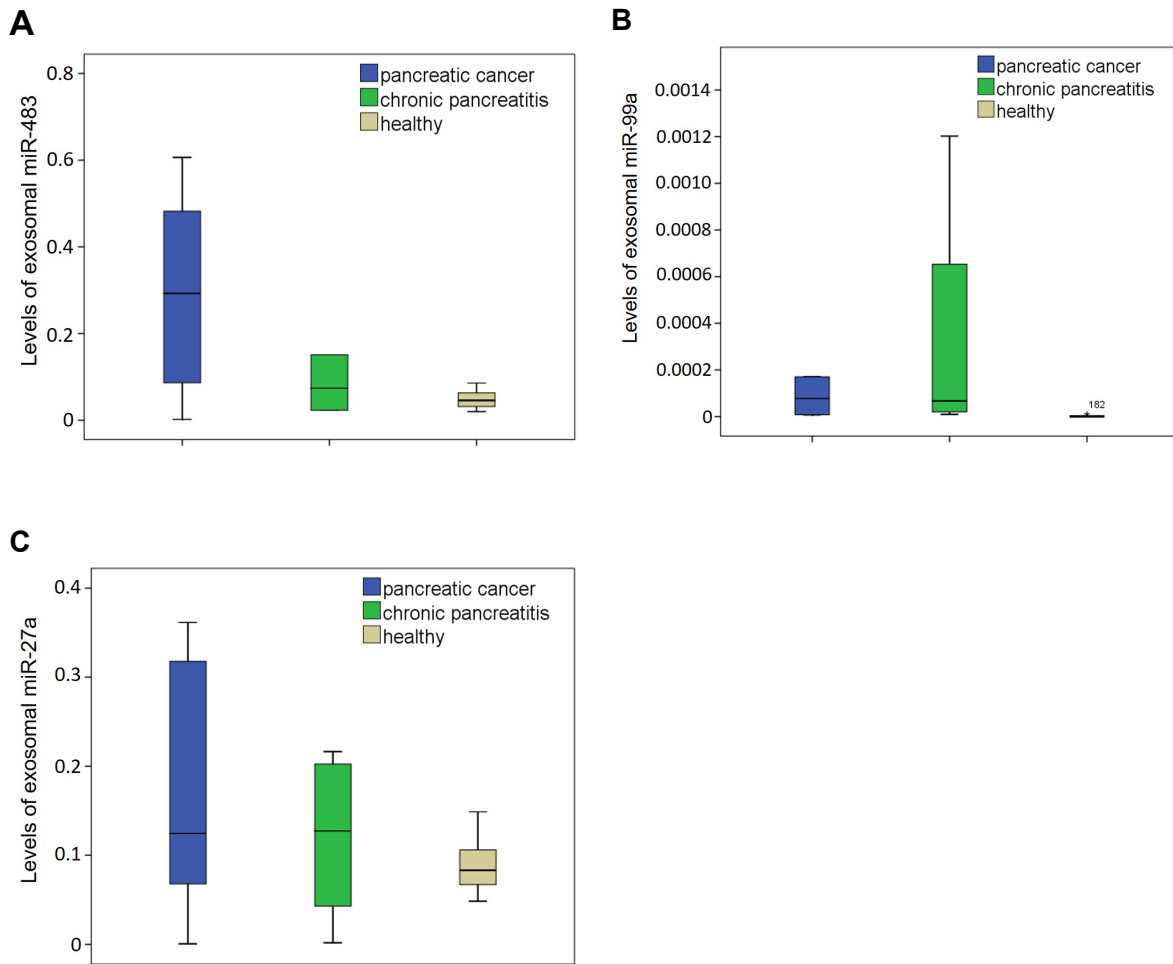


Abbildung 16: **Vergleich der Niveaus der exosomalen miR-483 (A), miR-99a (B) und miR-27a (C) im Serum von 15 Patienten mit Pankreaskarzinom und Progress unter Chemotherapie** Verglichen werden die Patienten mit Pankreaskarzinom im Progress mit Patienten mit chronischer Pankreatitis sowie mit gesunden Probanden. Es fand sich ein signifikant höheres Vorkommen der exosomalen miR-483 ( $p = 0,021$ ) und miR-99a ( $p = 0,001$ ) bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich mit gesunden Probanden sowie für die miR-99a bei Patienten mit chronischer Pankreatitis verglichen mit Gesunden ( $p = 0,002$ ). Die Kalkulation der p-Werte erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

Es fand sich kein signifikanter Unterschied im Vorkommen der exosomalen miR-483, miR-99a und miR-27a zwischen Patienten mit Remission unter Chemotherapie und Patienten mit Progression unter Chemotherapie (Daten nicht gezeigt).



## 4.7 Korrelation der exosomalen miR-483, miR-99a und miR-27a mit den laborchemischen Parametern

Des Weiteren erfolgte bei den Patienten mit Pankreaskarzinom eine Korrelationsanalyse zwischen dem exosomalen Vorkommen der miRNA und dem im klinischen Alltag verwendeten laborchemischen Verlaufsparemeter CA 19-9. Hier fand sich keine Korrelation nach Spearman-Rho zwischen CA 19-9 und der miR-483, miR-99a oder miR-27a. Nach Ausschluss ungewöhnlicher Werte, welche im Streudiagramm (Abbildung 17) sichtbar werden, kann ebenfalls keine Korrelation zwischen CA 19-9 und den miRNAs gezeigt werden.

