

Aus dem Pathologischen Institut der Medizinischen Fakultät Mannheim
Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Marx

Immunhistochemische und molekulargenetische Charakterisierung von Pankreaskarzinomen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Dominik Alexander Haas

aus
Ulm
2019

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Alexander Marx

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Das Pankreas Anatomische Lage und Funktion	3
1.2 Inzidenz des Pankreaskarzinoms	3
1.3 Mortalität und Prognose	4
1.4 Klassifikation des Pankreaskarzinoms	4
1.4.1 Neuerungen der Klassifikation	6
1.5 Risikofaktoren	7
1.6 Diagnose und Therapie	9
1.7 Molekulargenetische Aspekte zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms ..	10
1.7.1 KRAS	10
1.7.2 c-Myc	12
1.7.3 p16	14
1.7.4 p53	16
1.7.5 uPAR und uPA	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Patientenkollektiv und Datenerhebung	19
2.2 KRAS-Mutationsanalyse	20
2.2.1 Allgemeine Chemikalien	20
2.2.2 Material für die DNA-Extraktion	20

2.2.3	Material für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.2.4	Material für die Sequenzierung	20
2.2.5	Geräte für die KRAS-Bestimmung	21
2.2.6	Entparaffinierung	21
2.2.7	DNA-Extraktion	21
2.2.8	Konzentrationsbestimmung der DNA	22
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.2.10	Prinzip der Sequenzierung	24
2.3	FISH (Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung)	26
2.3.1	Material für die FISH-Analyse	26
2.3.2	Geräte und Materialien	26
2.3.3	Material für die Mikroskopie	26
2.3.4	Prinzip der FISH	27
2.3.5	Versuchsprotokoll FISH c-Myc	28
2.3.6	Versuchsprotokoll uPAR-FISH	29
2.3.7	Auswertung der FISH	30
2.4	Immunhistochemische Färbungen	31
2.4.1	Prinzip der immunhistochemischen Färbung	31
2.4.2	Materialien zur immunchemischen Färbung	31
2.4.3	Ablauf der immunhistochemischen Färbung	31
2.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	32
2.5.1	Prinzip der Färbung	32
2.5.2	Material für die HE-Färbung	32
2.5.3	Ablauf der Färbung	33
3	ERGEBNISSE	34

3.1	Allgemeine Auswertung	34
3.2	Alter	34
3.3	Überlebenszeit	34
3.4	Tumorstadium	35
3.5	Resektionsstatus	36
3.6	Veneninvasion	36
3.7	Perineuralscheideninfiltration	37
3.8	Lymphgefäßinvasion	37
3.9	Lymphknotenstatus	38
3.9.1	Lymphknotenmetastasen und Lymphgefäßinvasion	38
3.10	Grading	39
3.11	Histologische und molekulargenetische Auswertung	40
3.11.1	Immunhistochemische p16-Färbung	40
3.11.2	Immunhistochemische p53-Färbung	42
3.11.3	Immunhistochemische c-Myc-Färbung	43
3.11.4	c-Myc-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	44
3.11.5	uPAR-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	45
3.11.6	KRAS-Mutationsanalyse	47
3.12	Datentabelle	47
4	DISKUSSION	49
4.1	Überlebenszeit	49
4.2	Patientenalter	49
4.3	Lymphknotenstatus, Lymphgefäß- und Veneninvasion, Resektionsstatus, Perineuralscheideninfiltration	50
4.4	Grading	51

4.5	p16	52
4.6	p53	54
4.7	c-Myc-immunhistochemische Färbung	56
4.8	c-Myc-FISH	57
4.9	uPAR-FISH	59
4.10	KRAS	60
5	ZUSAMMENFASSUNG	62
6	LITERATURVERZEICHNIS	63
7	LEBENS LAUF	72
8	DANKSAGUNG	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-FU= 5-Fluoruracil
AS= Aminosäure
A= Ala= Alanin
G= Gly= Glycin
V= Val= Valin
R= Arg= Arginin
D= Asp= Asparaginsäure
C= Cys= Cystein
S= Ser= Serin
ADP= Adenosindiphosphat
AK= Antikörper
ATP= Adenosintriphosphat
ATM= ataxia telangiectasia mutated (Erkennung von DNA Schäden)
ATR= ataxia telangiectasia and Rad3 related protein (Erkennung von DNA Schäden)
AMP= Adenosinmonophosphat
AMPK= AMP-activated protein kinase
Bcl2= B-cell lymphoma 2
BMI= Body Mass Index
°C= Grad Celsius
CA 19-9 = carbohydrate antigen 19-9 (Tumormarker)
CDC25= cell division cycle
CDK= cyclin dependent kinase
CHK1 und CHK2= checkpoint kinase 1 und 2
cyt= cytoplasmatische Färbung
DNA= Desoxyribonukleinsäure
dNTP= Desoxyribonukleosidtriphosphate
EGFR= epidermal growth factor receptor
E2F1= Elongationsfaktor 2
ERK= extracellular signal regulated kinase
FISH= Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GDP= Guanosindiphosphat
GTP= Guanosintriphosphat
G= Grading (Differenzierungsstatus)
h= Stunde
HDM2= human double minute 2 homolog
HE= Hämatoxylin-Eosin
HER2/neu= human epidermal growth factor receptor 2
HL= high level
INK4= inhibitors of CDK4
KMK= Kaplan Meyer Kurve
KRAS= Kirsten rat sarcoma
L= Lymphgefäßinvasion
LJ= Lebensjahr
LK= Lymphknoten
LL= low level
M= Metastasierungsstadium
MAPK= mitogen activated protein kinase

MDM2= mouse double minute 2 homolog
MEK= MAPK/ERK Kinase
ml= Milliliter
MRCP = Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
mRNA= messenger RNA
MTS1 INK4a/ARF= gesamter Genlocus von p16 und p14ARF bzw. p19ARF in Mäusen
min= Minute
mut= Mutation
N= Lymphknotenstadium
nuc= nucleär (Zellkernfärbung)
P16= cyclin dependent kinase inhibitor A= CDKN2A= multiple tumor suppressor 1= MTS1
PanIN= pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PCR= Polymerase-Kettenreaktion
Pn= Perineuralscheideninfiltration
Puma= p53 upregulated mediator of apoptosis
R= Resektionsstatus
RB= retinoblastoma protein (Onkogen)
RNA= Ribonukleinsäure
RKI= Robert Koch Institut
SAS= statistical analysis system
SD= Standardabweichung
T= Tumorstadium
Taq Polymerase= thermus aquaticus thermostabile DNA Polymerase
TRAIL= tumor necrosis factor alpha related apoptosis inducing ligand
TNF= Tumornekrosefaktor
UICC= Union Internationale Contre le Cancer
uPAR= urokinase type plasminogen activator receptor
uPA= urokinase type plasminogen activator (Ligand des uPAR)
U/min= Umdrehungen pro Minute
V= Veneninvasion
µl= Mikroliter
µm= Mikrometer

1 EINLEITUNG

1.1 Das Pankreas Anatomische Lage und Funktion

Das Pankreas ist ein sekundär retroperitoneal gelegenes Organ. Es befindet sich zwischen den Nieren und ist von keiner Faszie umgeben. Es wird in einen Kopf, einen Körper und einen Schwanz unterteilt. Der Kopf umschließt dabei die Arteria mesenterica superior sowie die Vena portae. Der Ausführungsgang des Pankreas vereinigt sich mit dem aus der Leber stammenden Gallengang und mündet in das Duodenum.

Die exokrinen Drüsen des Pankreas produzieren täglich ca. 1500-2000 ml eines isoosmotischen alkalischen Sekrets, welches in das Duodenum abgegeben wird (1).

Das Sekret setzt sich sowohl aus aktiven Enzymen wie Lipase und Amylase als auch aus inaktiven Enzymen wie Trypsinogen, Chymotrypsinogen und Proelastase zusammen (1). Die inaktiven Enzyme werden in Granula gespeichert und erst nach ihrer Ausschüttung in den Gastrointestinaltrakt durch proteolytische Spaltung aktiviert (1). Die aktivierten Enzyme führen zu einer Spaltung von Zuckern, Fetten und Proteinen. Durch die Spaltung ist eine Aufnahme über den Dünndarm möglich (1).

Das Pankreas produziert zudem endokrine Hormone wie Glukagon, Somatostatin und Insulin.

Die endokrinen Zellen sind innerhalb des Pankreas in Gruppen angeordnet und werden als Langerhans Inseln bezeichnet. Sie sind hauptsächlich für die Regelung des Blutzuckers verantwortlich.

Eine Entartung der endokrinen Zellen zu neuroendokrinen Tumoren ist möglich (2). Da sie jedoch nur 1-2% aller Neoplasien des Pankreas darstellen, wird in dieser Dissertation darauf nur am Rande eingegangen (3, 4). Das Adenokarzinom des Pankreas kann sowohl aus den Drüsenzellen wie auch aus den Gangepithelien entstehen.

1.2 Inzidenz des Pankreaskarzinoms

Im Jahr 2014 lag die Anzahl der Neuerkrankungen bei Männern bei 8550 und bei Frauen bei 8580 pro 100.000 Personen. Damit zeigt sich eine annähernd gleiche Verteilung der Geschlechter in der Gesamtpopulation. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 72 Jahren und bei Frauen bei 75 Jahren. Die

altersstandardisierten Erkrankungsraten zeigten sich seit 1998 für Frauen als tendenziell leicht ansteigend und für Männer konstant. Aufgrund des demographischen Wandels ist in der Zukunft mit einer Zunahme der absoluten Fallzahlen zu rechnen (5).

1.3 Mortalität und Prognose

Das Adenokarzinom des Pankreas ist sowohl bei Frauen als auch bei Männern die vierthäufigste Todesursache aller Krebserkrankungen (5, 6). Mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von lediglich 5-9% gehört dieses Karzinom zu den bösartigsten und tödlichsten Neoplasien überhaupt (5, 7). Der einzige kurative Ansatz ist die chirurgische Resektion des Karzinoms und des umgebenden Gewebes.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist eine Minderheit von 20% operabel. Daher wird die Mehrzahl der Patienten mit einem diagnostiziertem Adenokarzinom des Pankreas palliativ therapiert (8).

Auf Grund der retroperitonealen Lage des Pankreas zeigen sich Symptome häufig erst im fortgeschrittenen Stadium. Da es nicht von einer natürlichen Barriere umgeben ist, wächst der Tumor häufig entlang von Nervenfasern und verbreitet sich diffus im retroperitonealen Raum. Daher besteht eine hohe Rezidivrate, auch nach erfolgter R0-Resektion (9).

1.4 Klassifikation des Pankreaskarzinoms

Die Stadieneinteilung erfolgt mittels des TNM-Systems der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) (8. Auflage, 2017).

In der TNM-Einteilung definiert das Tumorstadium (T-Stadium) die lokale Größe und Ausbreitung des Primärtumors, das Lymphknotenstadium (N-Stadium) die Lymphknotenmetastasierung und Metastasierungsstadium (M-Stadium) das Vorhandensein von Fernmetastasen (10).

T-Klassifikation

- TX Primärtumor nicht beurteilbar
- T0 Kein Anhalt für Primärtumor
- Tis Carcinoma in situ (PanIN III)
- T1 Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- T1a Tumor 0,5 cm oder weniger in größter Ausdehnung

- T1b Tumor größer als 0,5 cm aber kleiner als 1 cm in größter Ausdehnung
- T1c Tumor größer als 1 cm aber kleiner als 2 cm in größter Ausdehnung
- T2 Tumor größer als 2 cm aber kleiner als 4 cm in größter Ausdehnung
- T3 Tumor ist größer als 4 cm in größter Ausdehnung
- T4 Tumor infiltriert Truncus coeliacus, A. mesenterica superior und/oder A. hepatica communis

N-Klassifikation

- NX Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
- N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Lymphknotenmetastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
- N2 Lymphknotenmetastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten

M-Klassifikation

- M0 Keine Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen vorhanden

UICC-Stadien

Anhand der TNM-Klassifikation lassen sich die Pankreaskarzinome in vier verschiedene Stadien einteilen.

Stadium UICC 2017	TNM-System		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1-T3	N1	M0
Stadium III	T1-T3	N2	M0
	T4	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 1:Stadieneinteilung des Pankreaskarzinom nach der UICC Stand 2017 (10)

Grading

Das Grading beschreibt den histologisch ermittelten Grad der Differenzierung der Tumorzellen. Der Grad der Differenzierung ist von prognostischer und therapeutischer Relevanz.

G1	Hoch differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Wenig differenziert

Resektionsstatus

Der Resektionsstatus (R-Status) definiert, ob nach erfolgter chirurgischer Resektion noch Tumorresiduen im Patienten verblieben sind. Der R-Status ist daher prognostisch relevant.

R0	Kein Resttumor mikroskopisch oder makroskopisch verblieben
R1	Mikroskopischer Resttumor im Patienten verblieben
R2	Makroskopischer Resttumor im Patienten verblieben

Status der Lymph-, Venen-, und Perineuralscheideninvasion

Der Befall der Lymphgefäße und der Venengefäße wird mit Lymphgefäßinvasion (L) und Veneninvasion (V) angegeben. Ein Wachstum entlang von Nerven wird als Perineuralscheideninfiltration (Pn) bezeichnet.

L0, V0 bzw. Pn0	Kein Nachweis einer Tumordinfiltration der Gefäße, und der Nerven
L1, V1 bzw. Pn1	Invasives Wachstum und Einbruch in die Gefäße durch den Tumor bzw. Wachstum entlang der Perineuralscheiden

1.4.1 Neuerungen der Klassifikation

Seit der letzten UICC-Klassifikation von 2010 wurden einige Änderungen in der Klassifikation des Pankreaskarzinoms vorgenommen (11).

Es wurden in der älteren Klassifikation alle Tumore unabhängig von Ihrer Größe als mindestens T3 klassifiziert, wenn sie nicht mehr auf das Pankreas beschränkt waren. Zudem wurde nur bewertet, ob Lymphknoten befallen waren. Die Anzahl der befallenen Lymphknoten wurde dabei nicht berücksichtigt.

In der aktuellen Klassifikation wird hingegen nur die Größe des Tumors und nicht seine Ausbreitung in das umgebende Gewebe sowie die Anzahl der befallenen Lymphknoten berücksichtigt, was eine wesentliche Änderung der Klassifikation zur Folge hatte. Es wird zwischen tumorfreien Lymphknoten (N0), ein bis drei (N1) sowie vier und mehr (N2) befallenen Lymphknoten unterschieden. Dies zog auch eine Änderung der Stadieneinteilung mit sich, die in Tabelle 2 aufgezeigt wird.

Stadium UICC 2010	TNM-System		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1-T3	N1	M0
Stadium III	T4	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Pankreaskarzinom nach der UICC Stand 2010 (11)

Da diese Arbeit im Zeitraum vor 2017 durchgeführt wurde, wurde für die Datenerhebung und -auswertung die Klassifikation von 2010 verwendet.

1.5 Risikofaktoren

In Studien konnten einige Risikofaktoren für die Entstehung des Pankreaskarzinoms identifiziert werden.

Dabei ist Rauchen ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung des Pankreaskarzinoms. Das Passivrauchen erhöht das Risiko für die Entwicklung des Pankreaskarzinoms um bis zu 50% (12). Kinder, die täglichem Tabakrauch ausgesetzt sind, haben sogar eine doppelt so hohe Wahrscheinlichkeit, später im Leben ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (13). Alkoholkonsum konnte nicht eindeutig als eigenständiger Risikofaktor identifiziert werden. Eine Metaanalyse zeigte, dass drei oder mehr alkoholische Getränke pro Tag das Risiko für ein Pankreaskarzinom um 20-30% erhöhen (14). Eine Studie mit 1530 Patienten mit einem Pankreaskarzinom konnte hingegen selbst bei einem täglichen Konsum von 60 g Alkohol pro Tag kein erhöhtes Risiko feststellen (15). Nahrungsmittel, welche das Risiko für ein Pankreaskarzinom erhöhen, konnten nicht klar identifiziert werden. Der Verzehr von geräucherten und gegrillten Speisen kann mit einem erhöhten Risiko assoziiert sein

(9). Eine Vitamin C haltige Ernährung scheint jedoch das Risiko positiv zu beeinflussen (16). Übergewicht ist als ein eindeutiger Risikofaktor anzusehen. Mit dem Körpergewicht steigt das Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms. Ab einem Body-Mass-Index (BMI) von 25 steigt das Risiko moderat. Über einem BMI von 35 steigt das Risiko für alle weiteren fünf BMI-Punkte um je 10% an (17).

Ein erhöhter BMI ist ein Risikofaktor für eine Insulinresistenz, die wiederum in einen Diabetes mellitus Typ 2 übergehen kann. Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 sind beide Risikofaktoren für ein Pankreaskarzinom (18). So haben Patienten, die seit fünf oder mehr Jahren an einem Diabetes mellitus Typ 2 leiden, ein um 50 % erhöhtes Risiko für ein Pankreaskarzinom (19). Ein neu aufgetretener Diabetes mellitus kann auch ein erstes Symptom eines Pankreaskarzinoms sein (20).

Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms ist eine chronische Pankreatitis. Die ständige Entzündung führt zu Strikturen im Gangsystem. Durch die Strikturen ist der Transport in das Duodenum gestört. Dadurch kommt es zu einer vorzeitigen Aktivierung der Verdauungsenzyme im Pankreas (21). Dies führt zu einer weiteren Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Die Entzündungsmediatoren und die Verdauungsenzyme verursachen Zellschäden, die zu einem Pankreaskarzinom führen können (22, 23). Risikofaktoren für eine chronische Pankreatitis sind Tabak- und Alkoholkonsum, sowie Hyperlipidämie und Gallensteine (24).

Ein niedriger sozioökonomischer Status erhöht das Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Es besteht ein 80% höheres Risiko bei der weißen bzw. 170% höheres Risiko bei der schwarzen Bevölkerung. Auch hier waren die Risikofaktoren wie Tabakrauch, Alkoholkonsum, Übergewicht sowie Diabetes mellitus (letzteres besonders bei der schwarzen Bevölkerung) in diesen Populationen erhöht (25). Das erhöhte Risiko der schwarzen Bevölkerung im Vergleich zur weißen Bevölkerung für ein Pankreaskarzinom wird durch einen höheren Anteil von Menschen mit einem langjährigen Diabetes mellitus erklärt (26).

Beim Pankreaskarzinom ist in 7-10% der Fälle eine familiäre Häufung festzustellen (27). Von einer familiären Häufung wird in den meisten Studien dann gesprochen, wenn zwei oder mehr Verwandte ersten Grades von einem Pankreaskarzinom betroffen sind (28). Das Risiko für Personen mit familiärer Häufung ist besonders hoch, wenn ein Verwandter vor dem 50. Lebensjahr an einem Pankreaskarzinom erkrankt. Angehörige von Patienten, bei denen keine familiäre Belastung nach oben genannten

Kriterien vorliegt, haben hingegen nur ein moderat erhöhtes Risiko, selbst an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (29).