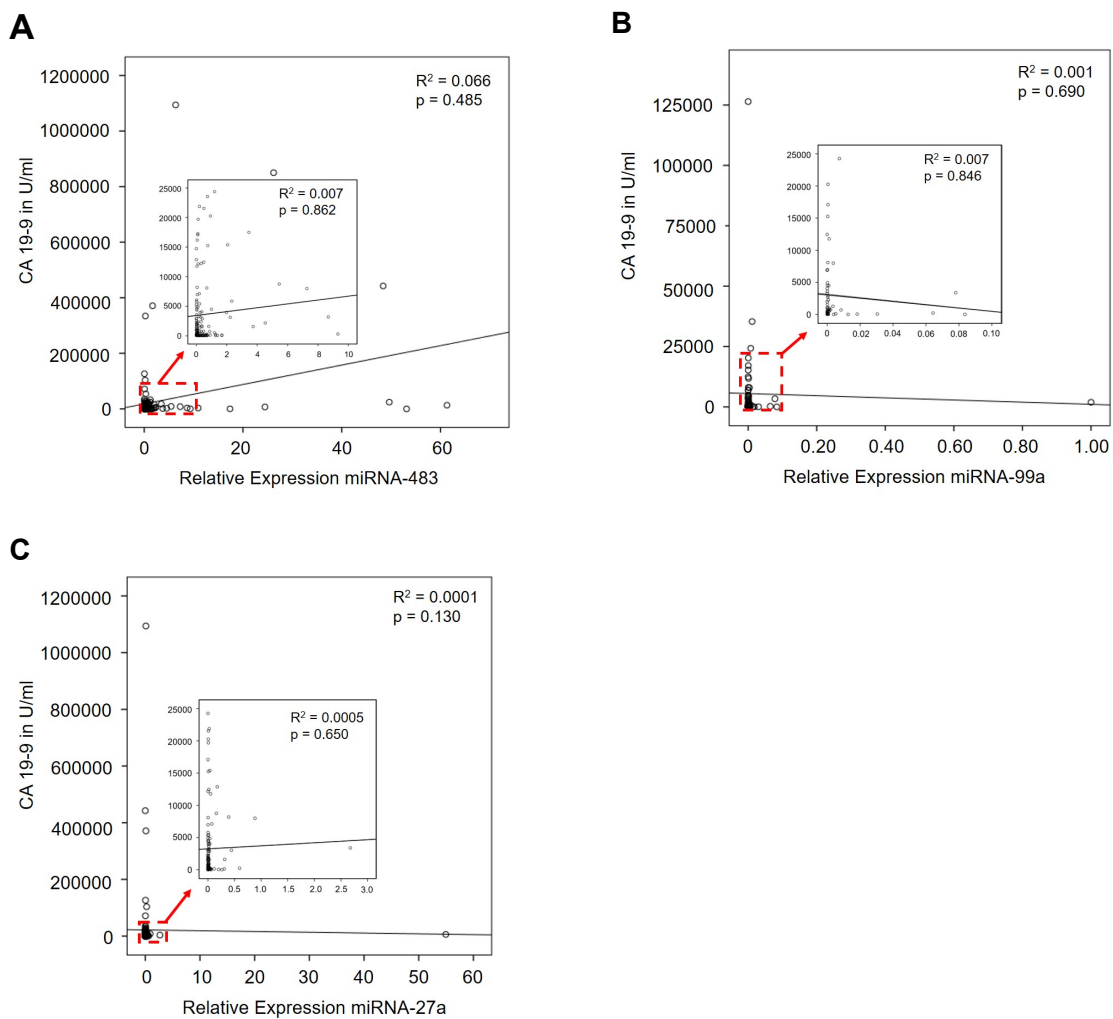
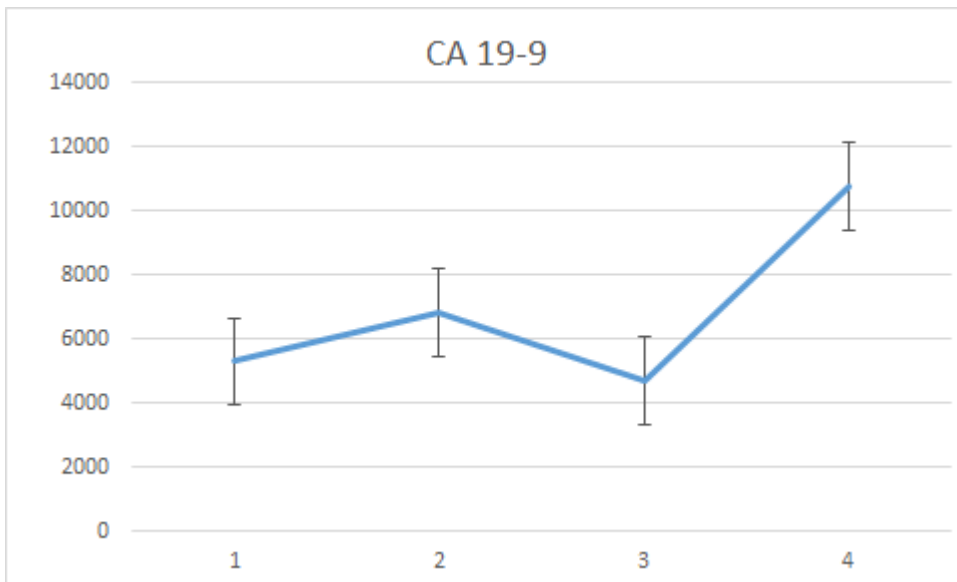


Abbildung 17: **Korrelation der CA 19-9 Werte mit den exosomalen Niveaus von miR-483 (A), miR-99a (B) und miR-27a (C)** der 36 Patienten mit Pankreaskarzinom. Im Streudiagramm ist eine Vergrößerung der Ansammlung der gestreuten Punkte in der linken Ecke zu sehen. Die p-Werte wurden kalkuliert mittels Spearman-Rho-Test.

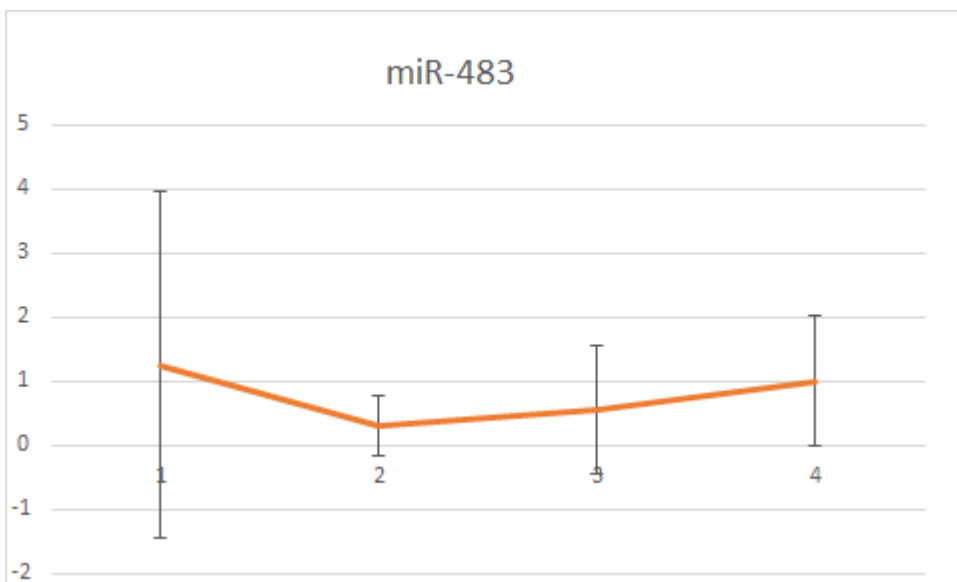
#### **4.8 Verlauf der Biomarker unter Chemotherapie**

Wie in Abbildung 18 dargestellt, wurden zusätzlich Liniendiagramme erstellt, welche die Expression der exosomalen miR-483 im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom im Verlauf der Durchführung einer Chemotherapie mit dem CA 19-9 Wert vergleichen. Es wurden die exosomale miR-483 und CA 19-9 im Serum vor Chemotherapie (1) und während der Chemotherapie (3 Verlaufswerte: 2, 3, 4) gemessen. Die Serumproben wurden jeweils im Abstand von etwa einem Monat unter Chemotherapie gewonnen. Der CA 19-9 als Verlaufsparemeter steigt stark in der 4. Verlaufsprobe an (A), während bei der Betrachtung von miR-483, diese miRNA im Verlauf der Chemotherapie keine Dynamik zeigt (B). Diese Ergebnisse fanden sich sowohl bei Betrachtung aller Patienten als auch bei alleiniger Betrachtung der Patienten mit Remission bzw. Progression unter Chemotherapie (Daten nicht gezeigt), und zeigt, dass die Chemotherapie keine Änderungen in der Befreiung der exosomalen miR-483 ins Blut hervorruft.

**A**



**B**



**Abbildung 18: Liniendiagramm zum Vorkommen von CA 19-9 (A) und der miR-483 (B) im zeitlichen Verlauf bei Patienten mit Pankreaskarzinom**

Der Verlauf der Therapie ist wie folgt gekennzeichnet: 1 ist vor Beginn der Chemotherapie; 2, 3 und 4 sind 3 Verlaufspuren unter Chemotherapie mit je einem Abstand von etwa 1 Monat.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede im Vorkommen exosomaler miRNAs im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu dem Vorkommen bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und bei Gesunden zu detektieren sowie im weiteren deren Verlauf unter einer Therapie zu beurteilen. Das Pankreaskarzinom hat eine schlechte Prognose, was einerseits durch ein invasives Wachstum und eine frühe Metastasierung und andererseits durch eine häufig spät auftretende Symptomatik begründet ist. Die zunächst unspezifische Symptomatik des Pankreaskarzinoms und das Fehlen von geeigneten Screeningmarkern führen häufig zu einer späten Diagnosestellung (Ilic et al., 2016). Der einzige zur Verfügung stehende Biomarker ist der für die Verlaufskontrolle eingesetzte Tumormarker CA 19-9, welcher jedoch hinsichtlich Spezifität und Sensitivität für das Pankreaskarzinom nur unzureichend geeignet ist (Loosen et al., 2017). Eine frühe Diagnosefindung ist für das Pankreaskarzinom insbesondere notwendig, da eine Operation die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit bietet und bei bestehenden Fernmetastasen nicht mehr realisierbar ist (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Sollte eine Operation nicht mehr möglich sein, ist ein rasches Erkennen des Therapieansprechens jedoch ebenso wichtig, um keine Zeit mit nicht wirksamen Therapien zu verlieren und somit die längst mögliche Überlebenszeit zu erreichen.

Ich untersuchte die Unterschiede im Vorkommen der exosomalen miRNAs miR-483, miR-99a und miR-27a bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu Patienten mit chronischer Pankreatitis und Gesunden. Für die miR-483 zeigte sich ein signifikant höheres Vorkommen in Exosomen von Patienten mit Pankreaskarzinom als bei Gesunden. Das Gen für die miR-483 befindet sich auf dem Chromosom 11, diese miRNA umfasst ebenfalls die zwei reifen Sequenzen miR-483-3p und miR-483-5p. In einer Studie von Abue et al. war die miR-483-3p im Plasma von Patienten mit Pankreaskarzinom ebenfalls signifikant höher exprimiert als bei Gesunden. Innerhalb dieser Studie konnte die miR-483-3p zwischen Patienten mit Pankreaskarzinom und Patienten mit intraduktaler

papillär-muzinöser Neoplasie des Pankreas (IPMN) unterscheiden (Abue et al., 2015). Auch Hao et al. konnten ein erhöhtes Vorkommen der miR-483-3p im Gewebe von Patienten mit Pankreaskarzinom verglichen mit Gewebe von Gesunden nachweisen (Hao et al., 2011). Bei anderen Tumorentitäten scheint die miR-483 ebenfalls eine Rolle zu spielen. So fand sich beispielsweise ein vermindertes Vorkommen der miR-483 bei Patienten mit Brustkrebs, Magenkarzinom oder kolorektalem Karzinom (Cui et al., 2019; Yu et al., 2018; Niu et al., 2018). Die miR-483 scheint über verschiedene Wege zu agieren. Beim Pankreaskarzinom, bei welchem die Studienlage eher darauf hinweist, dass die miR-483 vermehrt vorkommt, konnten Hao et al. zeigen, dass die miR-483-3p an die 3'-UTR der DPC4/Smad4 mRNA bindet. Weiterhin führte eine Überexpression von miR-483-3p zu einer verminderten Expression des DPC4/Smad4 Proteins (Hao et al., 2011). DPC4/Smad4 selbst ist an der Regulation der Transkription im TGF $\beta$ -Signalweg beteiligt und agiert hierbei als Tumorsuppressor (Rachagani et al., 2015). TGF $\beta$  ist ein Tumorsuppressor, welcher in Zellwachstum, Angiogenese oder auch Apoptose eingreift (Haque und Morris, 2017). Wie bereits erwähnt, scheint beim Brustkrebs die miR-483 vermindert vorzukommen. Hier konnten Cui et al. zeigen, dass die miR-483 über eine direkte Bindung an Sex determining region Y-box protein 3 (SOX-3) wirkt und die Expression von SOX-3 negativ mit dem Vorkommen von miR-483 korrelierte (Cui et al., 2019). SOX-3 gehört zur so genannten SOX Familie und ist ein Transkriptionsfaktor. Studien weisen darauf hin, dass SOX-3 in der Genese verschiedener Tumore eine Rolle spielt. So fanden Guo et al., dass eine Hemmung von SOX-3 schließlich zu einer Hemmung des Tumorwachstums beim Osteosarkom führt (Guo et al., 2018). Cai et al. sahen eine Hemmung des Tumorwachstums durch Inhibition von SOX-3 beim Ösophaguskarzinom (Cai et al., 2016). In der Studie von Yu et al., welche die Funktion der miR-483 beim Magenkarzinom untersuchten, schien die miR-483 über die direkte Bindung der 3'-UTR der O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase (OGT) zu wirken. MiR-483 hemmt hierbei die Expression der OGT und schließlich die Zellproliferation (Yu et al., 2018). Die unterschiedlichen Studienergebnisse und scheinbar