1.6 Diagnose und Therapie

Diagnostik

Die folgenden Empfehlungen beziehen sich auf die aktuelle S3 Leitlinie von Seufferlein et al. (9).

Ein generelles Vorsorgescreening wird derzeit nicht empfohlen. Bei einer wie bereits oben genannten familiären Belastung sollten im Rahmen von kontrollierten Studien Screeninguntersuchungen empfohlen werden. Bei Symptomen, die für ein Pankreaskarzinom sprechen könnten, wie Oberbauchschmerzen, Inappetenz, Gewichtsverlust oder Schwäche, sollte eine Abdomensonographie und ggf. ein Computertomogramm erfolgen, besonders wenn die Patienten älter als 50 Jahre sind. Bei einem neu aufgetretenen schmerzlosen Ikterus sollte auf jeden Fall eine weiterführende Diagnostik erfolgen. Pankreas- und Gallengangskarzinome sind mit 20% die häufigste Ursache eines schmerzlosen Ikterus bei Patienten über 60 Jahren. Als diagnostische Methoden werden die Abdomensonographie, die Endosonographie, ein Dünnschicht-Computertomogramm und eine Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) empfohlen.

Bei Nachweis einer Raumforderung im Pankreas sollte eine laborchemische Bestimmung des serologischen Tumormarkers CA 19-9 erfolgen. Ein sehr hoher präoperativer Wert kann ein Hinweis auf eine mögliche bereits fortgeschrittene Tumorausbreitung sein, auch wenn die bildgebenden Verfahren dies nicht vermuten lassen. Zudem kann der laborchemische Tumormarker als Verlaufsparemeter dienen (9).

Therapie

Eine potentiell resektable karzinomverdächtige Raumforderung sollte operativ entfernt und histologisch aufgearbeitet werden. Die chirurgische Resektion stellt derzeit den einzigen kurativen Behandlungsansatz dar. Eine adjuvante Chemotherapie sollte auch nach einer erfolgten R0-Resektion erfolgen, da sich die fünf Jahresüberlebensrate von ca. 10% (nur R0-Resektion) auf ca. 20% (R0-Resektion+ adjuvante Chemotherapie) erhöht (30-33). Bei einer adjuvanten Chemotherapie wird in der aktuellen S3 Leitlinie

als Erstlinientherapie die Gabe von Gemcitabin oder 5-Fluoruracil (5-FU) empfohlen. Beide Substanzen zeigten eine gleichwertige Wirksamkeit (34).

Bei einem nicht resektablen Tumor sollte eine Biopsie zur histologischen Sicherung erfolgen. Eine palliative Chemotherapie verlängert in Studien die Überlebenszeit und sollte, wenn es der Allgemeinzustand des Patienten erlaubt, daher unmittelbar nach der Diagnosestellung begonnen werden (35). Alternativ kann eine Kombinationstherapie von Gemcitabin und Erlotinib (EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor) erfolgen. Die Kombinationstherapie zeigte einen Überlebensvorteil von 2 Wochen im Vergleich zur Monotherapie (36). Eine Alternative bei sehr gutem Allgemeinzustand kann die Gabe von 5-Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin nach dem sogenannten FOLFIRINOX-Protokoll sein. Die FOLFIRINOX-Therapie zeigte in einer Studie einen Überlebensvorteil gegenüber der Gemcitabin-Monotherapie bei allerdings deutlich erhöhter Toxizität (35).

Bei einem Tumorprogress unter Gemcitabin sollte eine Zweitlinientherapie mit 5-FU und Oxaliplatin erfolgen (37).

Eine palliative Bestrahlung sollte nur gezielt bei symptomatischen Metastasen zur Kontrolle von Schmerzen oder Komplikationen erfolgen (9).

1.7 Molekulargenetische Aspekte zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms

1.7.1 KRAS

Kirsten Rat Sarcoma (KRAS) wurde bereits vor mehr als 20 Jahren als eine der häufigsten Genmutationen des Pankreaskarzinoms identifiziert und wird mit einem Anteil von ca. 90% in der Literatur beschrieben (38-40). Rezeptortyrosinkinasen leiten nach Aktivierung durch ihren Liganden ein Signal durch die Zellmembran an die Innenseite der Zellmembran weiter. Zu den Rezeptortyrosinkinasen gehört auch der epidermal growth factor receptor (EGFR) sowie der human epidermal growth factor Receptor 2 (HER2/neu-Rezeptor). KRAS ist ein sogenanntes kleines G-Protein, das eine zentrale Rolle bei der Verarbeitung von Signalen von der Zellwand in das Zellinnere spielt. Das Protein kann in einer aktiven Form, die weitere Signalwege anstößt, wie auch in einer inaktiven Form vorliegen. Dies geschieht durch eine Guanosintriphosphat (GTP) Bindungsstelle sowie die Fähigkeit, dieses GTP durch Abspaltung eines Phosphats zu Guanosindiphosphat (GDP) abzubauen. Dadurch geht es wieder in seine inaktive Form über. Die GTPase Aktivität wird zusätzlich durch

weitere GTPase modulierende Proteine gesteuert. Wird KRAS aktiviert, entlässt es zuerst das GDP und kann nun GTP binden, welches ca. zehnmal häufiger im Zytosol vorkommt als GDP (41). Bei einer Punktmutation, die typischerweise im 12. Codon auftritt, wird Glycin (G) durch Asparaginsäure (D), Valin (V), Arginin (R) oder Serin (S) ersetzt. Dadurch ist die GTPase von KRAS gegenüber GTPase stimulierenden Proteinen unempfindlich und führt zu einem ständig aktivierten KRAS, welches nun Signalwege aktivieren kann (42, 43). Unter anderem führt eine Aktivierung von KRAS zu einer Aktivierung der mitogen activated protein kinase/ extracellular signal regulated kinase (MAPK/ERK Kinase) (MEK). MEK aktiviert durch die extracellular signal regulated kinase (ERK) den nachgeschalteten MAP Kinase Weg. Dadurch werden Signale an den Zellkern weitergeleitet.

Die von KRAS angetriebenen Signalwege führen zu einer Umstellung des Zellmetabolismus vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel und zu einer gesteigerten Glucoseaufnahme der betroffenen Zelle (44). Die Sicherung der Energieversorgung ist für die Tumorzelle von entscheidender Bedeutung. Auf den Zusammenhang der Energieversorgung mit der Tumorentstehung wird im Kapitel zu c-Myc genauer eingegangen.

Die Bestimmung des KRAS-Mutationsstatus kann von therapeutischer Bedeutung sein. In einer Studie von Lindberg et al. wurden in immunsupprimierte Mäuse verschiedene menschliche Pankreaskarzinome eingepflanzt. Die Mäuse wurden mit verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren behandelt (Panitumumab und Trastuzumab). Ebenso wurde ein Hemmstoff von MEK (Trametinib) in Kombination mit einem der beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Therapie verwendet. Es zeigte sich bei den KRAS-mutierten Tumoren lediglich eine moderate Wachstumsreduktion sowohl bei der Therapie mit den EGFR-Inhibitoren als auch in Kombination mit dem MEK-Inhibitor. Die Tumore, in denen KRAS als Wildtyp vorlag, zeigten eine deutliche Wachstumsreduktion nach der Therapie mit den EGFR-Inhibitoren und in Kombination mit dem MEK-Inhibitor sogar einen Rückgang des Wachstums (45).

Hayes et. al beschrieben nach einer direkten ERK-Inhibition, bei KRAS-mutierten Pankreaskarzinomen eine Wachstumsreduktion in 50% der behandelten Pankreaskarzinomzelllinien. Zudem kam es zu einer Seneszenzinduktion durch die Überexpression des zellulären Proteins p16 und zu einer Reduktion von c-Myc durch einen vermehrten Abbau (46).

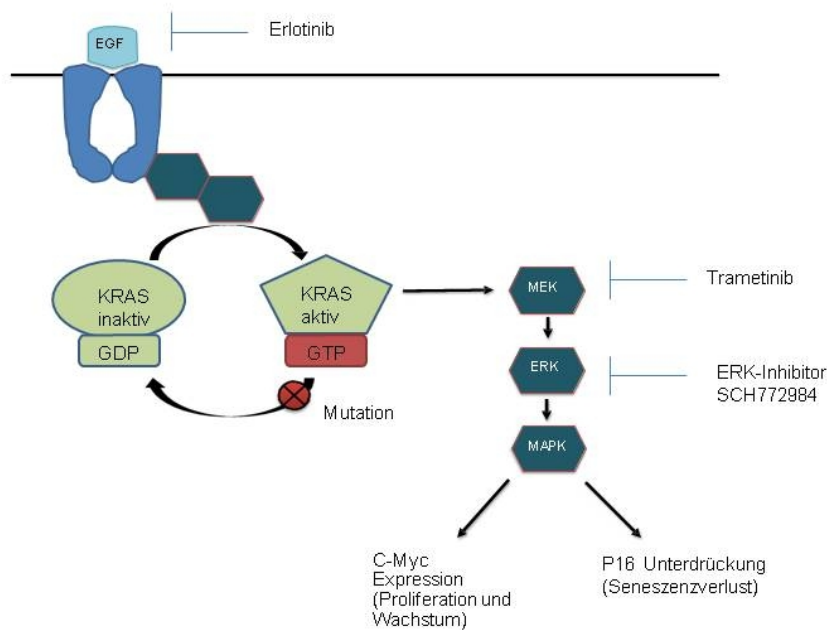


Abbildung 1: KRAS- Signalweg mit Inhibitoren [in Anlehnung an (46, 47)]

1.7.2 c-Myc

C-Myc (auf Chromosom 8q24 lokalisiert) gilt als Protoonkogen und zeigt in Tumoren eine verstärkte Expression bzw. auch Genamplifikation. Witkiewitz et al. führten bei 102 Pankreastumoren eine Sequenzierung der gesamten Protein-codierenden Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch. Sie konnten bei 45% der Tumoren eine Genamplifikation feststellen, welche mittels einer Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) bestätigt wurde (40). Es ist ein Protein, das für eine Vielzahl an Genen als Transkriptionsfaktor wirkt. C-Myc führt u.a. zu einer verstärkten Stoffwechselaktivität, welche die Zelle für das ebenso aktivierte Zellwachstum und die Zellvermehrung benötigt. Ebenso kann c-Myc bei einer Überexpression auch zur Apoptose der Zelle führen (48). Durch den erhöhten Stoffwechsel kommt es bei mangelhafter Nähr- und Sauerstoffversorgung zum Abfall von Adenosintriphosphat (ATP) in der Zelle und zum vermehrten Anfall von Adenosinmonophosphat (AMP). AMP aktiviert die AMP-activated protein kinase (AMPK), die wiederum durch Phosphorylierung das p53-Protein stabilisiert und aktiviert (48). Dadurch wird der intrinsische Apoptoseweg, der im Abschnitt zu p53 genauer erläutert wird, eingeleitet.

C-Myc kann durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber sogenannten Todesliganden (z.B. tumor necrosis factor alpha related apoptosis inducing ligand (TRAIL) oder Tumornekrosefaktor (TNF)) den Ablauf des extrinsischen Wegs der Apoptose erleichtern (49).

Somit reicht eine Überexpression von c-Myc alleine nicht für eine bösartige Entartung der Zelle aus, da bei einer inadäquaten c-Myc Expression die Apoptose eingeleitet wird. Es muss also zu mindestens einer weiteren Fehlregulation in der Zelle kommen. Im folgenden Abschnitt werden einige Möglichkeiten der Tumorentstehung vorgestellt.

Hemmung des c-Myc Abbaus und Wechselwirkung mit p16

Hydbring et al. konnten nachweisen, dass durch die cyclin dependent kinase 2 (cdk2) das Myc-Protein an der 62. Aminosäure (AS) (Serin) phosphoryliert wird. Hierdurch kann die Seneszenz durchbrochen und die Zellen wieder zur Teilung angeregt werden (50, 51). Pelengaris et al. konnten eine Phosphorylierung durch die extracellular signal regulated kinase (ERK) an der gleichen Stelle nachweisen, was eine verminderte Ubiquitinylierung und Akkumulation des Myc-Proteins zur Folge hat (52).

Haydes et al. konnten nach ERK-Hemmung einen vermehrten c-Myc-Abbau und eine erneute Seneszenz mit Reexpression von p16 beobachten (46).

KRAS und c-Myc Zusammenspiel

Das Zusammenspiel von einer c-Myc Überexpression und einer KRAS-Mutation scheint das empfindliche Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose bei einem Genschaden zu stören. Durch das Ungleichgewicht ist eine bösartige Entartung der Zelle möglich (53). KRAS kann eine von c-Myc eingeleitete Apoptose hemmen. Der erhöhte Energiebedarf der Zelle kann bei einer vermehrten c-Myc-Expression durch die KRAS-Mutations-abhängigen Stoffwechselveränderungen gedeckt werden (44). Somit kann vermutlich eine durch c-Myc induzierte Apoptose, aufgrund eines Nährstoffmangels, umgangen werden.

p53 und c-Myc Zusammenspiel

Das Protein B-cell lymphoma 2 (Bcl2) hemmt den intrinsischen Apoptoseweg, der von c-Myc induziert wird (54, 55).

Bei einem Ausfall von p53 kann Bcl2 nicht inhibiert werden und der intrinsische Apoptoseweg daher nicht eingeleitet werden.

Eine erhöhte Aktivität der cyclin dependent kinase 2 (cdk2) kann wiederum durch einen Ausfall von p53 ausgelöst werden, was wie oben beschrieben zu einer Akkumulation von c-Myc führt.

So könnte das Zusammenspiel von c-Myc und p53 bei der Tumorentstehung erklärt werden.

Die zellulären Proteine c-Myc und p53 scheinen generell wichtige Kooperationspartner in der Entstehung von Karzinomen zu sein, da dadurch die beiden wichtigsten Tumorschutzmaßnahmen (Apoptose und Seneszenz) umgangen werden.

1.7.3 p16

Das Protein p16 wird durch das auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 lokalisierten Gen cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A), auch als INK4a/ARF bezeichnet, codiert (42). INK4a/ARF kann über einen alternative reading frame (ARF) auch für das Protein p14ARF codieren (56). P16 wird in Mäusen als p19 bezeichnet, wobei p14ARF im Menschen p19ARF in Mäusen entspricht.

Die cyclin dependent kinase 4 und 6 (CDK4 und CDK6) interagieren mit Cyclin D. Der gebildete Komplex phosphoryliert das retinoblastoma protein (RB), welches an den Elongationsfaktor 2 (E2F1) gebunden ist. Dadurch kann sich E2F1 vom RB lösen und im Zellkern Gene aktivieren, deren Proteine für den weiteren Ablauf des Zellzyklus benötigt werden.

P16 hemmt die Aktivität der Kinasen CDK4 und CDK6 und wirkt so einer Zellteilung durch einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus entgegen (57). Dies erklärt die Bezeichnung für INK4, welcher für inhibitors of CDK4 steht (58).

Ca. 95% der Pankreastumoren zeigen eine Veränderung von CDKN2A bzw. seines Genproduktes (39, 59).

Es konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress die Promotorregion von CDKN2A in Pankreasepithelzellen stark methyliert. Durch die Methylierung wird das Genprodukt vermindert exprimiert (60, 61). Oxidativer Stress wird durch Rauchen, chronische Pankreatitiden, sowie Adipositas verursacht. Dies führt, wie bereits erwähnt, zu einer Reduktion von p16. Ebenso führt dies auch zu einer häufigen KRAS-Mutation in den Epithelzellen des Pankreas (22).

Gerdes und Ohtsubo konnten in ihren Arbeiten eine signifikant kürzere Überlebenszeit bei Pankreaskarzinompatienten zeigen, die eine Hypermethylierung der

Promotorregion oder eine Mutation von CDKN2A aufweisen (62, 63). CDKN2A ist häufig von Punktmutationen betroffen, die einen heterozygoten und einen homozygoten Genausfall verursachen können. Durch eine Punktmutation kann das exprimierte Protein seine Funktion verlieren (64). Eine homozygote Deletion von CDKN2A ist in 40% der Fälle für den Ausfall von p16 verantwortlich (65, 66). Etwa 15% der Inaktivierungen gehen auf eine Hypermethylierung und weitere 40% auf den Verlust erst eines und dann des anderen Allels (loss of heterozygosity) zurück (65, 66). In einem Experiment an Mäusen wurde nach einem bereits bestehenden Pankreastumor die Expression von intaktem p16 induziert. Dies hatte eine verminderte Lymphangiogenese, ein vermindertes Tumorstadium und eine fast vollständige Unterdrückung von Lymphknotenmetastasen zur Folge. Auch wenn die molekularen Mechanismen von p16 in Bezug auf die Metastasierung noch wenig verstanden sind, so scheint es auch hier eine bedeutende Rolle zu spielen (67).

p53 und p16 Zusammenspiel

Der komplette Genausfall von INK4a/ARF hat noch weitere Folgen, da durch einen offenen Leserahmen und alternatives Splicing das Protein p14ARF codiert wird, welches dann ebenfalls ausfällt. In Mäusen wird das Gen p19ARF genannt (68). P14ARF hemmt wiederum das Protein Mouse double minute 2 homolog (MDM2). MDM2 ubiquitinyliert p53. Durch die Ubiquitinylierung wird die Funktion von p53 gehemmt und sein Abbau gefördert (69). MDM2 wird beim Menschen als Human double minute 2 homolog (HDM2) bezeichnet. Durch den Verlust von p14ARF wird ein p53 vermittelter Zellarrest bzw. eine p53 vermittelte Apoptose umgangen oder zumindest erschwert. Die weitreichenden Folgen einer p53-Hemmung werden detaillierter im Kapitel zu p53 erklärt.