vielfältigen Wirkmechanismen der miR-483 und ihrer reifen Sequenzen erfordern weitere Studien, um die genaue Rolle dieser miRNA beim Pankreaskarzinom zu entschlüsseln. Weiterhin fand ich in meiner Studie für die exosomale miR-99a ein signifikant höheres Vorkommen im Vergleich der Patienten mit Pankreaskarzinom und Gesunden, aber auch im Vergleich der Patienten mit chronischer Pankreatitis und Gesunden. Stroese et al. fanden sowohl im Gewebe von Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) als auch in deren Plasma ein erhöhtes Vorkommen der miR-99a (Stroese et al., 2018). Dhayat et al. fanden eine Überexpression der miR-99a in Zelllinien von Patienten mit PDAC, welche Gemcitabine-resistent waren (Dhayat et al., 2015). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die miR-99a beim Pankreaskarzinom scheinbar als OnkomiR agiert. Demgegenüber stehen Studien, welche die Rolle der miR-99a bei anderen Tumorerkrankungen untersucht haben und zu anderen Ergebnissen kamen. So zeigten in etwa Ning et al. eine verminderte Expression der miR-99a im Gewebe von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (Ning et al., 2019). Roman-Canal et al. untersuchten die Expression der miR-99a in extrazellulären Vesikeln aus peritonealer Lavage von Patienten mit kolorektalem Karzinom und fanden ebenfalls ein vermindertes Vorkommen (Roman-Canal et al., 2019). Ein mögliches Zielprotein der miR-99a scheint der Insulin like growth factor 1 Rezeptor (IGF1R) zu sein. In einer Studie von Subramani et al. konnte dargestellt werden, dass die Abschaltung des IGF1R in Zelllinien des Pankreaskarzinoms das Tumorwachstum hemmt. IGF1R aktiviert verschiedene Signalwege, wie zum Beispiel PI3K/AKT oder MAPK, welche wiederum verschiedene Zielgene aktivieren und somit die Apoptose, Proliferation oder Transformierung steuern (Subramani et al., 2014). Allerdings war insbesondere in den Studien, die ein vermindertes Vorkommen von miR-99a bei anderen Tumorerkrankungen fanden, die miR-99a reziprok mit dem Vorkommen von IGF1R korreliert. Cheng et al. fanden ein deutlich vermindertes Vorkommen der miR-99a im Leberzellkarzinomgewebe sowie in dessen Zelllinien. Weiterhin sah man in dieser Studie, dass die miR-99a direkt an die 3'-UTR des IGF1R bindet und das Tumorwachstum hemmte (Cheng et al., 2018). Ebenso deuteten Ergebnisse weiterer Studien daraufhin,

dass die miR-99a in anderen Tumorentitäten wie beispielsweise dem Mundboden- oder Mammakarzinom über eine Repression des IGF1R eher als Tumorsuppressor agiert (Yen et al., 2014; Xia et al., 2016). Eine mögliche Erklärung für diese diskrepanten Daten könnte sein, dass verschiedene Tumorarten und Quellen untersucht wurden. Weiterhin sollten auch die unterschiedlich angewandten Techniken und Größen der Kohorten berücksichtigt werden. Sowohl in meiner Studie als auch in der Studie von Stroese et al. fand sich ein erhöhtes Vorkommen der miR-99a bei Patienten mit chronischer Pankreatitis verglichen mit Gesunden. Ein signifikanter Unterschied im Vorkommen der miR-99a zwischen Patienten mit Pankreaskarzinom und Patienten mit chronischer Pankreatitis zeigte sich jedoch nicht (Stroese et al., 2018). Eine weitere Studie, welche die miRNA Expression bei Patienten mit Pankreatitis untersucht hat, konnte eine vermehrte Expression der miR-99a bei Patienten mit Typ 1 Autoimmunpankreatitis im Vergleich zu Gesunden finden. Sie fanden jedoch keinen Unterschied in der Expression zwischen Patienten mit chronischer Pankreatitis und Gesunden (Nakamaru et al., 2020). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die miR-99a nicht zwischen diesen beiden Patientengruppen unterscheiden kann. Bezüglich der Rolle der miR-99a bei Pankreatitiden ist die Studienlage allerdings aktuell noch rar, sodass weitere Studien notwendig sind.

Für die miR-27a gibt es inzwischen vielfältige Untersuchungen, welche in unterschiedlichsten Tumorentitäten wie unter anderem dem Magenkarzinom oder dem kolorektalem Karzinom einen Zusammenhang der Expression der miR-27a und dem Tumorwachstum fanden (Zhuo et al., 2016; Bao et al., 2014). Zhuo et al. beschrieben eine onkogene Wirkung der mir-27a beim Magenkarzinom über das Zielgen B-cell translocation gene 2 (BTG2). Eine Hemmung der miR-27a bewirkte eine Überexpression von BTG2. Die Überexpression von BTG2 löste wiederum einen G1 / S-Zellzyklusstillstand aus, induzierte eine nachfolgende Apoptose und inhibierte weitere Signalwege (Zhuo et al., 2016). Bezüglich des Pankreaskarzinoms untersuchten Ma et al. ebenfalls mittels einer Hemmung der miR-27a die Auswirkung auf das Tumorwachstum.

Die 3'-UTR von Sprouty2 (Spry2) trägt mutmaßlich eine miR-27a-Bindungsstelle. Das Spry2-Protein weist im Adenokarzinom des Pankreas ein niedriges Expressionsniveau auf und konnte durch Inhibition der miR-27a hochreguliert werden. Spry2 hat einen antagonistischen Effekt im ERK/MAPK-Weg. Somit deutet eine Überexpression der miR-27a mit folgender Verringerung von Spry2 auf eine direkte onkogene Wirkung der miR-27a (Ma et al., 2010). In der von mir durchgeführten Studie gab es keinerlei Signifikanz bezüglich der exosomalen Expression der miR-27a und dem Tumorwachstum beziehungsweise der Metastasierung.

Zusammenfassend zeigen meine Ergebnisse eine erhöhte Anreicherung der Exosomen mit miR-483 und miR-99a bei Patienten mit Pankreaskarzinom. Somit eignet sich eine Analyse der exosomalen Niveaus der miR-483 und miR-99a im Serum zur Detektion eines Pankreaskarzinoms. Da die erhöhte exosomale Anreicherung im Verlauf der Chemotherapie bestehen bleibt, scheint es zum aktuellen Zeitpunkt als seien sie kein geeigneter Parameter zur Beurteilung des Therapieansprechens des Pankreaskarzinoms. Möglicherweise steckt in der Persistenz der Erhöhung der angereicherten miRNAs eine Begründung für die schlechte Prognose der Patienten mit Pankreaskarzinom. Um die vielfältigen Mechanismen und Auswirkungen der miR-483 und miR-99a beim Pankreaskarzinom zu entschlüsseln sind weitere Studien notwendig.