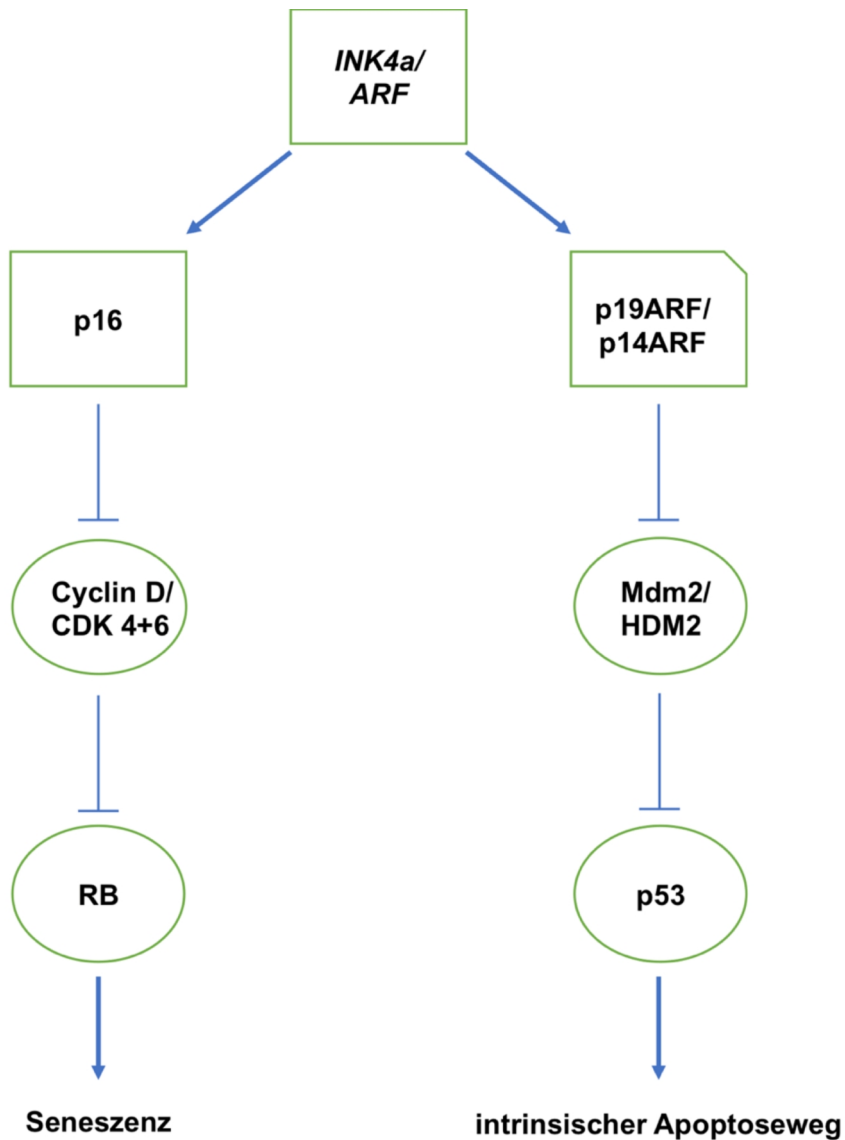


Abbildung 2: Auswirkungen von MTS1 INK4a/ARF(42)

p16 Verlust und KRAS-Mutation

In einem Versuch mit p16-knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass der p16-Verlust alleine nicht zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms reicht. Bei diesen Mäusen war p19ARF aber nach wie vor intakt. Zusammen mit einer Punktmutation von KRAS an der Stelle 12 konnte jedoch die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms induziert werden (70).

1.7.4 p53

P53 ist eines der bekanntesten Tumorsuppressorgene und wurde bereits 1992 von Lane im Nature Magazin als „Wächter des Genoms“ bezeichnet und ein Jahr später

vom Wissenschaftsmagazin Science zum Molekül des Jahres gewählt (71, 72). Das zeigt die Bedeutung, die p53 in der Entstehung von Krebs zugeschrieben wird.

P53 als „Wächter des Genoms“ durch die Aktivierung des ATM/ATR-Pfads und Arrest des Zellzyklus

Die beiden Enzyme ataxia telangiectasia mutated (ATM) und ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) erkennen DNA-Schäden. Bei einem erkannten DNA-Schaden aktivieren ATM und ATR durch Phosphorylierung die Checkpoint Kinasen (CHK2 und CHK1) (73). Die Kinasen führen über einen downstream-Mechanismus zu einer Phosphorylierung und Inaktivierung der cell division cycle (CDC25) Phosphatase.

Die CDC25-Phosphatase spaltet in ihrem aktiven Zustand aktivierende Phosphatgruppen von cyclin/CDK-Komplexen ab (74). Durch die Dephosphorylierung werden die cyclin/CDK-Komplexe inaktiviert.

Die beiden Enzyme ATM und ATR phosphorylieren neben CHK1 und 2 auch p53. Durch die Phosphorylierung ist die Aktivität von p53 gesteigert. P53 führt zu einer verminderten Expression der CDC25-Phosphatase (75).

P53 führt zur Transkription von p21. P21 hemmt CDK2, das RB phosphoryliert. RB wird durch eine Phosphorylierung inaktiviert, also durch den Wegfall der CDK2 vermittelten Hemmung aktiviert. Somit hemmt p21, ähnlich wie p16, die Freisetzung von E2F1, was zu einem Arrest des Zellzyklus führt (76, 77).

P53 wird, wie bereits im Kapitel zu p16 beschrieben, von MDM2 gehemmt. P53 ist jedoch auch ein Transkriptionsfaktor für MDM2 und bildet somit einen negativen Feedbackmechanismus, um einer überschießenden p53 Expression entgegenzuwirken (78).

Durch dieses fein justierte System wird kontrolliert, ob das Genom einer Zelle soweit intakt ist, dass sie sich weiter teilen kann ohne genetische Schäden bei ihrer Teilung zu vervielfältigen.

p53 induzierte Apoptose

Bei hohen p53-Konzentrationen leitet p53 die Apoptose ein. Dies geschieht hauptsächlich durch das Protein p53 upregulated mediator of apoptosis (Puma). Wie der Name bereits vermuten lässt, wird Puma durch p53 stärker exprimiert (55). Puma bindet mit hoher Affinität an die antiapoptotischen Proteine der Bcl2-Familie. Im

gebundenen Zustand bilden sie keine Heterodimere mehr mit Bax. Dadurch liegt Bax frei vor und leitet den intrinsischen Weg der Apoptose ein (79).

1.7.5 uPAR und uPA

Urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR) ist ein hochglykosiliertes Protein, das mit Hilfe eines Glycosylphosphatidylinositol-Ankers an der Zellmembran anheftet. Als Oberflächenprotein wird es zudem als CD87 bezeichnet. Bindet nun sein Ligand die Serinprotease urokinase type plasminogen activator (uPA), mit seiner Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne an uPAR, so hat dies zwei wesentliche Folgen (80). Ein Effekt ist die Einleitung einer extrazellulären Proteolyse. Ein weiterer Effekt ist das Einleiten einer Signalkaskade über Transmembranproteine in das Innere der Zelle. Das Signal wird dabei über den MAPK-Pfad fortgeleitet (81). Der Signalweg wurde bereits in mehreren Studien untersucht (82-85). Es besteht ein positives Feedback zwischen der uPAR/uPA Expression und einer Aktivierung des MAPK-Pfads (86). Durch die extrazelluläre Proteolyse wird dem Tumor eine Invasion ins Gewebe und damit auch eine Metastasierung ermöglicht. Die Metastasierung hat ein kürzeres Gesamtüberleben der Patienten zur Folge (87).

Die intrazelluläre Signalkaskade und die Lyse der extrazellulären Matrix haben zudem auch eine gesteigerte Angiogenese und ein gesteigertes Zellwachstum zur Folge (82, 88).

In einem Review über das Urokinase-System und seine Rolle bei der Entstehung von bösartigen Tumoren wurden die molekularen Mechanismen näher beleuchtet.

Es wurde gezeigt, dass in Gliomazellen, bei denen uPAR über einen Antisense-Vektor ausgeschaltet wurde, eine deutlich höhere Menge von TRAIL-Rezeptoren messenger RNA (mRNA) vorliegt. Diese Zellen gingen daher häufiger in die Apoptose über (89). Scheinbar werden durch das uPA/uPAR-System die TRAIL-Rezeptoren an der Zelloberfläche vermindert und somit die Einleitung des extrinsischen Apoptosewegs auch durch TRAIL-Protein tragende Zellen, wie zum Beispiel B-Lymphozyten, umgangen.

Von Wick und seiner Arbeitsgruppe konnte eine Korrelation zwischen einer erhöhten Bcl2-Expression und einer erhöhten Konzentration von uPA-mRNA in Gliomazellen nachgewiesen werden (90).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenkollektiv und Datenerhebung

Das Patientenkollektiv bestand aus Patienten, bei denen zwischen 2006 und 2011 ein Pankreaskarzinom diagnostiziert wurde und die in der chirurgischen Universitätsklinik Mannheim operiert wurden. Es wurden die Daten zu Alter, Geschlecht, TumorgroÙe, Lymphknotenstatus, Perineuralscheideninfiltration, Veneninfiltration, LymphgefäÙinfiltration, Resektionsstatus, Tumorstadium, Überlebenszeit, Grading, KRAS Mutation, c-Myc Amplifikation, c-Myc Expression, uPAR Amplifikation sowie die p16 und p53 Expression erfasst und analysiert. Ein Teil der Daten stammte aus der Pankreasdatenbank, welche uns freundlicherweise von der Chirurgischen Universitätsklinik Mannheim (damaliger Direktor: Prof. Dr. S. Post) zur Verfügung gestellt wurde. Des Weiteren wurde in der Gewebsdatenbank des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Mannheim nach weiteren Pankreaskarzinomen gesucht. Die archivierten Paraffinproben wurden mittels molekulargenetischer und immunhistochemischer Methoden untersucht. Die bereits erhobenen histologischen Daten wurden aus den Pathologieberichten übernommen. Die klinischen Daten zur Überlebenszeit wurden telefonisch über den Hausarzt oder Angehörige der Patienten erhoben oder dem klinischen Informationssystem der Universitätsklinik Mannheim entnommen.

Ein entsprechendes Ethikvotum der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg liegt unter dem Aktenzeichen 2012-296N-MA vor. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Unterstützung der Abteilung für medizinische Statistik, Biomathematik und Informationsverarbeitung der Universität Heidelberg Fakultät Mannheim unter der Leitung von Frau Prof. Dr. sc. hum. habil. Christel Weiß. Es wurde das statistical analysis system (SAS) verwendet.

Ziel dieser Dissertation war es, molekularbiologische Daten zur genauen Charakterisierung des Pankreaskarzinoms und seiner Vorstufen zu sammeln. Die Merkmale wurden in Bezug auf ihre Überlebensprognose, die lymphatische Metastasierung, sowie den Differenzierungsgrad untersucht. Die Marker konnten alle bereits in anderen Publikationen mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden. Ob sie sich jedoch auch als prognostische Marker erweisen, ist häufig entweder umstritten oder noch nicht hinreichend untersucht.

2.2 KRAS-Mutationsanalyse

2.2.1 Allgemeine Chemikalien

Aqua ad iniectabilia Braun

Ethanol 100%

AppliChem, Darmstadt

Natriumacetat

AppliChem, Darmstadt

Xylol

J.T. Baker, Deventer, Niederlande

2.2.2 Material für die DNA-Extraktion

Lysis Solution (Kit Puregene Tissue Core B)

Qiagen, Hilden

Proteinase K

Qiagen, Hilden

RNAse A Solution

Qiagen, Hilden

Protein Precipitation Solution

Qiagen, Hilden

Isopropanol

AppliChem, Darmstadt

Hydration Solution

Qiagen, Hilden

2.2.3 Material für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Forward-Primer BRINK F

Metabion, Martinsried

AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATA

Reverse-Primer BRINK R

Metabion, Martinsried

TAATACGACTCACTATAGGG

Complete Buffer

Bioron GmbH, Ludwigshafen

Desoxyribonucleosidtriphosphate

Fermentas, St. Leon-Rot

Taq-Polymerase

Bioron GmbH, Ludwigshafen

2.2.4 Material für die Sequenzierung

Forward-Primer BRINK F

Metabion, Martinsried

AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATA

Reverse-Primer BRINK R

Metabion, Martinsried

TAATACGACTCACTATAGGG

BigDye v1.1 Cycle Sequencing Kit

Applied Biosystems, Darmstadt

BigDye Sequencing Buffer Applied

Biosystems, Darmstadt

HiDi-Formamid

Applied Biosystems, Darmstadt

2.2.5 Geräte für die KRAS-Bestimmung

Spektrophotometer Nana Drop ND 1000	PeqLab, Erlangen
Durchlichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Inkubator	Binder, Tuttlingen
Thermocycler	PeqLab, Erlangen
Thermoblock	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Heizplatte Präzitherm	Störk-Tronic, Stuttgart
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge für PCR-tubes	VWR, Darmstadt
3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequencing Analysis 5.2. Software	Applied Biosystems, Darmstadt

2.2.6 Entparaffinierung

1. Die Schnitte für ca. 10 Minuten (min) auf einer Heizplatte bei 70°C erwärmen, bis das Paraffin flüssig ist
2. Einlegen der Schnitte für 2x 10 min in ein Xylol Bad
3. Auswaschen in einer absteigenden Ethanolreihe für jeweils 5 min (2x 100%, 90% und 70%)
4. Anschließendes Waschen für 2x 2 min in deionisiertem Wasser

2.2.7 DNA-Extraktion

Um die DNA aus den in Paraffinblöcken eingebetteten Pankreaskarzinomen zu gewinnen, wurde zunächst mittels eines angefertigten Hämatoxylin-Eosin- (HE) Schnittes der Tumor im Schnitt identifiziert und mit einem Filzstift markiert. Ein weiterer Schnitt des Tumors wurde entparaffiniert und das dem Tumor entsprechende Areal vom Objektträger abgekratzt, um die DNA daraus zu extrahieren.

Die DNA-Extraktion aus dem Tumorgewebe wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Tumorgewebe + 300 Mikroliter (µl) (Lysis Solution) + 1,5 µl Proteinase K
2. 25 mal invertieren

3. bei 55°C ca. 3 Stunden inkubieren, bis das Gewebe vollständig lysiert ist
4. bei 4°C 1,5 µl RNAse A Solution zum Lysat dazugeben
5. 25 mal invertieren
6. bei 37°C für 30 min inkubieren
7. Lysat 1 min auf Eis stellen
8. 100 µl Protein Precipitation Solution zum Lysat geben
9. 20 sek vortexen
10. Lysat nun für 3 min bei Raumtemperatur mit 14 000 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugieren
 - es bildet sich ein festes, dichtes, randbildendes Pellet aus Proteinen
 - falls dies nicht geschieht: Lysat nochmals für 5 min auf Eis stellen und anschließend 3 min zentrifugieren
11. Überstand verwerfen
12. Zugabe von 300 µl 100% Isopropanol
13. 50 mal invertieren (nun ist ein fadenähnliches Pellet sichtbar)
14. 1 min bei Raumtemperatur bei 14000 U/min zentrifugieren
15. Überstand verwerfen
16. Pellet mit 300 µl 70% Ethanol waschen
17. Mehrmals invertieren
18. 1 min bei Raumtemperatur mit 13.000 U/min zentrifugieren
19. Überstand verwerfen
20. Pellet mit der DNA bei Raumtemperatur ca. 5-10 min trocknen lassen
21. Zugabe von 50 µl Hydration Solution
22. 1 h bei 65°C inkubieren
23. Nun kann die DNA-Konzentration gemessen werden und die DNA bei -20°C gelagert werden

2.2.8 Konzentrationsbestimmung der DNA

Nach der Extraktion wird mittels Spektralphotometrie die Konzentration der gelösten DNA bestimmt. Der Vorteil des verwendeten Nanodrop-Spektralphotometers ist, dass keine Küvette verwendet werden muss. Durch den sehr kurzen Weg, den das Licht durch die zu messende Lösung zurücklegt, kann auf eine Verdünnungsreihe verzichtet werden.

Zunächst wurde das Spektralphotometer mittels 2 µl DNA-template geeicht.

Zur Messung wurden die DNA-Pellets wieder in 12 µl destilliertem Wasser gelöst und das Gerät mit 2 µl der Lösung bestückt.

In allen Fällen konnte die notwendige DNA-Konzentration von 100 Nanogramm/Mikroliter (ng/µ) erreicht werden.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Ansatz bei einem Reaktionsvolumen von 25 µl

Primer BRINK F	1,5 µl
Primer BRINK R	1,5 µl
Complete Buffer (Bioron)	2,5 µl
Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP)	2 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
DNA	variabel (100 ng/ µl)
Aqua ad iniectabilia	variabel (je nach DNA-Menge)

Es wurde ein Mastermix bestehend aus Primern, Complete Buffer, Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs), und der thermostabilen DNA Polymerase (Taq-Polymerase) erstellt. 7,7 µl des Mastermixes wurde mit der Tumor-DNA vermischt. Es wurde mittels der zuvor spektralphotometrisch gemessenen Konzentrationen darauf geachtet, dass ca. 100 ng der Tumor DNA in jedem Ansatz waren. Das Restvolumen wurde mit destilliertem Wasser auf 25 µl aufgefüllt und der Thermocycler damit bestückt. Nach einer initialen Denaturierung, was zu einem Trennen der DNA-Doppelstränge führt, können sich die Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern und die Taq Polymerase bildet mittels der dNTPs einen neuen komplementären DNA-Strang. Die einzelnen Schritte sind wie folgt angegeben.

1. Initiale Denaturierung: 5 min bei 95°C
2. Denaturierung: 1 min bei 94°C
3. Anlagerung: 1 min bei 58°C
4. Elongation: 2 min bei 72°C
5. Die Schritte 2-4 werden insgesamt 30 mal wiederholt
6. Endextension: 10 min bei 72°C
7. Kühlung: bei 4°C

Nach erfolgter Vervielfältigung erfolgt die Ethanol-Fällung der DNA

1. PCR Produkt vollständig in ein Eppendorfgefäß pipettieren
2. 2,5 Vol Ethanol (100%) und 0,1 Vol Natriumacetat (3 M, pH 5,2) zugeben und mischen
3. 15 min bei 4°C zentrifugieren mit 14 000 U/min
4. Überstand abkippen
5. 300 µl Ethanol (70%) zugeben
6. Überstand sofort wieder abkippen
7. PCR-Pellets im Eppendorfgefäß lufttrocknen lassen

Anschließend erfolgt eine erneute DNA-Konzentrationsbestimmung, wie bereits oben beschrieben.

2.2.10 Prinzip der Sequenzierung

Frederick Sanger erhielt 1980 für die Sequenzierung der DNA den Nobelpreis für Chemie. Es wurde dadurch möglich, die Basenabfolge von DNA zu bestimmen (91).

Die Methode des Kettenabbruchs wurde auch in dieser Arbeit zur Sequenzierung des KRAS-Gens benutzt. Es erfolgte mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die erhaltenen DNA-Stränge wurden nach erfolgter Ethanolfällung erneut mit 25 µl HiDi Formamid gelöst, luftblasenfrei auf die Sequenzierplatten pipettiert und die fluoreszierenden Didesoxynukleotide mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Elektropherogramme wurden anschließend mittels der Sequencing Analysis 5.2. Software ausgewertet.