## 6 Zusammenfassung

Beim Pankreaskarzinom handelt es sich um eine Krebserkrankung mit einer sehr schlechten Prognose. Sie ist gekennzeichnet durch invasives Wachstum mit einer sehr frühen Metastasierung. Bedingt durch eine in der Regel verzögert auftretenden und unspezifischen Symptomatik kommt es häufig erst sehr spät zur Diagnosestellung. Der aktuell einzig valide Tumormarker CA 19-9 ist hinsichtlich Spezifität und Sensitivität nicht als Screeningmarker geeignet und wird somit hauptsächlich zur Verlaufskontrolle eingesetzt. Die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit bietet eine Operation, welche vor der Entstehung von Fernmetastasen stattfinden muss. Um zukünftig mehr Betroffene einer kurativen Therapie zuführen zu können, ist es notwendig neue Biomarker, die sich für eine frühe Diagnosefindung eignen, zu etablieren. Des Weiteren wird auch im palliativen Therapieverlauf ein Marker benötigt, welcher zuverlässig ein Ansprechen oder eben ein Nicht-Ansprechen des Tumors auf eine Chemotherapie anzeigt, um gegebenenfalls einen raschen Therapiewechsel zu ermöglichen. Vielversprechend sind diesbezüglich exosomale miRNAs, da sie bei Tumorerkrankungen häufig dereguliert sind. MiRNAs sind kurzkettige nicht-kodierende RNA Moleküle und maßgeblich an Prozessen wie der Inhibition der Genexpression beziehungsweise der Proteinsynthese beteiligt. Sie gelangen durch Apoptose oder Nekrose in die Blutzirkulation oder werden auch in Exosomen integriert und aktiv in ihre Umgebung abgegeben. Exosomen gehören zur Gruppe extrazellulärer Vesikel und spielen eine Rolle in der Zell-zu-Zell-Kommunikation. Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen der miR-483, miR-99a und miR-27a in Exosomen im Serum von 36 Patienten mit Pankreaskarzinom mit demjenigen von 10 Patienten mit chronischer Pankreatitis und 10 gesunden Probanden zu vergleichen, um zu bestimmen ob diese miRNAs als diagnostische und prognostische Marker für das Pankreaskarzinom geeignet sind. Des Weiteren wurde die Expression der exosomalen miR-483, miR-99a und miR-27a im Verlauf einer Chemotherapie untersucht, um zu bestimmen inwiefern sie als Verlaufsparemeter beim Pankreaskarzinom geeignet sind.

Hierfür wurde von jedem der Patienten mit Pankreaskarzinom eine Probe vor Beginn der Chemotherapie sowie nachfolgend 3 Proben im Abstand von etwa einem Monat analysiert. Die miRNA-Messungen erfolgten mittels TaqMan real-time PCR und wurden anschließend statistisch mit den klinisch-pathologischen Parametern und in Subgruppen der Patienten ausgewertet. Die Präparation der Exosomen wurde durch Western Blot verifiziert und quantifiziert. Es zeigte sich, dass die exosomalen Niveaus der Patienten mit Pankreaskarzinom sowie mit chronischer Pankreatitis im Vergleich zu den Gesunden erhöht waren. Es scheint als würden maligne wie auch benigne Erkrankungen eine erhöhte Ausschüttung von Exosomen ins Blut bewirken. Ein signifikanter Unterschied der exosomalen Transkriptmenge konnte für die miR-483 und miR-99a zwischen Patienten mit einem Pankreaskarzinom und Gesunden sowie für die miR-99a zwischen Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Probanden gezeigt werden. Bei Betrachtung der Subgruppen zeigte sich sowohl bei Patienten mit Remission unter Chemotherapie als auch bei Patienten mit Progress beziehungsweise stabilem Verlauf unter Chemotherapie ein signifikant höheres Vorkommen der exosomalen miR-483 und miR-99a im Vergleich zu gesunden Probanden. Die erhöhte Anreicherung der Exosomen mit miR-483 und miR-99a blieb im Verlauf der Chemotherapie ohne große Dynamik bestehen, wodurch eine Beurteilung des Therapieansprechens nicht möglich war. Die Persistenz der erhöhten Niveaus exosomaler miRNAs begründet möglicherweise die schlechte Prognose der Patienten mit Pankreaskarzinom. Des Weiteren konnte auch keine signifikante Korrelation der miRNAs mit den klinisch-pathologischen Parametern oder mit dem etablierten Marker CA 19-9 entdeckt werden.

Zusammenfassend zeigen meine Daten die Deregulation von miRNAs in Exosomen im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom und Patienten mit chronischer Pankreatitis und ihre diagnostische Relevanz.

## 7 Abstract

Pancreatic carcinoma is a carcinogenic disease with a very unfavorable prognosis. It is characterized by an invasive growth followed by an early metastasis. Due to a generally delayed and unspecific symptomatology, diagnosis is often made at a very late stage. Currently, the only valid tumor marker CA 19-9 is not suitable as a screening marker, regarding its specificity and sensitivity, and is therefore mainly used for monitoring disease progression. The only curative treatment option is surgery that has to be carried out before the formation of distant metastases. In order to provide more patients with a curative treatment in the future, it is necessary to establish new biomarkers qualified for an early diagnosis. Furthermore, a marker that reliably indicates a response or, respectively, a non-response of the tumor to chemotherapy is also needed during the palliative therapeutic process, to quickly change the therapy strategies. In this respect, exosomal miRNAs are very promising, as they are often deregulated during tumor diseases. MiRNAs are short-chained, non-coding RNA molecules, and significantly involved in processes, such as inhibition of gene expression, respective protein synthesis. They are released into the blood circulation by apoptosis or necrosis, or are also integrated into exosomes and then actively shed into their environment. Exosomes belong to the group of extracellular vesicles and play a role in cell-to-cell communication. The aim of this study was to compare the occurrence of miR-483, miR-99a and miR-27a in exosomes in the serum of 36 patients suffering from pancreatic carcinoma with that of 10 patients suffering from chronic pancreatitis and of 10 healthy subjects, to define whether these miRNAs are suitable as diagnostic and prognostic markers for pancreatic carcinoma. In addition, the expression of exosomal miR-483, miR-99a and miR-27a during the course of the chemotherapy was analyzed, to determine their suitability as progression parameters for pancreatic carcinoma. In this regard, a sample before the beginning of chemotherapy, as well as three follow-up samples at approximately one-month-intervals from each patient suffering from pancreatic carcinoma were analyzed. The miRNA measurements were

carried out by TaqMan real-time PCR and subsequently statistically evaluated using the clinical-pathological parameters and subgroups of the patients. The preparation of the exosomes was verified and quantified by Western Blot. The exosomal levels of the patients suffering from pancreatic carcinoma, as well as those with chronic pancreatitis showed to be elevated compared to those of the healthy subjects. It seems that malignant, as well as benign diseases cause an increased release of exosomes into the blood. A significant difference of the exosomal transcript levels could be shown for miR-483 and miR-99a between patients suffering from pancreatic carcinoma and healthy subjects, as well as for miR-99a between patients suffering from chronic pancreatitis and the healthy probands. Considering the subgroups, a significantly higher occurrence of exosomal miR-483 and miR-99a was found for patients with remission under chemotherapy, as well as for patients with progress or stable disease under chemotherapy compared to that of the healthy probands. The increased enrichment of the exosomes with miR-483 and miR-99a did not show any striking dynamics during the course of the chemotherapy, so that an evaluation of the treatment response was not possible. The persistence of the increased levels of exosomal miRNAs may be caused by the unfavorable prognosis of patients with pancreatic carcinoma. In addition, no significant correlation of the miRNAs with the clinical-pathological parameters or with the established marker CA 19-9 could be detected. To sum up, my data show the deregulation of miRNAs in exosomes in the serum of patients suffering from pancreatic carcinoma and their diagnostic relevance.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AGO	Argonautenproteine
AKT	Proteinkinase B
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APS	Ammoniumpersulfat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
AZ	Allgemeinzustand
BRCA	Breast Cancer
BSC	Best supportive care
BTG2	B-cell translocation gene 2
bzw.	Beziehungsweise
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
Cq	Quantification Cycle
CT	Computertomographie
DGCR8	DiGeorge Critical Region 8
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPC4	Deleted in pancreatic carcinomas locus 4
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	Enhanced luminol-based chemiluminescent substrate
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGF	Epidermal growth factor

ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FA	Folinic acid
FOLFIRINOX	Kombinationstherapie mit 5-Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin
g	Gramm + Einheit der Zentrifugalbeschleunigung
GlcNAc	N-acetylglucosamine
HIV	Human immunodeficiency virus
IGF1R	Insulin like growth factor 1 receptor
ILV	Intraluminale Vesikel
IPMN	Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie des Pankreas
kD	Kilodalton
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
L	Liter
M	Metastasen
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	MAP kinase
MEK	MAP kinase extracellular signal-regulated kinase
MHC	Major histocompatibility complex
miRISC	MiRNA-induced silencing complex
miRNAs	Micro ribonucleic acid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRCP	Magnetresonanztomographie mit Cholangiopankreatikographie
mRNA	Messenger ribonucleic acid

MRT	Magnetresonanztomographie
MVB	Multivesikuläre Körper
N	Nodus = Lymphknoten
NET	Neuroendokrine Tumore
nm	Nanometer
OFF	Kombinationstherapie mit 5-Fluorouracil, Folinsäure, Oxaliplatin
OGT	O-linked N-acetylglucosamine Transferase
p	Probabilitas = Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Protonen
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
pre-miRNA	Precursor-miRNA
pri-miRNA	Primary-miRNA
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
R	Residualtumor
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RIPA	Radio immunoprecipitation assay buffer
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid

rpm	Rotations per minute
RREB	Ras-Responsive-Element-Bindungsprotein
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
s. a.	siehe auch
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfat polyacrylamid Gelelektrophorese
Smad4	Small mothers against decapentaplegic 4
SOX-3	Sex determining region Y-box protein 3
Spry2	Sprouty2
T	Tumor
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline + Tween 20
TE	Tris EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
U	Units
u. a.	und andere
UICC	Union internationale contre le cancer
UTR	Untranslatierte Region
V	Volt
XPO5	Exportin 5



5-FU	5-Fluorouracil
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
%	Prozent

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	1	Anatomie des Pankreas	2
Abbildung	2	Prozentualer Anteil der häufigsten Krebssterbefälle bei Frauen und Männern in Deutschland 2016	5
Abbildung	3	Vergleich der Überlebensrate nach Lokalisation und Geschlecht, Deutschland 2015 - 2016	6
Abbildung	4	Therapiestruktur beim Adenokarzinom des Pankreas	12
Abbildung	5	Algorithmus für die palliative medikamentöse Tumorthherapie	15
Abbildung	6	Schematische Darstellung der Biogenese von Exosomen	18
Abbildung	7	Extrazelluläre Vesikel können auf verschiedenen Wegen die Empfängerzelle beeinflussen	20
Abbildung	8	Biogenese und Funktion der miRNAs	23
Abbildung	9	Aktive und passive Befreiung der miRNAs in die Blutzirkulation	24
Abbildung	10	Schematischer Aufbau für den Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF Membran	37
Abbildung	11	Arbeitsablauf mit dem TaqMan® miRNA ABC Purification Kit	39
Abbildung	12	Messung der Hämolyse in den Serumproben	46
Abbildung	13	Immundetektion isolierter Exosomen aus Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom	47

Abbildung	14	Niveaus der exosomalen miR-483 (A), miR-99a (B) und miR-27a (C)	48
Abbildung	15	Vergleich der Niveaus der exosomalen miR-483 (A), miR-99a (B) und miR-27a (C) im Serum von 20 Patienten mit Pankreaskarzinom und Remission unter Chemotherapie	50
Abbildung	16	Vergleich der Niveaus der exosomalen miR-483 (A), miR-99a (B) und miR-27a (C) im Serum von 15 Patienten mit Pankreaskarzinom und Progress unter Chemotherapie	51
Abbildung	17	Korrelation der CA 19-9 Werte mit den exosomalen Niveaus von miR-483 (A), miR-99a (B) und miR-27a (C)	52
Abbildung	18	Liniendiagramm zum Vorkommen von CA 19-9 (A) und der miR-483 (B) im zeitlichen Verlauf bei Patienten mit Pankreaskarzinom	54

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle	1	TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms	4
Tabelle	2	UICC/AJCC Tumorstadien	4
Tabelle	3	Alter- und Verdachtsgradadaptiertes diagnostisches Vorgehen bei neu aufgetretenen Oberbauch- und Rückenschmerzen	8
Tabelle	4	Einteilung des Residualtumors (R) nach Tumorresektion	10
Tabelle	5	Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status	13
Tabelle	6	Übersicht der Eigenschaften extrazellulärer Vesikel	16
Tabelle	7	Zusammensetzung der Elektrophoresegele	36
Tabelle	8	Demographische und klinische Eigenschaften der Studienpopulation	44

## 11 Referenzen

Abue M, Yokoyama M, Shibuya R, Tamai K, Yamaguchi K, Sato I, Tanaka N, Hamada S, Shimosegawa T, Sugamura K, Satoh K (2015): Circulating miR-483-3p and miR-21 is highly expressed in plasma of pancreatic cancer. *International journal of oncology* 46(2): 539-47.

Adzersen KH (2010): *Handbuch der allgemeinen Tumordokumentation*. NCT Krebsregister: 177.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2003): *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. *Annals of Botany* 91(3): 401.

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: 31.03.2020, 19:30].

Bao Y, Chen Z, Guo Y, Feng Y, Li Z, Han W, Wang J, Zhao W, Jiao Y, Li K, Wang Q, Wang J, Zhang H, Wang L, Yang W (2014): Tumor suppressor microRNA-27a in colorectal carcinogenesis and progression by targeting SGPP1 and Smad2. *PLOS ONE* 9(8).

Bartel DP, Chen CZ (2004): Micromanagers of gene expression: The potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nature Reviews Genetics* 5: 396-400.

Benson AB (2007): Adjuvant therapy for pancreatic cancer: one small step forward. *JAMA* 297(3): 311-313.

Bilderzweig - fotolia.com: Anatomie des Pankreas. [Online im Internet] URL: [https://stock.adobe.com/de/images/anatomie-der-bauchspeicheldruse-deutsch/62873861?prev\\_url=detail](https://stock.adobe.com/de/images/anatomie-der-bauchspeicheldruse-deutsch/62873861?prev_url=detail) [Stand: 31.03.2020, 19:12].

Birth M, Ittel TH, Pereira PL (2011): Hepatobiliäre und Pankreastumoren. Interdisziplinäres Vorgehen. Berlin Heidelberg New York (Springer-Verlag): 91.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006): RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* 13: 1097-1101.