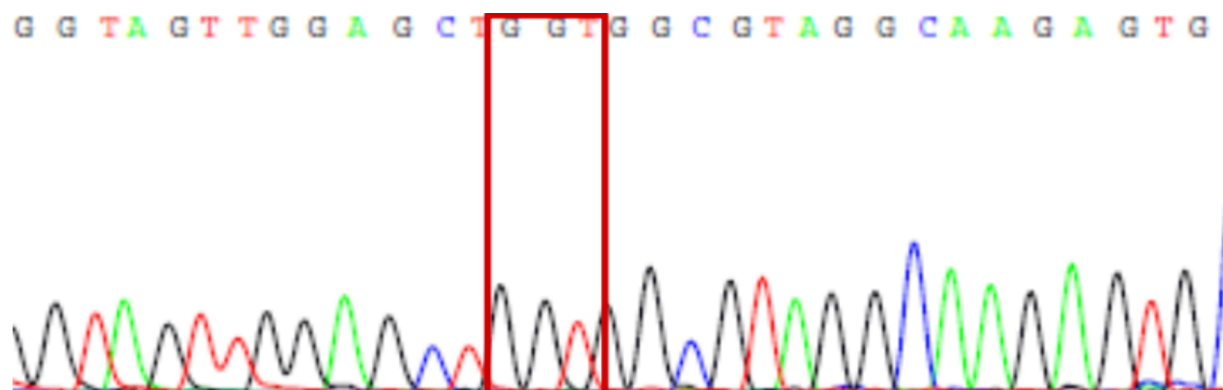


Abbildung 3: KRAS- Wildtyp mit der Basenabfolge GGT in Codon 12 (47)

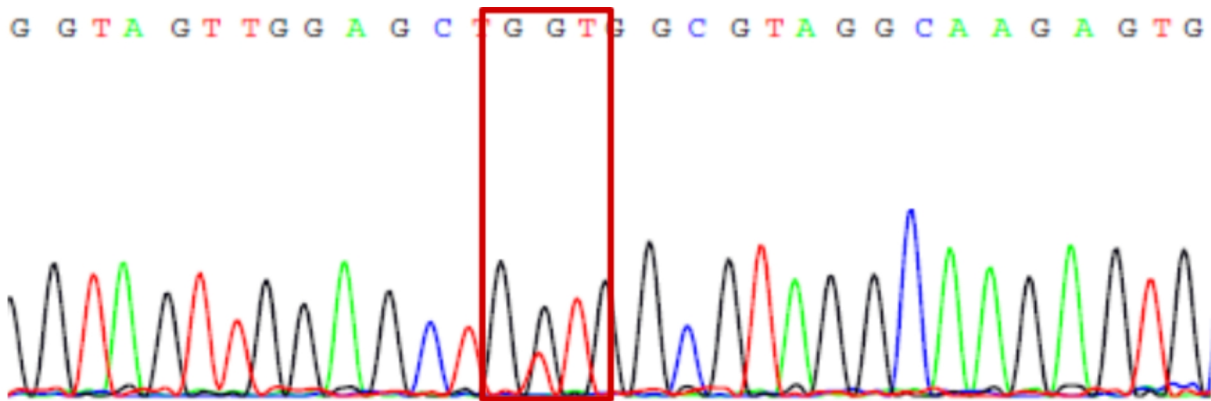


Abbildung 4: heterozygote G12V Mutation mit der Basenabfolge GGT/GTT in Codon 12 (47)

Ansatz zur Sequenzierung

BigDye v1.1 Cycle Sequencing Kit	2 µl
BigDye Sequencing Buffer 5x	3 µl
Primer (Forward oder Reverse)	0,5 µl
PCR-Produkt	variabel (40 ng)
Aqua dest.	variabel je nach DNA-Menge

Sequenzierung im Thermocycler

1. Initiale Denaturierung durch schnelles Erhitzen (1°C/sek) auf 96°C für 1 min
2. Dieser Schritt wird 25 mal wiederholt
 - a. Schnelles Erhitzen (1°C/sek) auf 96°C
 - b. 96°C für 10 sek
 - c. Schnelles Abkühlen (1°C/sek) auf 50°C
 - d. 50°C für 5 sek
 - e. Schnelles Erhitzen (1°C/sek) auf 60°C
 - f. 60°C für 4 min
3. Schnelles Abkühlen (1°C/sek) auf 4°C
4. Abkühlen bei 2-8°C
5. Anschließend erfolgt eine erneute Reinigung durch Ethanolfällung, wie bereits oben beschrieben.

2.3 FISH (Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung)

2.3.1 Material für die FISH-Analyse

Fluoreszenzstabilisator	DAPI/Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA
Denaturierungslösung	FISH Pretreatment Solution Citric1, ZytoVision, Bremerhaven
Immersionsöl	Fluka Immersionsöl, Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepsinlösung	Pepsin Solution, ZytoVision, Bremerhaven
c-Myc-Sonde	SPEC CMYC/CEN 8 Dual Color probe, ZytoVision, Bremerhaven
u-PAR-Sonde	ON uPAR (19q13)/ 19p13 Dual Color probe, Poseidon, Amsterdam
Hybridisationspuffer	SSC Lösung (SSC= sodium saline citrate), ZytoVision, Bremerhaven
Waschpuffer	Wash Buffer A, ZytoVision, Bremerhaven

2.3.2 Geräte und Materialien

Objektträger	Adhäsions-Objektträger SuperFrost® plus, Langenbrinck Emmendingen
Hybridisator	Hybridizer (Denaturierung/Hybridisierung), Dako, Hamburg
Heizbad	Tissue Flotation bath, Medite, Burgsdorf
Montagekleber	Fixogum®, Marabu, Tamm

2.3.3 Material für die Mikroskopie

Durchlichtmikroskop	von Leitz
Einfachbandpass-Filter (DAPI, FITC, Orange)	von Olympus
Fluoreszenzmikroskop BX41	von Olympus
120 W Lampe, Exfo, X-cite Series 120 Q	von Lumen dynamics
Kamera UC 30	von Olympus
Mikroskopie Software	cell^F soft imaging system
Mikroskopie Software	E8400, Core2Duo, 3,0 GHz Fujitsu-Siemens

2.3.4 Prinzip der FISH

Bei diesem Verfahren werden einzelne Genloki bzw. deren RNA-Abschriften im Zellverband markiert. Dabei werden komplementäre DNA- bzw. RNA-Sequenzen des zu untersuchenden Abschnitts mit einem fluoreszierenden Marker versehen (92). Um die markierte Sequenz nun in den Zellkern zu transferieren, bedarf es einer physikalischen, chemischen oder enzymatischen Vorbehandlung des Gewebes.

In dieser Arbeit wurden die Proteine zuerst in einer Pufferlösung bei 98°C denaturiert und danach mit einer Pepsinlösung angedaut.

Nun kann die Sonde aufgetragen werden, welche sich per Diffusion bis in den Zellkern ausbreitet. Damit die Sonde binden kann, muss die DNA vorher denaturiert werden.

Sonde und Genlokus hybridisieren und bleiben nach dem Auswaschen des restlichen Markers gebunden.

Der Marker wird mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe, welche ein passendes Wellenlängenspektrum besitzt, angeregt und emittiert markerspezifisch eine bestimmte Wellenlänge.

Durch verschiedene Filter lassen sich so verschiedene Marker sichtbar machen und es ist möglich, zum Beispiel zwischen einer Amplifikation und einer Aneuploidie zu unterscheiden.

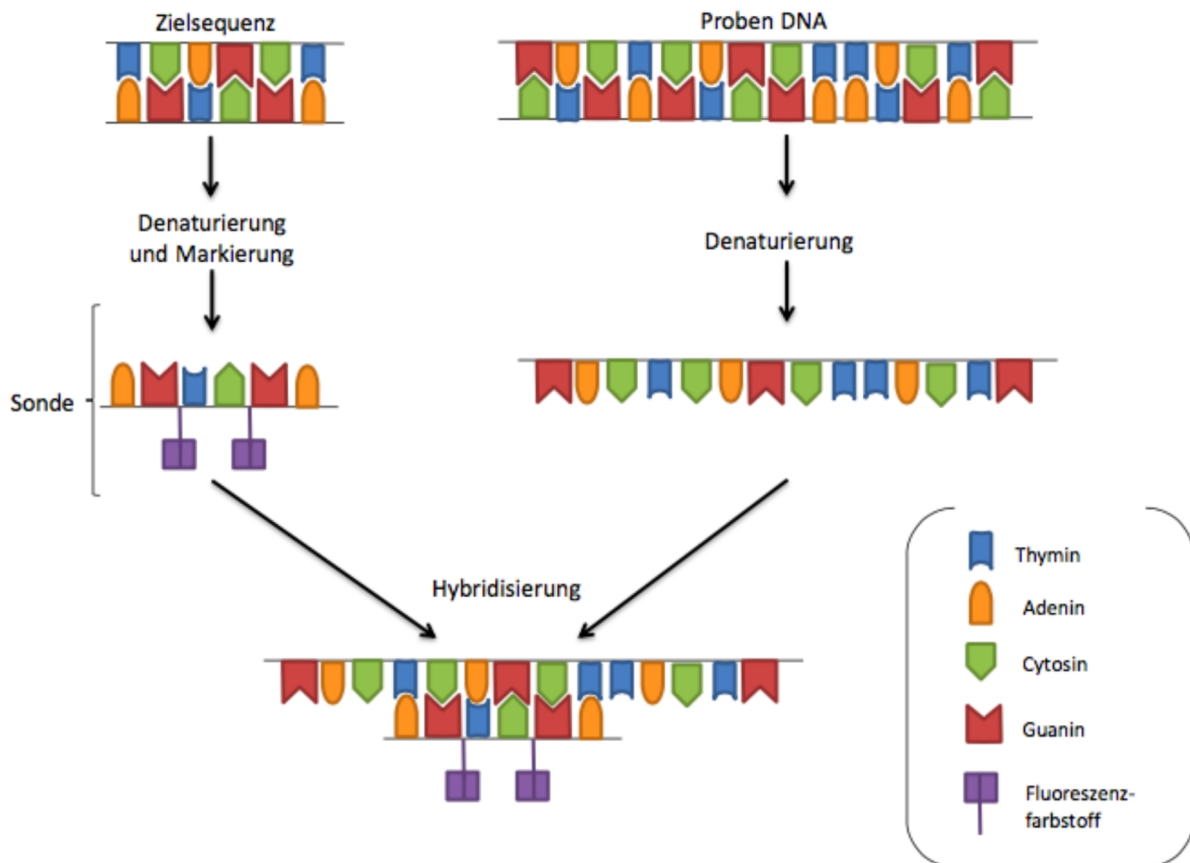


Abbildung 5: Schematischer Ablauf der FISH (aus 93)

2.3.5 Versuchsprotokoll FISH c-Myc

Die Durchführung der FISH-Färbung orientierte sich im Wesentlichen an den Herstellerangaben von ZytoVision®.

1. Schneiden von 2 Mikrometer (\approx) dünnen Scheiben vom Paraffinblock und trocknen der Schnitte über Nacht bei 37°C
2. Entparaffinieren der Schnitte
3. Kochen in Denaturierungslösung bei 98°C für 15 min
4. Waschen mit deionisiertem Wasser und vorsichtiges Abtrocknen mit einem Papiertuch
5. Auftragen von Pepsinlösung und Andauen des Gewebes bei 37°C im Hybridizer
6. Abbruch der Verdauung durch Hybridationspuffer (Bei c-Myc keine Verdünnung, bei uPAR Verdünnung des Puffers auf 50% mit deionisiertem Wasser)
7. Waschen der Schnitte in deionisiertem Wasser und Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90% und 100%)

8. Auftragen der FISH-Sonde, Abdecken mit Deckgläschen und Versiegeln der Ränder mit Fixogum®
9. Nach Trocknen des Montageklebers und Einlegen in den Hybridisator; nach einmaligem Erhitzen auf 70°C zum Trennen der DNA-Stränge wird die Probe bei 37°C über Nacht inkubiert
10. Ablösen des Montageklebers und Ablösen des Deckplättchens im Waschpuffer und anschließendes Belassen im Waschpuffer für 2x 5 min bei 39°C; Verdünnen des Waschpuffers bei 4ml Waschpuffer mit 96 ml deionisiertem Wasser bei c-Myc und 2 ml Waschpuffer auf 98 ml deionisiertem Wasser bei uPAR;
11. Entwässern mit aufsteigender Ethanolreihe (70%, 80% und 100%)
12. Blasenfreies Auftragen des Fluoreszenzstabilisators (DAPI) und Entfernen des Überschusses mittels eines Filterblocks
13. Lagerung der Schnitte in Dunkelheit und bei 4°C

2.3.6 Versuchsprotokoll uPAR-FISH

Das Versuchsprotokoll orientiert sich an dem Protokoll der c-Myc-Färbung. Mit anfänglich gleichem Protokoll zeigte sich jedoch eine viel zu starke Anfärbung. Es war sehr schwierig, eine wirkliche Chromosomenfärbung von einem Artefakt zu unterscheiden. Daher wurde das Färbeprotokoll immer wieder verändert, um mit den gleichen Puffern und Lösungen eine qualitativ zufriedenstellende Färbung zu erhalten.

Die entscheidenden Änderungen zum c-Myc Protokoll lagen in einem Waschschrift mit einem durch deionisiertes Wasser um 50% verdünnten SSC Puffer nach dem Proteinaseverdau. Dies war der entscheidende Schritt, um Artefakte zu vermeiden. Es zeigte sich, dass sonst auch bei wiederholten Auswaschungen der Puffer nicht suffizient von den Schnitten entfernt werden konnte und zu starken Artefakten führte. Die zweite Änderung war weniger ausschlaggebend, führte jedoch zu einer fast vollständigen Elimination der Artefakte. Nachdem die Sonde über Nacht in das Gewebe der Schnitte diffundiert war und sich an die DNA angelagert hatte, wurde am nächsten Tag die überschüssige Sonde mit einem verdünntem Waschpuffer ausgewaschen. Anstatt eine Mischung mit 4 ml Waschpuffer auf 100 ml zu verdünnen, wurden nur 2 ml des Waschpuffers auf 100 ml verdünnt.

2.3.7 Auswertung der FISH

Die Auswertung der c-Myc- und der uPAR-Schnitte erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. Dabei wurde in fast völliger Dunkelheit mikroskopiert, um ein Ausbleichen der Schnitte zu vermeiden. Als sehr empfindlich zeigten sich hierbei besonders die uPAR Schnitte. Es zeigte sich, dass die uPAR Sonde empfindlich auf den DAPI Filter reagierte. Setzte man sie zu lange diesem Licht aus, so verblasste die Färbung fast vollständig. Es zeigte sich jedoch, dass sich nach einer Nacht im Kühlschrank 4°C die Färbung wieder erholt hatte und auch dann wieder eine gute Auswertung möglich war. Es wurde hierbei das Verhältnis von Centromer zum Gen ausgezählt. Die Einteilung wurde wie in der Arbeit von Hildenbrand et al. gewählt (82). Als low-level-Amplifikation (LL) wurde ein Gen:Centromer Verhältnis von 2:1 und 3:1 definiert. War das Verhältnis größer als 3:1, wurde der Fall als high-level-Amplifikation (HL) bezeichnet.

Waren mehr als zwei Genmarkierungen sichtbar, aber auch die Centromere vervielfältigt, und ist damit das Verhältnis weiterhin 1:1, so handelte es sich um eine Aneuploidie.

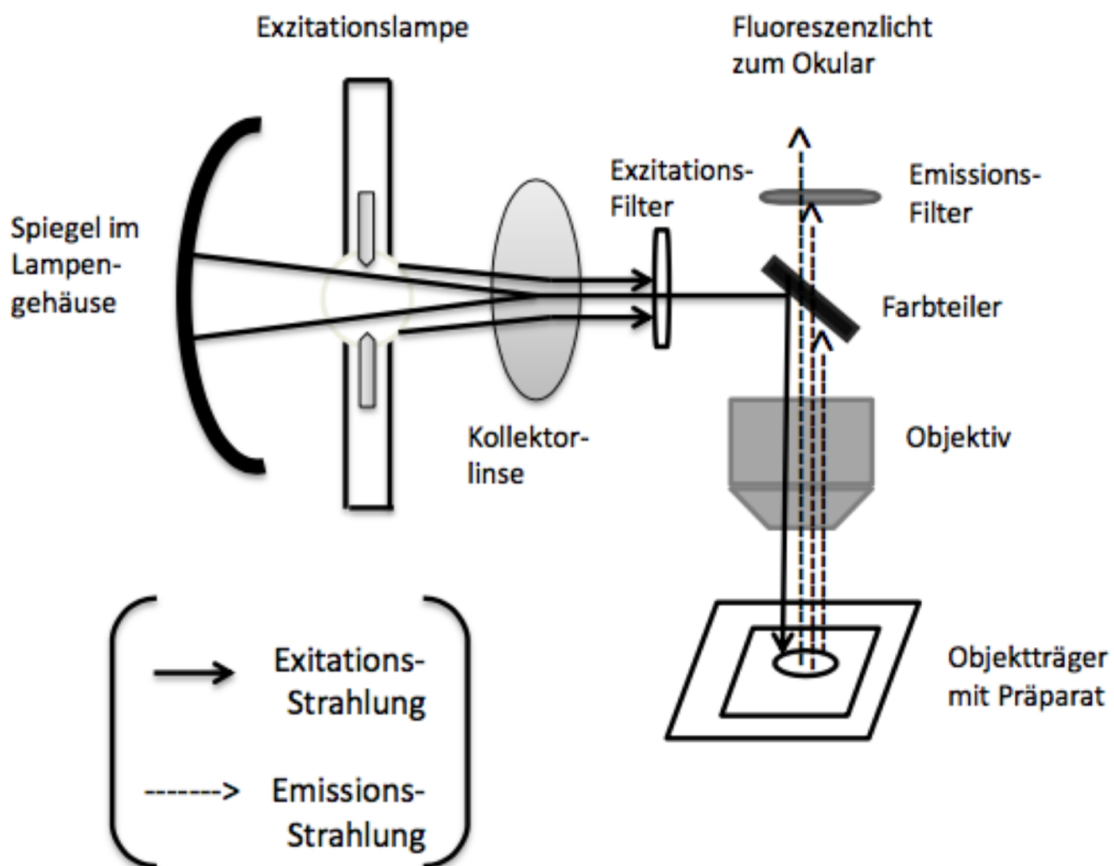


Abbildung 6: Aufbau und Strahlengang eines Fluoreszenzmikroskops, modifiziert nach Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA, Produktkatalog (1999-2000)(93)

2.4 Immunhistochemische Färbungen

2.4.1 Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Bei der immunhistochemischen Färbung werden spezifische Antikörper (AK) für das zu färbende Protein verwendet. Nach erfolgter Protein-Antikörperbindung werden die Sekundärantikörper, welche sich dem Primärantikörper anlagern, über eine enzymatische Reaktion angefärbt und dadurch sichtbar gemacht. Die immunhistochemischen Schnitte werden anschließend am Lichtmikroskop ausgewertet und bei der p16- sowie der p53-Färbung auch die Tumorstufen klassifiziert.

2.4.2 Materialien zur immunchemischen Färbung

p-16 AK	Purified Mouse Anti-Human p16, BD Biosciences, Heidelberg
p-53 AK	p53 Protein Clone DO-7, Dako, Hamburg
c-Myc AK	c-Myc (N-262) sc-764, Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Maus AK	Polymer-HRP Anti-Mouse, Dako, Hamburg
AK-Färbemittel	3,3'-Diaminobenzidine (DAB) Chromogen, Dako, Hamburg
EDTA-Puffer	Epitope Retrieval Solution pH 9, Leica, Amsterdam
Waschpuffer	Labline Waschpuffer, DCS, Hamburg
Peroxidase-Blocker	Peroxidase-Blocking Solution, Dako, Hamburg
Hämalaun	Dako, Hamburg
Objektträger	Adhäsions-Objektträger SuperFrost® plus, Langenbrinck Emmendingen
Eindeckmedium	Pertex®, Medite, Burgdorf

2.4.3 Ablauf der immunhistochemischen Färbung

1. Entparaffinierung
2. Demaskierung der Schnitte für 20 min im Dampfgerät mit EDTA-Puffer
3. 15 min abkühlen lassen
4. Spülen mit Waschpuffer

5. Verdünnung der AK (p16 1:20; p53 1:50; c-Myc 1:100); Auftragen der Primärantikörper und 30 min inkubieren
6. Spülen mit Waschpuffer
7. Blocken der Peroxidase für 7 min
8. Spülen mit Waschpuffer
9. Auftragen des Sekundärantikörpers und Inkubieren für 30 min
10. Spülen mit Waschpuffer
11. Anfärben der Antikörper mit DAB-Chromogen und Inkubieren für 6 min
12. Spülen mit Leitungswasser
13. Gegenfärbung mit Hämalaun für 2 min
14. Bläuen der Schnitte mit Leitungswasser
15. Entwässern mit aufsteigender Ethanolreihe (80%, 96%, 100%) und Xylol
16. Eindecken der Schnitte

2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

2.5.1 Prinzip der Färbung

Die HE-Färbung ist eine geläufige Standardfärbung. Dabei färbt das Hämalaun alle basophilen (sauren) Strukturen, wie z.B. die DNA. Eosin färbt alle azidophilen (basischen) Strukturen der Zelle, wie z.B. Zytoplasmakomponenten und Zellmembranen. So entsteht ein guter Kontrast der Zellstrukturen. Anschließend kann mittels eines Lichtmikroskops die Beurteilung des Gewebes erfolgen.

2.5.2 Material für die HE-Färbung

Hämalaun	Dako, Hamburg
Eosin	Dako, Hamburg
EUKITT®	O. Kindler GmbH, Freiburg
Eindeckmedium	Pertex, Medite Burgdorf

2.5.3 Ablauf der Färbung

1. Entparaffinierung
2. Inkubieren mit Hämalaun für 10 min
3. Bläuen mit Leitungswasser für 5 min
4. Inkubieren mit Eosin für 5 min
5. Spülen mit destilliertem Wasser
6. Entwässern mit aufsteigender Ethanolreihe (80%, 96%, 100%) und Xylol
7. Eindecken der Schnitte

3 ERGEBNISSE

3.1 Allgemeine Auswertung

Es wurden die histologischen Präparate von 58 Pankreaskarzinomen untersucht. Da nicht bei allen 58 Patienten alle Daten ermittelbar waren bzw. eine histologische Auswertung nicht möglich war, beziehen sich die Prozentangaben immer auf die erhobenen Daten. Die Patienten, welche zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch gelebt hatten, sind mit einem Kreis auf den Kaplan-Meier-Abbildungen gekennzeichnet und wurden zensiert.

3.2 Alter

Das Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Operation im Durchschnitt 69 Jahre, der Median lag bei 70 Jahren. Es konnte keine geschlechterspezifischen Unterschiede festgestellt werden. Der jüngste Patient war 53 und der älteste 85 Jahre alt. Die Patienten wurden in Altersgruppen ≤ 70 Jahre und > 70 Jahre zum Operationszeitpunkt eingeteilt. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Überlebenszeit der unterschiedlichen Altersklassen (Log-Rank-Test $p = 0,781$).

3.3 Überlebenszeit

Die Überlebenszeit nach der Operation konnte bei 41 Patienten ermittelt werden. Da ein Patient unmittelbar nach der Operation an einer Blutung und nicht an den Langzeitfolgen des Pankreaskarzinoms gestorben war, wurde dieser Patient von weiteren Überlebensanalysen ausgeschlossen. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung waren noch fünf (12%) der 41 Patienten am Leben. Im Durchschnitt hatten die Patienten zum Zeitpunkt der Datenerhebung 909 Tage überlebt. Der Median betrug 661 Tage. Das kürzeste Überleben betrug 156 Tage, das längste 2951 Tage. Der Patient mit der längsten Überlebenszeit lebte zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch. Nach einem Jahr waren noch 33 (81%), nach drei Jahren noch 10 (24%) und nach fünf Jahren noch 6 (14%) der Patienten am Leben.

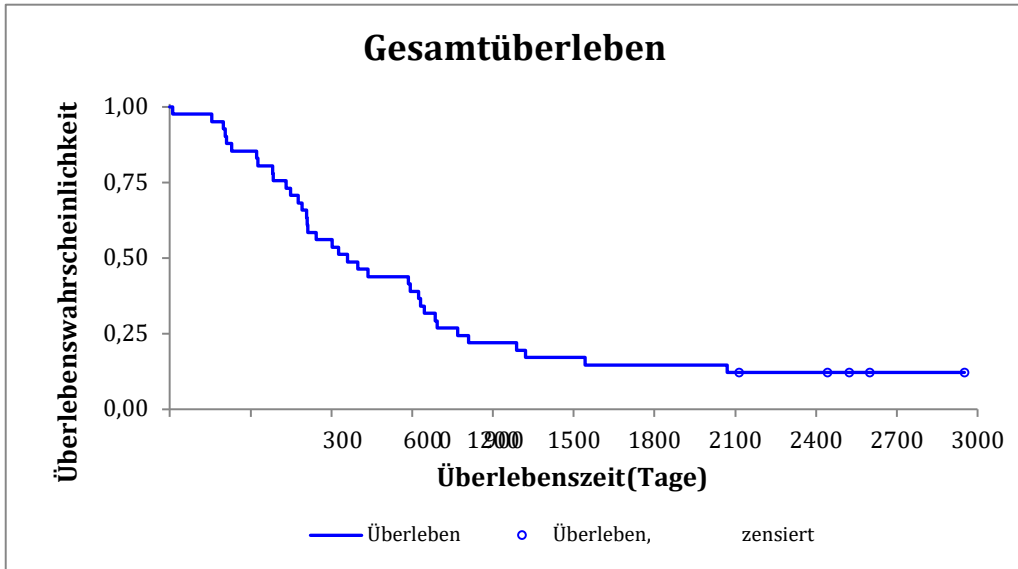


Abbildung 7: Postoperative Überlebenszeit der gesamten Kohorte

3.4 Tumorstadium

Das Stadium zum Zeitpunkt der Resektion zeigte keinen statistischen Zusammenhang mit der Überlebenszeit (Log-Rank-Test $p=0,222$) und bezieht sich auf die UICC Einteilung von 2010. Ein Patient befand sich im Stadium IA (2,5%), zwei Patienten im Stadium IB (5%), acht Patienten im Stadium IIA (20%) und 29 Patienten im Stadium IIB (72,5%). Das mediane Überleben betrug in Stadium IA 2524 Tage, in Stadium IB 831 Tage, in Stadium IIA 1110 Tage und in Stadium IIB 574 Tage.

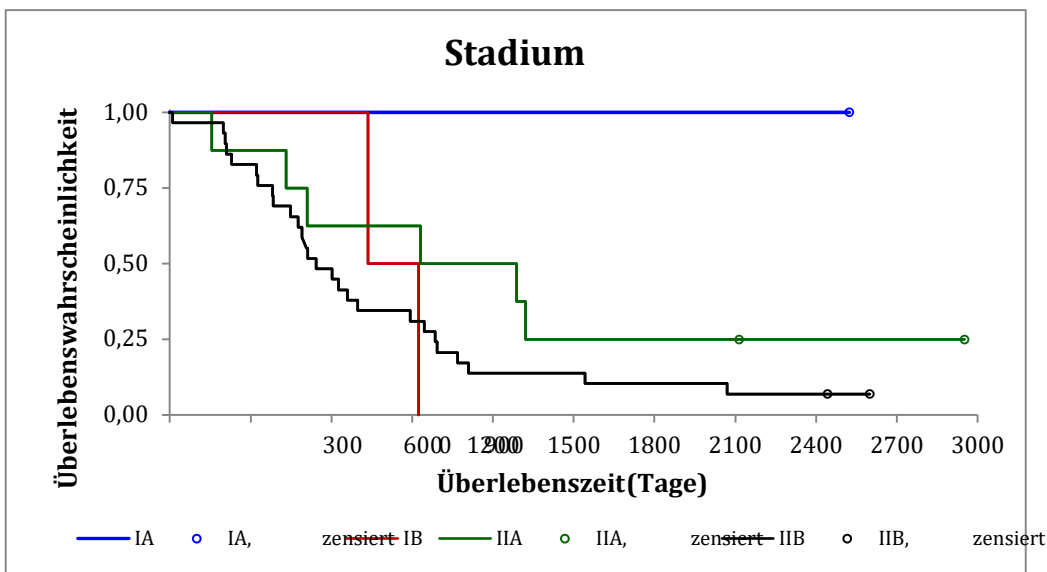


Abbildung 8: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Tumorstadium

3.5 Resektionsstatus

Der Resektionsstatus korrelierte hochsignifikant mit der Überlebenszeit (Log-Rank-Test $p < 0,0001$). Patienten deren Tumor vollständig (R0) reseziert wurde ($n = 39$; 67%), überlebten im Median 924 Tage. Bei einer nicht vollständigen (R1) Resektion überlebten die Patienten ($n = 13$; 22%) im Median 355 Tage. Lediglich ein Patient (2%) zeigte bereits intraoperativ verbliebene Tumorreste bei einer (R2) Resektion und überlebte 206 Tage. Bei 5 Patienten (9%) war die Bestimmung des Resektionsstatus (RX) nicht möglich, weshalb sie nicht in die statistische Auswertung integriert wurden.

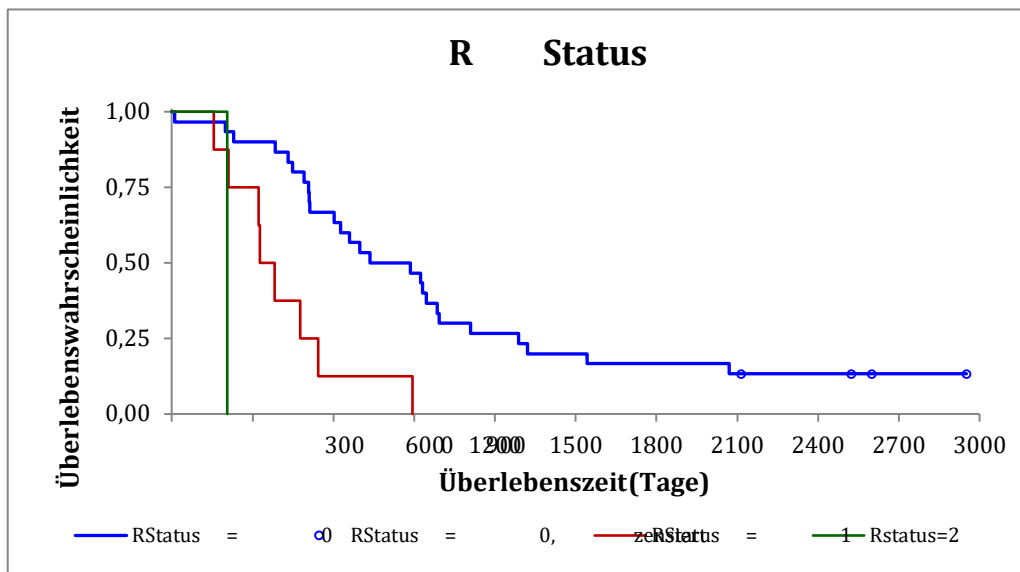


Abbildung 9: Überlebenszeit in Abhängigkeit des Resektionsstatus

3.6 Veneninvasion

Der Befall von kleinen venösen Gefäßen korrelierte hochsignifikant mit einer kürzeren Überlebenszeit (Log-Rank-Test $p < 0,0001$). Wurden die venösen Gefäße vom Tumor nicht infiltriert (V0), überlebten die Patienten ($n = 40$; 73%) im Median 924 Tage. Bei einer Tumordinfiltration (V1) zeigten die Patienten ($n = 15$; 27%) ein medianes Überleben von 431 Tagen.

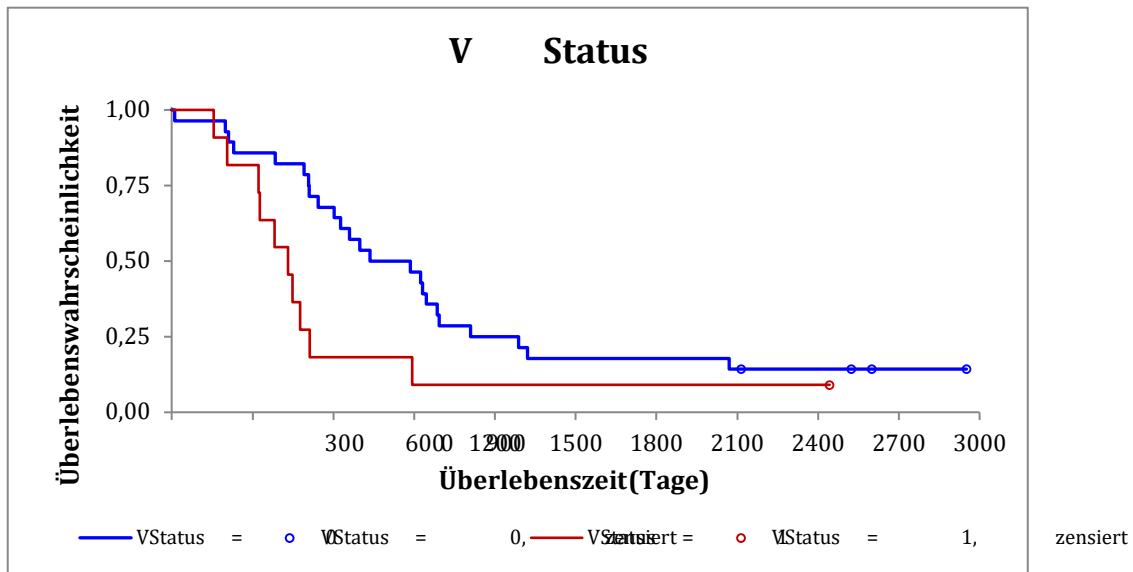


Abbildung 10: Überlebenszeit in Abhängigkeit mit der venösen Gefäßinvasion

3.7 Perineuralscheideninfiltration

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit bei einer Perineuralscheideninfiltration (Log-Rank-Test $p=0,143$), allerdings konnte nur bei lediglich zehn Patienten diese Daten erhoben werden.

3.8 Lymphgefäßinvasion

Es zeigte sich eine hochsignifikant kürzere Überlebenszeit bei Invasion der Lymphgefäße (Log-Rank-Test $p=0,001$). Patienten ($n=44;80\%$) mit einer Lymphgefäßinvasion überlebten im Median 510 Tage. Die Patienten ($n=11;20\%$) ohne Befall (V0) überlebten im Median 1196 Tage.

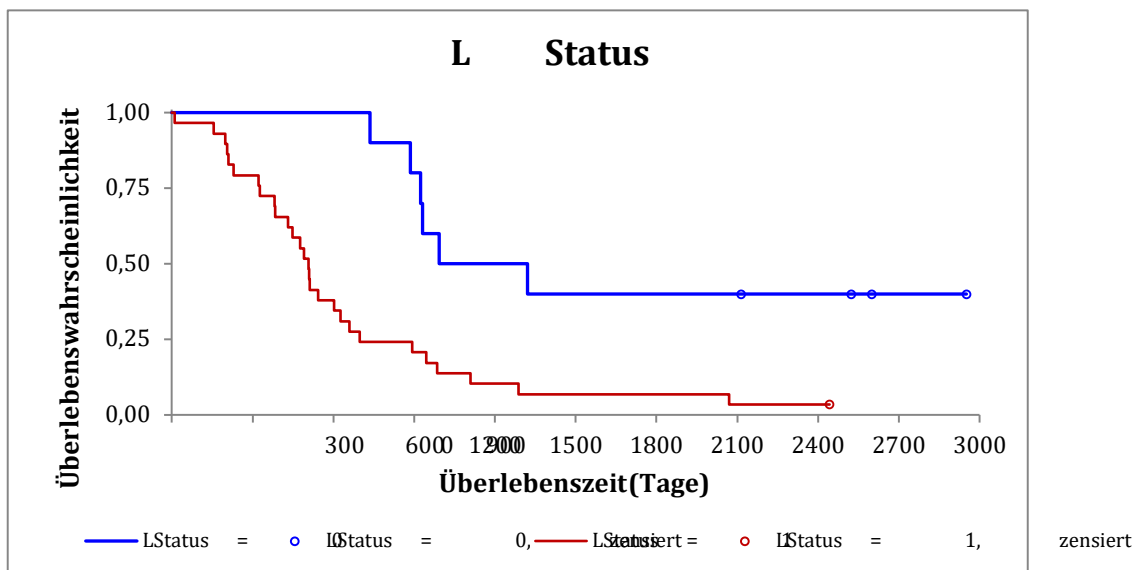


Abbildung 11: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Lymphgefäßinvasion

3.9 Lymphknotenstatus

Bei 16 Patienten (28,1%) waren zum Zeitpunkt der Operation keine Lymphknotenmetastasen nachweisbar (pN0), bei 41 (71,9%) waren Lymphknotenmetastasen im Resektat vorhanden (pN1). Der Log-Rank-Test ergab einen statistisch nicht-signifikanten Trend für einen Überlebensnachteil bei vorhandenen Lymphknoten-Metastasen ($p=0,079$), nach der UICC Einteilung von 2010. Patienten mit pN0-Status überlebten im Median 932 Tage wobei Patienten mit pN1-Status lediglich 574 Tage überlebten.