Bruennert D (2010): Molekulare Wirkmechanismen von Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie. Thesis [Online im Internet] URL: [https://www.researchgate.net/figure/Abbildung-24-Schematischer-Aufbau-des-Western-Blots-Die-im-Gel-aufgetrennten-Proteine\\_fig2\\_44842234](https://www.researchgate.net/figure/Abbildung-24-Schematischer-Aufbau-des-Western-Blots-Die-im-Gel-aufgetrennten-Proteine_fig2_44842234) [Stand: 15.04.2020, 23:12].

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM (2002): Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 15524-15529.

Cai QY, Liang GY, Zheng YF, Tan QY, Wang RW, Li K (2016): Sox3 silencing inhibits metastasis and growth of esophageal squamous cell carcinoma cell via down-regulating GSK-3 $\beta$ . *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 9(3): 2939-2949.

Catalonotto C, Cogoni C, Zardo, G (2016): MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Function. *International Journal of Molecular Sciences* 17(10).

Cheng H, Xue J, Yang S, Chen Y, Wang Y, Zhu Y, Wang X, Kuang D, Ruan Q, Duan Y, Wang G (2017): Co-targeting of IGF1R/mTOR pathway by miR-497 and miR-99a impairs hepatocellular carcinoma development. *Oncotarget* 8(29): 47984-47997.

Cui K, Zhang H, Wang GZ (2019): MiR-483 suppresses cell proliferation and promotes cell apoptosis by targeting SOX3 in breast cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 23: 2069-2074.

Dhayat SA, Mardin WA, Seggewiß J, Ströse AJ, Matuszcak C, Hummel R, Senninger N, Mees ST, Haier J (2015): MicroRNA Profiling Implies New Markers of Gemcitabine Chemoresistance in Mutant p53 Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLOS ONE* 10(11).

Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. (2018): Leitlinie Pankreaskarzinom. *Onkopedia*. [Online im Internet] URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/pankreaskarzinom/@@guideline/html/index.html> [Stand: 31.03.2020, 19:23].

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwarztld LH, Sargente D, Ford R, Dancey J, Arbuckh S, Gwytheri S, Mooneyg M, Rubinsteing L, Shankarg L, Doddg L, Kaplanj R, Lacombec D, Verweijk J (2009): New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer* 45: 228-247.

Gámez B, Rodriguez-Carballo E, Ventura F (2014): MicroRNAs and post-transcriptional regulation of skeletal development. *Journal of Molecular Endocrinology* 52(3): 179-197.

Glimelius B, Hoffman K, Sjöden PO, Jacobsson G, Sellström H, Enander LK, Linné T, Svensson C (1996): Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer, *Annals of oncology* 7(6): 593-600.

Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010): Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466(7308): 835-840.

Guo Y, Yin J, Tang M, Yu X (2018): Downregulation of SOX3 leads to the inhibition of the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells. *International journal of oncology* 52(4): 1277-1284.

Hackert T, Sachsenmaier M, Hinz U, Schneider L, Michalski CW, Springfield C, Strobel O, Jäger D, Ulrich A, Büchler MW (2016): Locally Advanced Pancreatic Cancer: Neoadjuvant Therapy With Folfirinox Results in Resectability in 60% of the Patients. *Annals of surgery* 264(3): 457-463.

Hammond SM (2006): RNAi, microRNAs, and human disease. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 58: 63-68.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN (2006): Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha–DGCR8 complex. *Cell* 125(5): 887-901.

Hao J, Zhang S, Zhou Y, Hu X, Shao C (2011): MicroRNA 483-3p suppresses the expression of DPC4/Smad4 in pancreatic cancer. *FEBS Letters* 585(1): 207-213.

Haque S, Morris JC (2017): Transforming growth factor- $\beta$ : A therapeutic target for cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 13(8): 1741-1750.

Hessvik NP, Llorente A (2018): Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and molecular life sciences* 75(2): 193-208.



Ilic M, Ilic I (2016): Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* 22(44): 9694-9705.

John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2004): Human MicroRNA targets. *PLoS biology* 2(11).

Kahlert C, Rahbari N, Reißfelder C, Weitz J (2015): Tumor-spezifische Exosomen: hochsensitive Diagnostikmarker für die Früherkennung von gastrointestinalen Karzinomen. *Passion Chirurgie* 5(11).

Kalluri, R (2016): The biology and function of exosomes in cancer. *The Journal of clinical investigation* 126(4): 1208-1215.

Kang MJ, Jang JY, Chang YR, Kwon W, Jung W, Kim SW (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. *Annals of surgical oncology* 21(5): 1545-1551.

Keller S (2009): Charakterisierung und funktionelle Analyse von Exosomen aus humanen Körperflüssigkeiten. [Online im Internet] URL:

[https://www.google.com/url?q=http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/9167/1/Dissertation\\_Sascha\\_Keller.pdf&sa=D&ust=1585992480133000&usg=AFQjCNGLIVGGSzA2cG4xtrjXuLo9FG0aXg](https://www.google.com/url?q=http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/9167/1/Dissertation_Sascha_Keller.pdf&sa=D&ust=1585992480133000&usg=AFQjCNGLIVGGSzA2cG4xtrjXuLo9FG0aXg) [Stand: 31.03.2020, 19:41].

Kent OA, Fox-Talbot K, Halushka MK (2013): RREB1 repressed miR-143/145 modulates KRAS signaling through downregulation of multiple targets. *Oncogene* 32(20): 2576-2585.

Kloosterman WP, Plasterk RH (2006): The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Developmental cell* 11: 441-450.

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

Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen XM, Xu YM, Huang LF, Wang X (2015): Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *The Scientific World Journal*.

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

Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, Buchanan M, Hosein AN, Basik M, Wrana JL (2012): Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 151(7): 1542-1556.

Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004): Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303(5654): 95-98.

Ma Y, Yu S, Zhao W, Lu Z, Chen J (2010): MiR-27a regulates the growth, colony formation and migration of pancreatic cancer cells by targeting Sprouty2. *Cancer letters* 298 (2): 150-158.

Maia J, Caja S, Strano Moraes MC, Couto N, Costa-Silva B (2018): Exosome-Based Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in cell and developmental biology* 6(18).

Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, Qiu L, Vitkin E, Perelman LT, Melo CA, Lucci A, Ivan C, Calin GA, Kalluri R (2014): Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell* 26(5): 707-721.

Nakamaru K, Tomiyama T, Kobayashi S, Ikemune M, Tsukuda S, Ito T, Tanaka T, Yamaguchi T, Ando Y, Ikeura T, Fukui T, Nishio A, Takaoka M, Uchida K, Leung PSC, Gershwin ME, Okazaki K (2020): Extracellular vesicles microRNA analysis in type 1 autoimmune pancreatitis: Increased expression of microRNA-21. *Pancreatology*.

Ning S, Liu H, Gao B, Wei W, Yang A, Li J, Zhang L (2019): miR-155, miR-96 and miR-99a as potential diagnostic and prognostic tools for the clinical management of hepatocellular carcinoma. *Oncology letters* 18(3): 3381-3387.