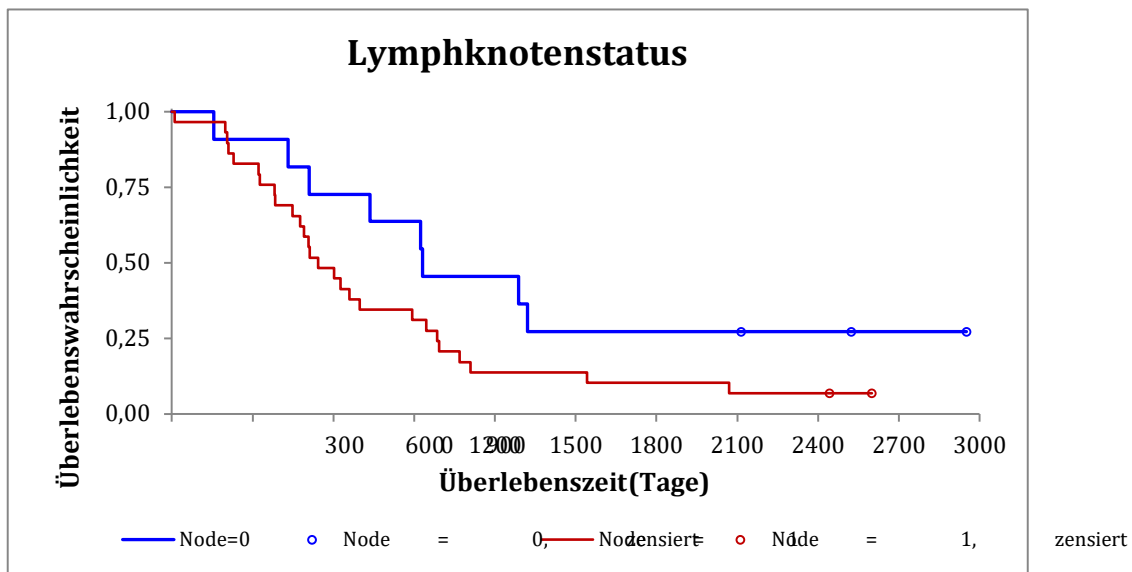


Abbildung 12: Überlebenszeit in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus

Lymphknotenstatus und Grading

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Lymphknotenstatus und dem Grading nachgewiesen werden (Chi^2 -Test $p=0,911$).

3.9.1 Lymphknotenmetastasen und Lymphgefäßinvasion

Im Fisher-Test ($p=0,0001$) wurde eine Assoziation des histologisch gesicherten Einbruchs der Tumorzellen in die Lymphgefäße und der Lymphknotenmetastasen identifiziert. Ohne einen Einbruch in die Lymphgefäße ($n=11$) waren Lymphknotenmetastasen ($n=2$) nur selten zu erwarten. Bei Einbruch in die Lymphgefäße ($n=44$) konnten in der Mehrzahl der Fälle auch Lymphknotenmetastasen ($n=37$) nachgewiesen werden.

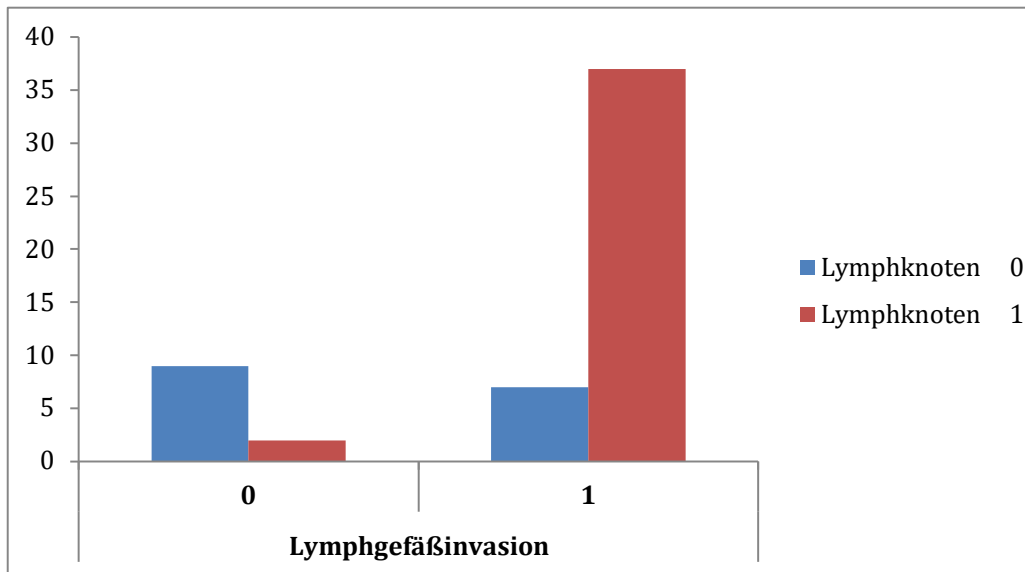


Abbildung 13: Korrelation von Lymphknotenmetastasen mit einer Lymphgefäßinvasion; Auf der x-Achse ist die Lymphgefäßinvasion (0= keine Invasion, 1= Lymphgefäßinvasion diagnostiziert) aufgetragen. Die y-Achse stellt die Anzahl der Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (pN0= blau) sowie mit Lymphknotenmetastasen (pN1= rot) dar.

3.10 Grading

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Grading (Log-Rank-Test $p=0,006$). Patienten mit einem G2-Grading ($n=35;61\%$) überlebten mit einer medianen Überlebenszeit von 939 Tagen signifikant länger als Patienten mit einem G3-Grading ($n=19;33\%$), deren mittlere Überlebenszeit bei 478 Tagen lag. Bei drei Patienten (5%) mit einem Grading von 2-3 konnte lediglich bei einem Patienten die Überlebenszeit ermittelt werden. Es erfolgte daher keine statistische Auswertung dieser Subgruppe.

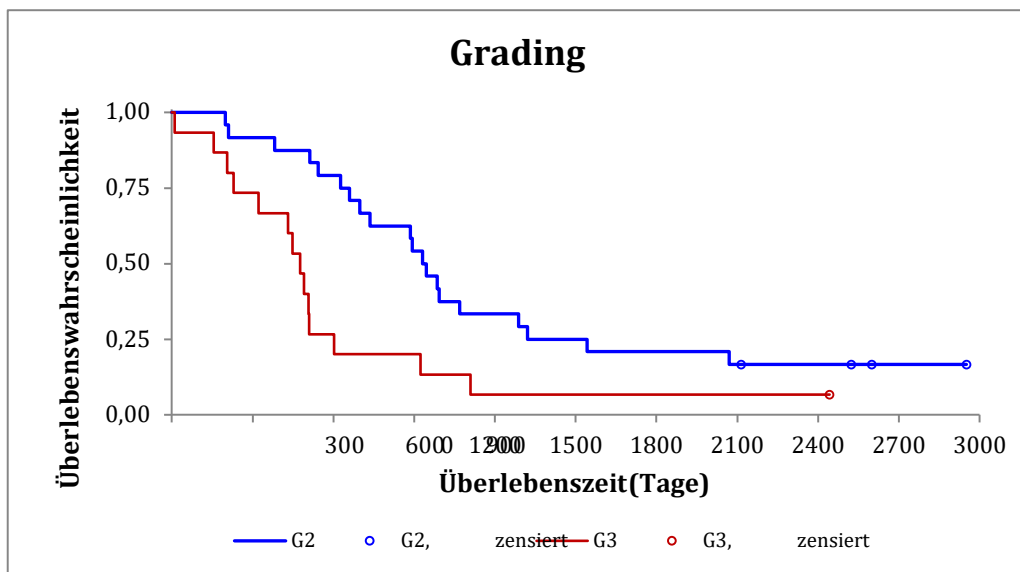


Abbildung 14: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Grading

3.11 Histologische und molekulargenetische Auswertung

3.11.1 Immunhistochemische p16-Färbung

Die immunhistochemischen p16-Färbungen wurden in drei Kategorien eingeteilt: negative (0), moderate Anfärbung (1) und starke Anfärbung (2).

Die Färbung von p16 im Tumorgewebe zeigte in 50 Fällen (86,2%) keine Anfärbung, in 7 Fällen (12,1%) eine schwache/mäßige Anfärbung und in einem Fall (1,7%) eine auf den Zellkern beschränkte mäßige Anfärbung (1nuc). Eine starke Anfärbung trat nicht auf.

Pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) konnten in 36 Fällen in den Gewebeschnitten identifiziert werden. Von diesen Krebsvorstufen waren 21 (58,3%) p16-negativ und 15 (42,7%) waren p16-positiv.

Überlebenszeit, Lymphknotenmetastasierung und Grading bei p16-Färbung

Das Überleben von Patienten mit p16-positivem Pankreaskarzinom und Patienten mit einem p16-negativen Pankreaskarzinom unterschied sich nicht statistisch signifikant (Log-Rank-Test $p=0,420$). Weiterhin zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Lymphknotenmetastasierung zwischen p16-positiven und p16-negativen Tumoren (Fischer-Test $p=0,749$).

Im Fischer-Test konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen einer p16-Färbung und dem Grading beim Pankreaskarzinom detektiert werden ($p=1,000$).

p16-Verlust im Pankreaskarzinom

In 20 Fällen waren die PanIN und der Tumor p16-negativ, in 13 Fällen waren nur PanIN p16-positiv und das Pankreaskarzinom p16-negativ, in zwei Fällen waren die PanIN und das Pankreaskarzinom p16-positiv und in einem Fall war die PanIN p16-negativ und das Pankreaskarzinom p16-positiv. Die Krebsvorstufen waren deutlich häufiger positiv für p16 als das Pankreaskarzinom. Mit einem Binomialtest konnte gezeigt werden, dass der p16-Verlust von der PanIN zum invasiven Pankreaskarzinom mit einem p-Wert von 0,005 hochsignifikant ist. Dazu wurden die 15 positiven PanIN-Fälle untersucht. Es zeigte sich in 13 Fällen (86,75% der positiven Vorstufen) ein p16-Verlust und nur in zwei Fällen (23,25%) eine p16-Färbung im invasiven Pankreaskarzinom.

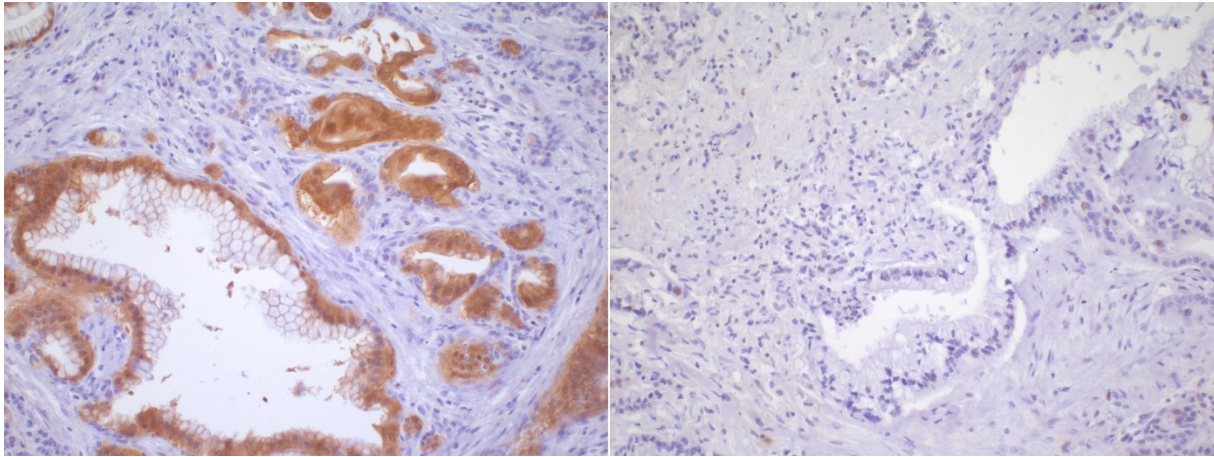


Abbildung 15: p16-positive PanIN (links), p16-Verlust im Pankreaskarzinom des gleichen Schnittes (rechts)

p16 PanIN-Status und KRAS-Mutation

Bei den Krebsvorstufen (PanIN) wurde geprüft, ob eine p16-Expression mit einer gehäuften Mutation von KRAS einher geht. Es konnte keine Assoziation zwischen der p16-Expression und einer KRAS-Mutation identifiziert werden (Fischer-Test $p=0,142$).

p16-Färbung in Langerhans Inseln

Als Nebenbefund zeigte sich, dass die Langerhans Inseln stets p16-positiv gefärbt waren und daher als interne Kontrolle für die Immunfärbung verwendet werden konnten (94).

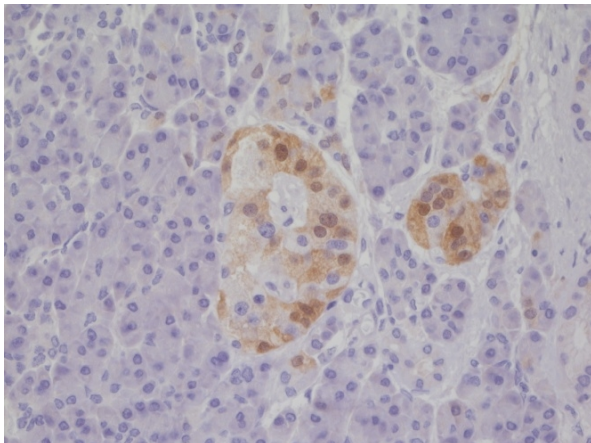


Abbildung 16: Konstitutive Expression von p16 in Langerhans Inseln in histologisch unauffälligem Pankreasgewebe

3.11.2 Immunhistochemische p53-Färbung

Die immunhistochemischen p53-Färbungen wurden in drei Kategorien eingeteilt: negative (0), moderate Anfärbung (1) und starke Anfärbung (2).

Die Anfärbung von p53 war im Tumorgewebe in 24 Fällen (41,4%) negativ, in 17 Fällen (29,3%) moderat und in 17 Fällen (29,3%) stark positive. Eine starke Anfärbung gilt als Surrogatmarker für eine loss of function p53-Genmutation (95). Unter den analysierten PanIN waren 30 Fälle (88,2%) negativ und vier Fälle (11,8%) moderat positiv.

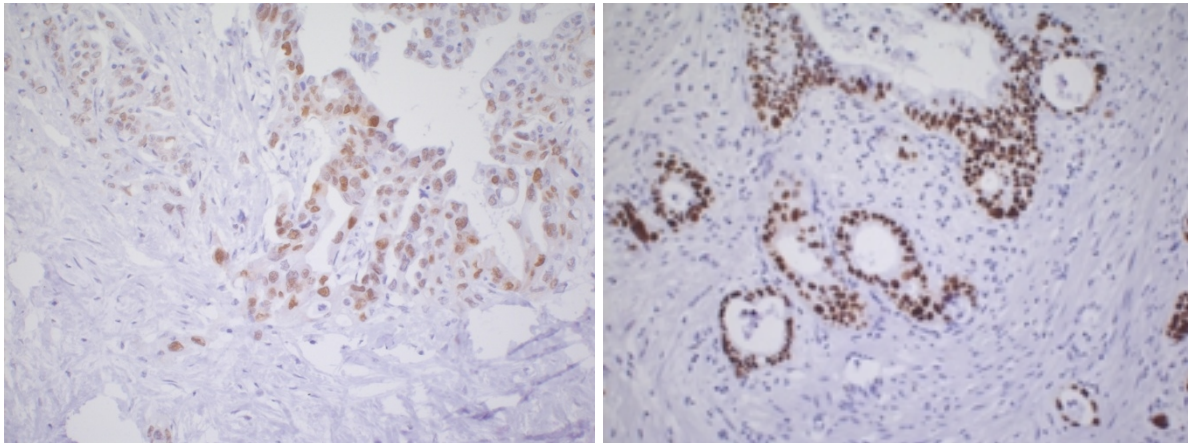


Abbildung 17: moderat p53-positives Pankreaskarzinom (links), stark positives Pankreaskarzinom (rechts)

Überlebenszeit, Lymphknotenmetastasierung und Grading bei p53-Färbung

Es ergab sich ein nicht-signifikanter Trend für kürzeres Überleben von Patienten mit einem p53-exprimierenden Pankreaskarzinom gegenüber Patienten mit einem p53-negativen Pankreaskarzinom (Log-Rank-Test $p=0,083$).

Für den Lymphknotenstatus sowie das Tumorigradung fand sich keine statistisch signifikante Korrelation mit der p53-Färbung (Lymphknotenstatus: Fisher-Test $p=0,922$, Tumorigradung: Fisher-Test $p=0,328$).

p53-Zunahme im Pankreaskarzinom

Karzinome waren deutlich öfter positiv für p53 als deren Vorstufen.

Es wurden die PanIN-Vorstufen mit den invasiven Pankreaskarzinomen verglichen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Zunahme der p53-Expression von der Vorstufe zum invasiven Pankreaskarzinom (Fischer-Test $p=0,022$).

3.11.3 Immunhistochemische c-Myc-Färbung

In der immunhistochemischen Färbung von c-Myc zeigten 30 Tumore (58,8%) eine positive Färbung und 21 Tumore (41,2%) keine Färbung. Aufgrund der geringen Fallzahlen der einzelnen positiven Färbungen wurden alle Arten der positiven Färbung für die statistische Auswertung in einer Gruppe zusammengefasst.

c-Myc-Immunfärbung	Anzahl
schwach positives Cytoplasma (1cyt)	24
stark positives Cytoplasma (2cyt)	3
schwach positiver Zellkern (1nuc)	2
stark positiver Zellkern und schwach positives Cytoplasma (2nuc 1cyt)	1
Keine Färbung (0)	21

Tabelle 3: Detaillierte Auswertung der immunologischen c-Myc-Färbung

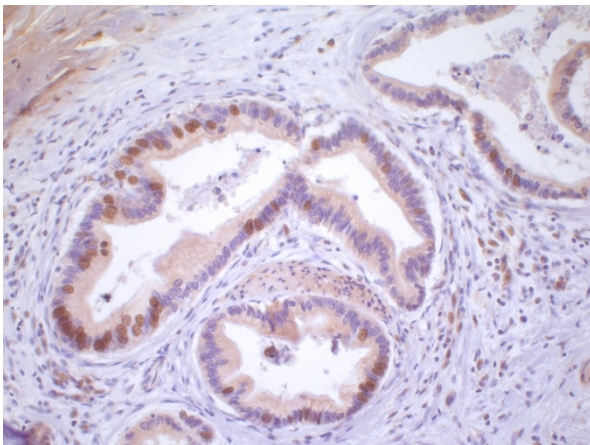


Abbildung 18: c-Myc-Immunfärbung eines Pankreaskarzinoms mit einzeln kräftig gefärbten Zellkernen und schwach gefärbtem Cytoplasma

Überlebenszeit, Lymphknotenmetastasierung und Grading bei c-Myc-Färbung

Mit dem Log-Rank-Test konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang von der Überlebenszeit der Patienten und der immunhistochemischen c-Myc-Färbung der Pankreaskarzinome identifiziert werden ($p=0,258$). Ein Zusammenhang zwischen der immunhistochemischen c-Myc-Färbung und dem Lymphknotenstatus (Chi²-Test $p=0,840$) bzw. dem Tumorgrading konnte ebenfalls nicht belegt werden (Chi²-Test $p=0,112$).

c-Myc-Proteinfärbung und c-Myc-Genamplifikationen

Die Färbung des c-Myc-Proteins zeigt keine Korrelation mit der mittels FISH nachgewiesenen c-Myc-Gen-Amplifikation (Fisher-Test $p=0,190$).

3.11.4 c-Myc-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Analyse von c-Myc mittels FISH ergab folgende Ergebnisse:

11 (19,3%) der Tumore wiesen eine high-level- (HL) und zehn (17,5%) eine low-level- (LL) Amplifikation auf. Bei 36 (63,2%) Tumoren zeigte sich keine Amplifikation.

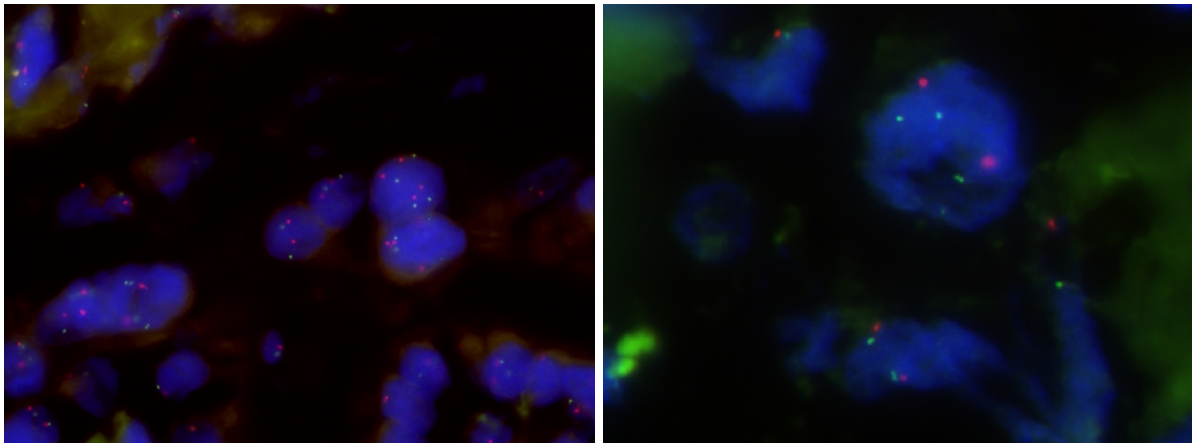


Abbildung 19: Karzinom ohne c-Myc Amplifikation (links), Karzinom mit LL-Amplifikation von c-Myc (Verhältnis 2:1) (rechts), rot: Centromer-Sonde, grün: c-Myc-Sonde

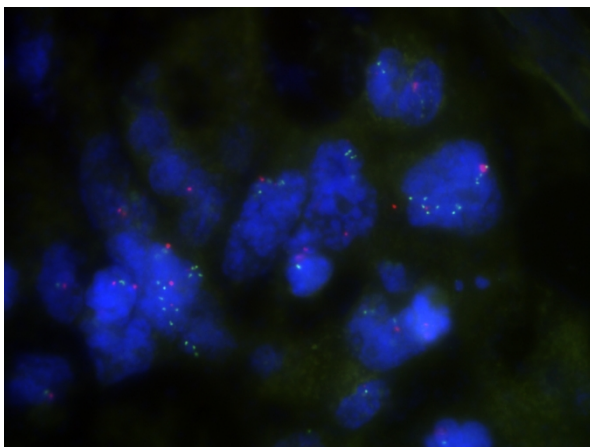


Abbildung 20: Karzinom mit HL-Amplifikation von c-Myc (Verhältnis 4:1)

Überlebenszeit, Lymphknotenmetastasierung und Grading bei FISH-c-Myc

Im Log-Rank-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Überlebenszeit und dem c-Myc-Amplifikationsstatus ($p=0,166$).

Für das Tumorigradung ergab sich ein statistisch nicht signifikanter Trend (Fisher-Test $p=0,086$). 74% der Tumoren ohne Amplifikation hatten ein G2-Grading, die anderen 26% wurden als G3 eingestuft. Bei den LL-Amplifikationen hatten 67% der Tumore ein

G2-Grading und 33% der Tumore ein G3. Bei den HL-Amplifikationen waren 33% der Tumore G2 und 67% der Tumore G3.

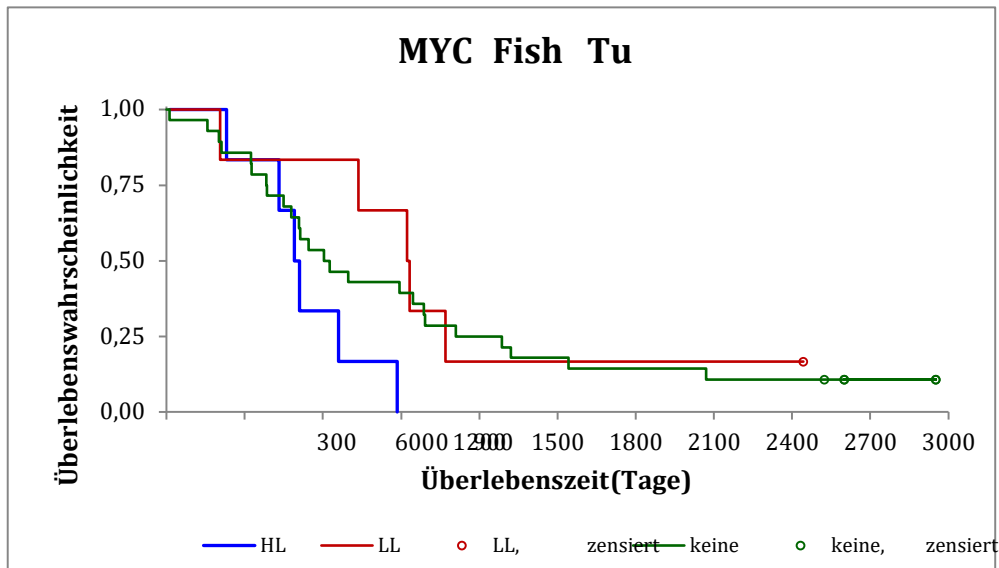


Abbildung 21: Überlebenszeit in Abhängigkeit von einer c-Myc-Genamplifikation

c-Myc- und uPAR-Amplifikation

Es konnte kein Zusammenhang zwischen einer c-Myc- und einer uPAR-Amplifikation nachgewiesen werden (Fisher-Test $p=0,753$).

3.11.5 uPAR-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die uPAR-FISH-Analyse ergab folgende Verteilung: 27 (47,4%) Tumore zeigten keine Amplifikation, 21 (36,8%) zeigten eine LL-Amplifikation und 9 (15,8%) zeigten eine HL-Amplifikation.

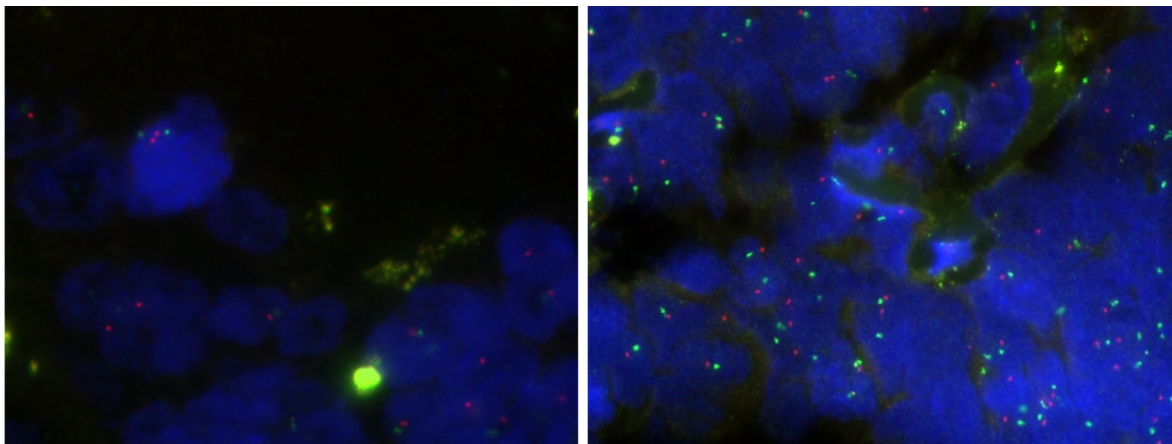


Abbildung 22: Karzinom ohne uPAR-Amplifikation (links), Karzinom mit LL-Amplifikation von uPAR (Verhältnis 2:1) (rechts), rot: Centromer-Sonde, grün: uPAR-Sonde

Überlebenszeit, Lymphknotenmetastasierung und Grading bei FISH uPAR

Es zeigte sich im Log-Rank-Test eine signifikante Verringerung der Überlebenszeit in der Gruppe der HL-Amplifikationen ($p=0,048$). Das mediane Überleben betrug ohne Amplifikation 698 Tage, bei einer LL-Amplifikation 831 Tage und bei einer HL-Amplifikation 501 Tage. Die durchschnittliche Überlebenszeit lag ohne Amplifikation bei 954 Tagen, bei einer LL-Amplifikation bei 1018 Tagen und bei einer HL-Amplifikation bei 463 Tagen.

Ein Zusammenhang zwischen der Lymphknotenmetastasierung und dem uPAR-Amplifikationsstatus konnte nicht nachgewiesen werden (Fisher-Test $p=0,260$).

Für das Grading ergab sich ein statistisch nicht signifikanter Trend (Fisher-Test $p=0,074$). Tumore ohne Amplifikation waren mit je 50% G2 und G3 gleich verteilt. Bei einer LL-Amplifikation waren 83% der Tumoren G2 und 17% G3. Tumoren mit HL-Amplifikation waren in 71% G2 und in 29% G3.

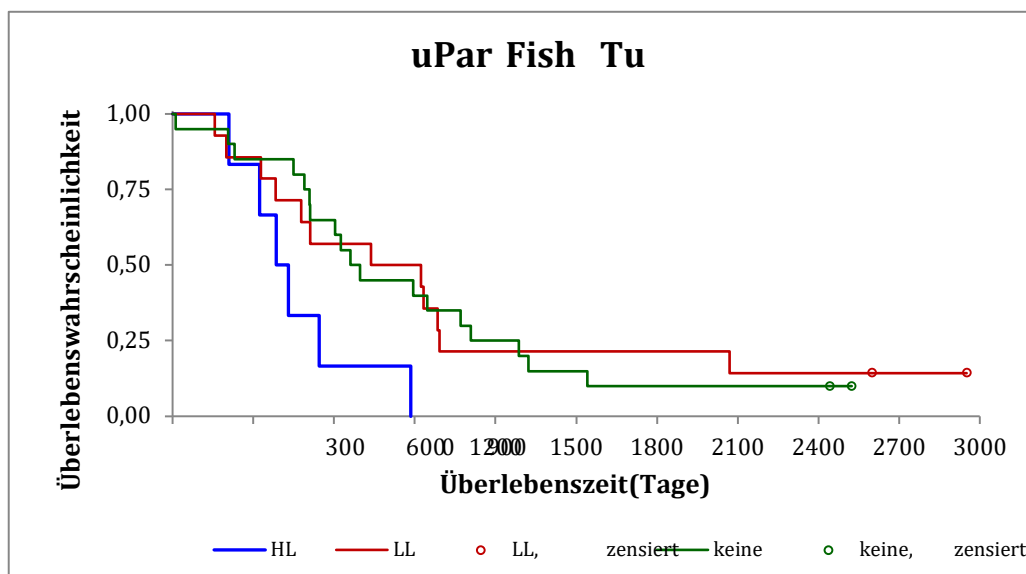


Abbildung 23: Überlebenszeit in Abhängigkeit mit den uPAR-Genamplifikationen

Es wurde untersucht, ob die Überlebenszeit von Patienten mit einer uPAR-LL-Amplifikation sich unterscheidet, wenn die Zellen immunhistochemisch c-Myc-positiv gefärbt sind bzw. wenn c-Myc amplifiziert ist. Es zeigte sich jedoch für beide Untersuchungen keine signifikante Korrelation (c-Myc-Immunhistochemie: Log-Rank-Test $p=0,156$; c-Myc-Amplifikation: Log-Rank-Test $p=0,665$).

3.11.6 KRAS-Mutationsanalyse

Die DNA-Analyse der Tumoren ergab folgende Verteilung der Punktmutationen. Somit waren bei 70,3% der Tumoren KRAS-Mutationen nachweisbar.

KRAS	Häufigkeit	Prozent
MUT (G12D)	17	29,3
MUT (G12V)	9	15,5
MUT (G12R)	7	12,1
MUT (G12A)	4	6,9
MUT (Q13D)	3	5,2
MUT (G12C)	1	1,7
WT	17	29,3

Tabelle 4: Verteilung der KRAS-Mutationen

Überlebenszeit, Lymphknotenmetastasierung und Grading

Es konnte kein Zusammenhang zwischen einer KRAS-Punktmutation und dem Überleben nachgewiesen werden (Log-Rank-Test $p=0,290$).

Auch für die verschiedenen KRAS-Punktmutationen konnte kein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit nachgewiesen werden (Log-Rank-Test $p=0,685$).

Zwischen dem Lymphknotenstatus, dem Tumorgrading und dem KRAS-Mutationsstatus konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (Lymphknotenstatus: Chi²-Test $p = 1,000$, Tumorgrading: Chi²-Test $p = 0,948$).

3.12 Datentabelle

Die folgende Datentabelle umfasst alle gewonnenen Parameter. Jedem Patienten wurde eine anonymisierte Kennziffer (ID) zugeteilt. Die immunologische p16- und p53-Färbung erfolgte am Tumor (p16 Tu) (p53 Tu) und der PanIN (p16 P) (p53 P). Die FISH Färbung erfolgte im Tumorgewebe auf uPAR (uPAR F Tu) und c-Myc (Myc F Tu). Die immunologische c-Myc (Myc I Tu) erfolgte lediglich am Tumor. KRAS wird als mutiert (Mut) oder Wildtyp (WT) angegeben. Das Überleben wird in Tagen angegeben. Patienten, die zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch lebten sind mit „+“ markiert. Es wurden die gängigen Abkürzungen für Grading (G), Lymphknotenstatus (N), Tumorausdehnung (T), Perineuralscheideninfiltration (Pn), Venengefäßinvasion (V), Resektionsstatus (R), Lymphgefäßinvasion (L) sowie das Geschlecht (♀ / ♂) verwendet.

Ergebnisse

ID	p16 Tu	p16 P	KRAS	p53 P	p53 Tu	uPAR F	Tu Myc F	Tu Myc I	Tu	Überleben	G	N	T	Alter	♀ / ♂	Pn	V	R	L	Stadium
1	0	0	WT	0	0	0	LL	1cyt		1070	2	1	3	70	M	1		x		IIB
2	0	0	MUT (G12D)	0	0	HL	0	0		544	2	1	3	69	M	1	0	1	1	IIB
3	0	0	MUT (G12D)	1	1	0	0			1109	3	1	3	73	M	0	0	0	1	IIB
4	1	0	MUT (G12V)	0	0	0	0	0		449	3	1	3	67	M	1	1	0	1	IIB
5	0	0	MUT (G12V)	0	2	LL	0	0		986	2	1	3	67	M		0	0	1	IIB
6	0		MUT (G12D)		2	0	HL			661	2	1	3	71	W	1	0	0	1	IIB
7	0		MUT (G12R)	2	LL	0		2nuc 1cyt		2951+	2	0	3	59	M		0	0	0	IIA
8	0	1	MUT (G12R)	0	0	HL	0			384		1	3	76	W		0	0	1	IIB
9	1	1	MUT (G12V)	0	0	LL	0	1cyt		2071	2	1	3	78	M		0	0	1	IIB
10	0	0	WT	0	0	LL	0	0			2	1	3	64	W		0	0	1	IIB
11	1nuc		MUT (Q13D)	0	0	0	0	1cyt		626	2	1	3	71	M		0	0	1	IIB
12	0	0	WT	1	1	0	0			603	3	1	3	75	M		0	0	1	IIB
13	0	1	MUT (Q13D)	0	0	HL	LL				2	0	3	80	M					IIA
14	0	0	MUT (G12V)	0	1	LL	0			156	3	0	3	60	W	1	1	1	1	IIA
15	0		MUT (G12D)	0	LL	LL	0			737	2	0	2	59	M	0	0	0	0	IB
16	0	1	WT	0	2	0	0	2cyt		894	2	1	3	66	W		1	1	1	IIB
17	0	0	WT	0	0	0	0	1nuc		1287	2	0	3	68	M		0	0	1	IIA
18	0	0	MUT (G12A)		1	0	0	0			3	0	3	56	W		0	0	1	IIA
19	0	0	MUT (G12D)	0	0	0	HL	0		491	3	1	3	62	W		0	0	1	IIB
20	0	0	MUT (G12A)	0	1	0	0	0			2	1	3	65	M		0	0	1	IIB
21	0	1	WT	0	1	LL	0	0		200	2	1	3	85	W		0	0	1	IIB
22	0	0	MUT (G12V)	0	2	0	0	1cyt		2524+	2	0	1	60	W		0	0	0	IA
23	1		MUT (G12D)	2	LL	0		2cyt		382	2	1	3	75	W	1	1	1	1	IIB
24	0	1	MUT (G12V)	0	1	HL	0	0		323	3	1	3	65	M		1	1	1	IIB
25	0	0	MUT (G13D)	0	0	LL	LL	0			2	1	4	66	M		0	0	1	III
26	0	0	MUT (G12R)	0	0	LL	0	0		478	3	1	3	70	W		1	1	1	IIB
27	1	1	MUT (G12A)	0	1	0	LL	0		206	3	1	3	72	W		1	2	1	IIB
28	0	1	WT	0	0	0	0	1cyt		12	3	1	3	82	M		0	0	1	IIB
29	0		MUT (G12D)	1	0	HL	1nuc			511	3	0	3	57	W		0	0	1	IIA
30	0	1	WT	0	1	0	HL	1cyt			2-3	1	3	74	W		1	0	1	IIB
31	0		WT	2	HL	HL	1cyt			885	2		3	74	W		0	0	0	
32	0		WT		2	LL	HL	0			3	1	3	68	M		1	0	1	IIB
33	0	1	WT	0	0	LL	0	1cyt		2600+	2	1	3	68	W		0	0	0	IIB
34	0	1	MUT (G12D)	0	1	LL	0	1cyt		512	2	1	3	79	M		1	0	1	IIB
35	0	1	MUT (G12D)	1	1	0	0	1cyt		1322	2	0	3	73	W		0	0	0	IIA
36	0		MUT (G12D)	2	LL	0		1cyt		327	2-3	1	3	63	M		1	1	1	IIB
37	1		MUT (G12D)	2	LL	LL	1cyt				2	1	3	74	M		0	1	1	IIB
38	0	0	MUT (G12D)	0	0	0	0	1cyt			3	1	3	66	M		1	0	1	IIB
39	0	0	MUT (G12R)	0	0	LL	HL	1cyt			2	1	3	70	W		0	1	1	IIB
40	0	0	MUT (G12R)	0	1	0	0	1cyt		509	3	1	3	79	M	1	0	0	1	IIB
41	0		WT	2	0	HL	0			231	3	1	3	55	M		0	0	1	IIB
42	0		MUT (G12V)	0	LL	HL	0				2	1	3	70	M		0	x	1	IIB
43	0	0	WT	0	0			0		2115+	2	0	3	74	W		0	0	0	IIA
44	0		MUT (G12A)	0	0	0	0	1cyt			2	1	3	53	W		0	0	1	IIB
45	0	1	WT	1	1	HL	LL	0			2	0	4	61	W		1	1	1	III
46	0		MUT (G12D)	2	HL	HL	1cyt			431	3	0	3	72	M		1	0	1	IIA
47	0		MUT (G12C)	2	0	0	0			946	2	1	3	75	M		0	0	1	IIB
48	0		WT	2	0	LL	0			2443+	3	1	3	76	W		1	x	1	IIB
49	0	1	WT	1	HL	0		2cyt		210	2	1	3	70	M		0	1	1	IIB
50	0		MUT (G12D)	1	0	HL	1cyt				3	1	4	66	M		0	1	1	III
51	0		MUT (G12V)	2	LL	0		1cyt		992	2	1	2	81	W	1	0	0	0	IIB
52	1		MUT (G12D)	2	0	0		1cyt		698	2	1	3	54	M		0	0	1	IIB
53	0	0	MUT (G12D)	0	0	LL	0	1cyt			2	0	3	71	W		0	x	0	IIA
54	1		WT		0	HL	0	0			2-3	0	3	72	M		0	x	1	IIA
55	0	1	MUT (G12D)	0	0	LL	LL	1cyt		924	3	0	2	65	W		0	0	0	IB
56	0		MUT (G12R)	1	0	0		1cyt			2	1	3	77	M		0	1	1	IIB
57	0	0	MUT (G12R)	0	2	0	0	1cyt		1542	2	1	3	61	M					IIB
58	0		MUT (G12V)	0	LL	LL	0			932	2	0	3	69	M		0	0	0	IIA

Datentabelle 5: WT= Wildtyp; MUT=Mutation; LL= low-level-Amplifikation; HL=high-level-Amplifikation; cyt= Cytoplasmafärbung; nuc= Zellkernfärbung; M= männlich; W= weiblich;

4 DISKUSSION

In der vorgelegten Arbeit wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen immunhistochemischen und molekularen Markern und dem Überleben von Patienten mit einem histologisch gesicherten Pankreaskarzinom besteht. Die Auswertung der Daten ergab Hinweise auf molekulare Subgruppen mit prognostischer Relevanz.