Niu ZY, Li WL, Jiang DL, Li YS, Xie XJ (2018): Mir-483 inhibits colon cancer cell proliferation and migration by targeting TRAF1. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 34(9): 479-486.

Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, Chivukula R, Kent OA, Mendell JT, Maitra A (2011): Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Molecular cancer therapeutics* 10(8): 1470-1480.

Tehfe M, Dowden S, Kennecke H, El-Maraghi R, Lesperance B, Couture F, Letourneau R, Liu H, Romano A (2016): nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine Versus Gemcitabine in Patients with Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: Canadian Subgroup Analysis of the Phase 3 MPACT Trial. *Advances in therapy* 33(5): 747-759.

Palmer KR, Kerr M, Knowles G, Cull A, Carter DC, Leonard RC (1994): Chemotherapy prolongs survival in inoperable pancreatic carcinoma. *The british journal of surgery* 81(6): 882-885.

Rachagani S, Macha MA, Menning MS, Dey P, Pai P, Smith LM, Mo YY, Batra SK (2015): Changes in microRNA (miRNA) expression during pancreatic cancer development and progression in a genetically engineered KrasG12D; Pdx1-Cre mouse (KC) model. *Oncotarget* 6(37): 40295-40309.

Rawat M, Kadian K, Gupta Y, Kumar A, Chain PSG, Kovbasnjuk O, Kumar S, Parasher G (2019): MicroRNA in Pancreatic Cancer: From Biology to Therapeutic Potential. *Genes* 10(10).

Reiners KS, Dassler-Plenker J, Coch C, Hartmann G (2017): Funktion von extrazellulären Vesikeln und Bedeutung für die labormedizinische Diagnostik. *Journal of Laboratory Medicine* 41(6).

Reißfelder C, Rahbari NN, Koch M, Büchler MW, Weitz J (2008): Allgemein- und Viszeralchirurgie up2date: Pankreaskarzinom und periampulläre Karzinome. KG Stuttgart New York (Georg Thieme Verlag): 229-248.

Robert Koch-Institut (2019): Krebs in Deutschland für 2015/2016: Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: 12. Ausgabe.

Roman-Canal B, Moiola CP, Gatus S, Bonnin S, Ruiz-Miró M, González E, González-Tallada X, Llordella I, Hernández I, Porcel JM, Gil-Moreno A, Falcón-Pérez JM,

Ponomarenko J, Matias-Guiu X, Colas E (2019): EV-Associated miRNAs from Peritoneal Lavage are a Source of Biomarkers in Endometrial Cancer. *Cancers* 11(6): 839.

Roth C, Rack B, Müller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H (2010): Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research* 12(6).

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, Nishida N, Calin GA, Pantel K (2014): Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature reviews. Clinical oncology* 11(3): 145-156.

Siewert J R, Rothmund M, Schumpelick V (2006): *Praxis der Viszeralchirurgie: Gastroenterologische Chirurgie*. Berlin Heidelberg New York (Springer-Verlag): 681-687.

Subramani R, Lopez-Valdez R, Arumugam A, Nandy S, Boopalan T, Lakshmanaswamy R (2014): Targeting insulin-like growth factor 1 receptor inhibits pancreatic cancer growth and metastasis. *PLOS ONE* 9(5).

SU2C-ACS Lung Cancer Dream Team (2020): [Online im Internet] URL: <https://www.lungcancerdreamteam.org/kras-lung-cancer/the-kras-mutation> [Stand: 31.03.2020, 19:50].

Stroese AJ, Ullerich H, Koehler G, Raetzl V, Senninger N, Dhayat SA (2018): Circulating microRNA-99 family as liquid biopsy marker in pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 144: 2377-2390.

Thermo Fisher Scientific: TaqMan miRNA ABC Purification Kit. Workflow. [Online im Internet] URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/mirna-ncrna-taqman-assays/taqman-mirna-abc-purification-kit.html> [Stand: 31.03.2020, 19:58].

Wittekind C (2017): TNM Klassifikation maligner Tumoren. Weinheim (Wiley-VCH Verlag).

Xia M, Li H, Wang JJ, Zeng HJ, Wang SH (2016): MiR-99a suppress proliferation, migration and invasion through regulating insulin-like growth factor 1 receptor in breast cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 20(9):1755-1763.

Xu B, Liu J, Xiang X, Liu S, Zhong P, Xie F, Mou T, Lai L (2018): Expression of miRNA-143 in Pancreatic Cancer and Its Clinical Significance. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 33(9).

Yen Y, Shiah S, Chu H, Hsu YM, Hsiao JR, Chang JY, Hung WC, Liao CT, Cheng AJ, Lu YC, Chen YW (2014): Reciprocal regulation of MicroRNA-99a and insulin-like growth factor I receptor signaling in oral squamous cell carcinoma cells. *Molecular Cancer* 13(6).

Yu FY, Zhou CY, Liu YB, Wang B, Mao L, Li Y (2018): miR-483 is down-regulated in gastric cancer and suppresses cell proliferation, invasion and protein O-GlcNAcylation by targeting OGT. *Neoplasma* 65(3): 406-414.

Zhou L, Liang X, Zhang L, Yang L, Nagao N, Wu H, Liu C, Lin S, Cai G, Liu J (2016): MiR-27a-3p functions as an oncogene in gastric cancer by targeting BTG2. *Oncotarget* 7(32): 51943-51954.

## 12 Danksagung

“In jede hohe Freude mischt sich eine Empfindung der Dankbarkeit.”

Marie von Ebner-Eschenbach (1911) Aphorismen

Abschließend möchte ich in wahrlich hoher Freude mit ein paar kurzen Worten meinen Dank aussprechen.

Zuallererst bedanke ich mich ganz besonders bei Frau Priv.-Doz. Dr. Heidi Schwarzenbach für die so zahlreich investierten Stunden in meine Betreuung, für die hilfreichen Anregungen, den wissenschaftlichen Rat und das Engagement.

Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel, dem Direktor des Instituts für Tumorbilogie, danke ich für die Möglichkeit in einem so spannenden Arbeitsumfeld meine Arbeit anfertigen zu können.

Ein großer Dank geht an die Kollegen der Arbeitsgruppe Schwarzenbach Frau Bettina Steinbach, Frau Dr. Ines Stevic und Silke Klapdor für die Geduld während der Einführung in die Arbeitsabläufe, die Hilfsbereitschaft, die Unterstützung bei Fehlersuchen und die lieben Worte in der gesamten Zeit.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Tumorbilogie für die Hilfsbereitschaft bei logistischen und technischen Problemen bedanken.

Ich danke meiner gesamten Familie für die lieben Worte und die Unterstützung während des Studiums und der Arbeit an dieser Doktorarbeit.

Der größte Dank geht an meinen Freund und meinen Sohn für das Verständnis, die Unterstützung und den steten Zuspruch trotz der vielen abwesenden Stunden.

## 13 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.



## **14 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: .....