4.1 Überlebenszeit

Von den 41 Patienten, bei denen die Überlebenszeit ermittelt werden konnte, lebten nach einem Jahr noch 80,5%, nach drei Jahren noch 24,4% und nach fünf Jahren noch 7,3% der Patienten.

In einem Review von 2008 wurden alle in Pubmed publizierten Daten zur Überlebenszeit nach einer Pankreasresektion zusammengefasst (96). Hier ergaben sich für das ein-, drei- und fünf-Jahresüberleben Werte von 63,3%, 22,5% und 12,0% (96). Somit lag das Überleben nach einem Jahr bei den Patienten in dieser Arbeit über dem Durchschnitt, gleicht sich jedoch im Verlauf über die Jahre an.

Ein möglicher Grund dafür könnte die Operationsmortalität sein, welche in den letzten Jahren drastisch gesenkt werden konnte. In die Durchschnittswerte des Reviews gingen auch die älteren Daten und damit auch die Patienten, welche unmittelbar nach der Operation an Komplikationen verstorben waren, mit ein. Vor 1980 lag die Operationsmortalität noch bei 25% und hat sich bis zum Jahr 2000 kontinuierlich auf einen Wert von 2,9% gesenkt (96).

4.2 Patientenalter

Die Verteilung der Geschlechter von Frauen zu Männern mit 41,4% zu 58,6% entspricht den epidemiologischen Daten des Robert-Koch-Instituts (RKI) zum Pankreaskarzinom in Deutschland. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung betrug sowohl bei Frauen als auch bei Männern im erstellten Datensatz 69 Jahre. Damit liegt es unter den Durchschnitten des Alters bei Diagnosestellung in Deutschland, das für Männer bei 72 Jahren und bei Frauen bei 75 Jahren liegt (5). In dieser Studie war keine Korrelation zwischen dem Alter und dem Überleben nachweisbar. Dies könnte daran liegen, dass die erhobenen Daten nur von operierten Patienten stammen. Damit jedoch ein Patient eine so belastende Operation wie eine

Pankreasteilresektion überlebt, müssen der Allgemeinzustand des Patienten sowie das Tumorstadium die Operation erlauben. Morbidität und Operationsrisiko steigen mit dem Alter an, weshalb Patienten im höheren Alter eher weniger häufig operiert werden (97). Auch wenn die Operationssterblichkeit durch die Einführung von spezialisierten Zentren sich mittlerweile auf deutlich unter 10% beläuft, muss immer eine strenge Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen (98-100). Somit ist unter den operierten Patienten von einer Prä-Selektion auszugehen.

4.3 Lymphknotenstatus, Lymphgefäß- und Veneninvasion, Resektionsstatus, Perineuralscheideninfiltration

Die Auswertung des Lymphknoten-Status ergab einen statistisch nicht-signifikanten Trend für ein kürzeres Überleben bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen. Dieser Zusammenhang wurde auch bereits in der Literatur beschrieben (101, 102). Wenn keine Lymphknotenmetastasen in der näheren Umgebung des Tumors detektiert werden können, so ist es wahrscheinlich, dass die direkten Lymphabflussgebiete des Tumors noch nicht befallen sind. Dass dennoch keine klare Signifikanz nachgewiesen wurde, kann auch daran liegen, dass in der vorliegenden Studie nur pN0 (kein Lymphknoten positiv) und pN1 (ein oder mehrere Lymphknoten positiv) bewertet wurde. Konstantinidis et al. zeigten jedoch, dass sich die Prognose jeweils verschlechtert, wenn ein, zwei oder mehr als zwei Lymphknoten betroffen sind (102). Baldwin et al. konnten zeigen, dass Patienten mit nur einem oder zwei Lymphknotenmetastasen eine ähnliche Prognose haben wie Patienten, bei denen keine Lymphknotenmetastase gefunden wurde (103). Ebenso wurde als potentielle Fehlerquelle eine zu geringe Anzahl von ausgewerteten Lymphknoten identifiziert. Wurden weniger als 12 Lymphknoten ausgewertet und als N0 bewertet, zeigten die Patienten das gleiche Überleben wie Patienten, die eine Lymphknotenmetastase hatten (Stadium N1), bei denen aber mehr als 12 Lymphknoten ausgewertet wurden (104). Eine histologisch gesicherte Lymphgefäßinvasion zeigte in dieser Studie einen statistisch signifikanten Überlebensnachteil. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Lymphgefäßinvasion und dem Lymphknotenstatus wurde nachgewiesen. Die Lymphgefäßinvasion ist in der Literatur jedoch deutlich seltener untersucht. Die Studie von Chen et al. konnte einen signifikanten Überlebensnachteil bei Lymphgefäß- und Perineuralscheideninfiltration, sowie Lymphknotenmetastasierung nachweisen (105). Hatzaras et al. konnten ebenfalls eine

signifikant kürzere Überlebenszeit bei Lymphknotenmetastasen, Lymphgefäßbefall und einen Zusammenhang zwischen beiden Parametern nachweisen (106). Kang et al. konnten einen Überlebensvorteil bei R0-Resektion, negativem Lymphknotenstatus, sowie bei Lymphgefäß- und Veneninfiltration nachweisen. Die Lymphgefäß- und Veneninfiltration sowie der Resektionsstatus zeigten sich als zuverlässige Überlebensmarker. Das Tumor Stadium zeigte keine signifikante Korrelation mit der Überlebenszeit (107). Diese Beobachtung entspricht den von uns gefundenen Ergebnissen. Es ist daher zu begrüßen, dass 2017 eine neue UICC-Einteilung des Pankreaskarzinoms beschlossen wurde. Als Grundlage für diese Entscheidung diente eine prospektive Multi-Center-Studie. Es wurden 2318 Patienten, bei denen eine R0 Resektion vorlag, bezüglich des T- und N-Status untersucht. Dabei wurde die aktuelle Klassifikation mit der Klassifikation von 2010 verglichen (siehe 1.4). Es zeigte sich eine deutlich gleichmäßigere Verteilung der prozentualen Anteile bezüglich des T-Stadiums sowie eine bessere Korrelation mit der Überlebenszeit in der neuen Klassifikation. Bei der neuen Einteilung des Lymphknotenstatus konnte zwischen den jeweiligen Gruppen N0, N1 und N2 jeweils eine hochsignifikante Korrelation bezüglich der Überlebenszeit festgestellt werden (108).

Auch wenn die neue Klassifikation eine deutlich präzisere Prognose für die Überlebenswahrscheinlichkeit zulässt, stellten Li et al. 2018 eine weitere interessante Möglichkeit der Klassifikation vor. Sie werteten die Daten von 8615 Patienten aus dem nationalen Krebsregister der USA aus. Der Ansatz besteht darin, nicht nur die befallenen Lymphknoten zu werten, sondern ein Verhältnis der befallenen Lymphknoten zu allen resezierten Lymphknoten zu bilden (auch bezeichnet als lymph node ratio). Auch hier sollen drei verschiedene Gruppen aus den Verhältnissen gebildet werden, rN0, rN1 und rN2. Sie konnten damit nicht nur eine noch genauere Prognose der Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich des Lymphknotenstatus erzielen, sondern auch bei der Stadieneinteilung eine bessere Trennung und einheitlichere Überlebensprognose für die jeweiligen Stadien zeigen (109).

4.4 Grading

Das Grading zeigte eine statistisch signifikante Korrelation mit der Überlebenszeit und wird in der Literatur als unabhängiger prognostischer Marker gewertet (96, 101, 104, 110). Für das Tumorgrading beim Pankreaskarzinom wurden bis dato keine Kriterien (wie z.B. nach Art des Gleason-Scores beim Prostatakarzinom oder dem Elston-Ellis-

Score beim Brustkrebs) definiert. Daher ist das Tumorgrading vom untersuchenden Pathologen abhängig und bleibt somit eine subjektive Angabe (110). Da zwei verschiedene Pathologen die gleichen Tumoren unterschiedlich interpretieren können, gibt es zunehmend Bemühungen, durch die digitale Aufarbeitung der histologischen Schnitte eine einheitlichere Einteilung zu erhalten (111). Hierbei werden Tumoren auf verschiedene Merkmale wie den Gangdurchmesser oder das Kern-Zytoplasmaverhältnis untersucht (112). Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass das Grading durchaus ein prognostisch relevanter Marker für das Patientenüberleben ist und Anstrengungen für ein einheitliches System mit verbesserter Reproduzierbarkeit zu begrüßen sind.

Das Grading korrelierte jedoch mit keinem der untersuchten immunhistochemischen und molekularen Markern signifikant. Es zeigte sich allerdings ein statistischer Trend zu einem niedrigeren Grading bei Amplifikationen in c-Myc und uPAR, worauf in den jeweiligen Abschnitten näher eingegangen wird.

4.5 p16

Einen Zusammenhang zwischen einer p16-Färbung im Tumor und der Lymphknotenmetastasierung sowie mit dem Grading konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen dem Überleben der Patienten und der p16-Färbung festgestellt werden.

Es konnte jedoch hochsignifikant ein p16-Verlust von der Krebsvorstufe zum invasiven Karzinom nachgewiesen werden. Dieses Phänomen ist aus der Literatur gut bekannt und wird als Zusammenbruch der Seneszenzbarriere im Rahmen der Tumorprogression gedeutet (57). In dieser Arbeit waren nur 13,8% der Tumoren p16-positiv, was sich mit den Arbeiten von Rozenblum et al. und Hustinx et al. deckt. Beide haben in ihren Arbeiten einen p16-Verlust zwischen 80% und 95% in Adenokarzinomen des Pankreas beschrieben (113, 114). In der Arbeit von Kawesha et al. mit 142 Pankreaskarzinomen waren, wie auch in dieser Arbeit, nur 13% der Tumore p16-positiv und zeigten keine Korrelation bezüglich des Gradings, der Lymphknotenmetastasierung, oder dem Überleben (115). Auch in der Studie von Biankin mit 98 Patienten konnte p16 nicht mit einer längeren bzw. kürzeren Überlebenszeit korreliert werden (116).

Ohtsubo et al. (60 Patienten) und Gerdes et al. (62 Patienten) konnten ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der immunhistochemischen Färbung und

dem Grading, der Lymphknotenmetastasierung und dem Überleben finden. Beide konnten jedoch ein signifikant kürzeres Überleben der Patienten bei einer CDKN2A-Genmutation oder Promotorhypermethylierung nachweisen (62, 63).

In einem Review von 2011 konnte mit einer Fallzahl von 229 Patienten eine vorsichtige Aussage zu einer günstigeren Prognose bei noch vorhandener p16-Expression gemacht werden (117). Die Daten von Biankin und Ohtsubo wurden in diesem Review jedoch nicht berücksichtigt.

In einer bemerkenswerten Arbeit von Schlitter et al. wurden 177 Pankreaskarzinome sowohl auf ihre genetischen Mutationen als auch immunhistochemisch auf deren Proteinexpression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer intakten p16-Expression in den Pankreaskarzinomen, welche jedoch auch mit 22,8% eher selten waren, ein signifikant längeres Überleben zeigten. Zudem lebten alle vier Patienten mit einem KRAS-Wildtyp und einer intakten p16-Expression zum Ende der Studie noch. Es wurden zudem vermehrte Lymphknotenmetastasen festgestellt (118). Eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse könnte in der Fallzahl der Studien liegen. Da nur ein kleiner Prozentsatz der Tumoren überhaupt noch p16 exprimiert, werden höhere Fallzahlen benötigt, um eine Signifikanz zu zeigen.

Es hatten in dieser Arbeit also 13 (36,1%) Tumoren in ihrer Vorstufe noch p16 exprimiert, diese Eigenschaft jedoch als invasiver Tumor verloren. In dieser Arbeit wurde nur zwischen PanIN und Pankreaskarzinom unterschieden. Eine Differenzierung bezüglich der Schwere der Dysplasie zwischen PanIN I-III erfolgte nicht. Dies lässt zwar keine detaillierte Aussage darüber zu, ob es sich um einen frühen (PanIN I) oder späten (PanIN III) Prozess in der Tumorentstehung handelt, wohl aber, dass der p16-Verlust eine wichtige Rolle in der Entstehung des Pankreaskarzinoms spielt.

Bei Adenokarzinomen des Kolons konnte dieser Mechanismus ebenfalls beobachtet werden und wurde schon mehrfach belegt (119). Bennecke et al. konnten einen p16-Verlust an der Invasionsfront bei Kolonkarzinomen nachweisen (120).

Wilentz et al. konnten ebenfalls einen Verlust von p16 im Zytoplasma von den Tumorstufen zum invasiven Pankreaskarzinom beobachten (66). In der Arbeit von Bardeesy et al. wurde der p16-Verlust in PanIN genauer untersucht. Dort wurde der Ausfall von p16 am häufigsten in PanIN-Läsionen vom Typ 2 beobachtet (121).

In der Arbeit von Collado et al. konnte im Labor eine erhöhte p16-Expression in den Krebsvorstufen bei Vorliegen einer KRAS-Mutation nachgewiesen werden. Die

Adenokarzinome, welche sich aus diesen Vorstufen entwickelten, waren jedoch p16-negativ (122).

In einem Versuch mit p16-Knock-Out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass dies alleine nicht zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms reicht. Bei diesen Mäusen war p19ARF aber nach wie vor intakt. Zusammen mit einer Punktmutation im KRAS-Gen im Codon 12 konnte jedoch ein Pankreaskarzinom ausgelöst werden (70). Die Vermutung, dass eine KRAS-Mutation auch mit einer häufigeren p16-Expression einhergeht, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Dazu wurde verglichen, ob die Krebsvorstufen häufiger p16-positiv sind, wenn die Tumoren eine KRAS-Mutation aufweisen.

Die oben genannten Arbeiten stützen die These, dass auch beim Pankreaskarzinom eine Adenom-Karzinom-Sequenz vorliegt.

p16 in Langerhans Inseln

P16-positive Langerhans Inseln waren in allen Tumorschnitten in nicht befallenen Pankreasgewebe zu sehen. Dies wurde ebenso in einer Studie beschrieben, in der die p16-Expression neuroendokriner Tumoren des Pankreas untersucht wurde (94). Der Zellumsatz und die Regeneration von Betazellen lässt mit dem Alter deutlich nach und es werden kaum noch Zellen neugebildet (123). Die Expression von p16 in Betazellen korreliert mit dem Alter der Zellen. Es ist daher wahrscheinlich, dass der Zellzyklus in diesen gealterten Zellen durch p16 gehemmt wird (124, 125). Da die Patienten im Schnitt 69 Jahre alt waren, ist die p16-Färbung der Langerhans Inseln nicht verwunderlich. Es konnte in Mäusen nachgewiesen werden, dass mit abnehmender Länge der Telomere auch die p16-Expression steigt. Auch wenn die Gesamtmasse an Betazellen nicht abnimmt, so lässt mit zunehmendem Alter die Insulinausschüttung dieser Zellen nach. Es ist wahrscheinlich, dass die durch p16 eingeleitete Seneszenz eine wichtige Rolle in der Entstehung des Altersdiabetes (Diabetes mellitus Typ 2) spielt (126). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gilt der Diabetes mellitus Typ 2 als ein Risikofaktor in der Entstehung des Pankreaskarzinoms, auch wenn die genauen molekularen Zusammenhänge noch nicht geklärt sind.

4.6 p53

Die immunhistochemische p53-Färbung ergab im Tumorgewebe bei 24 Fällen (41,4%) keine Färbung, bei 17 Fällen (29,3%) eine schwache Färbung und bei weiteren 17

Fällen (29,3%) eine starke Färbung. Bei den analysierten PanIN zeigte sich bei 30 (88,2%) keine und bei vier (11,8%) eine Färbung.

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen einer immunhistochemischen p53-Färbung, der Überlebenszeit, der Lymphknotenmetastasierung und dem Tumorigrad gefunden werden. Es zeigte sich lediglich ein nicht signifikanter Trend zu einer kürzeren Überlebenszeit bei einer p53-Expression. Besonders bei moderat gefärbten Tumoren zeigte sich ein Trend zu einem kürzeren Überleben. Fälle mit negativer Färbung sowie einer starken Färbung zeigten jedoch wieder eine ähnliche Überlebenszeit. Da es sich hier jedoch um einen subjektiven Parameter handelt, gehen wir nicht davon aus, dass es sich um einen prognostisch relevanten Marker handelt.

Auch Reviews, die die prognostische Aussagekraft von immunhistochemischen Markern untersuchten, konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Überleben sowie dem Grading und einer p53-Expression zeigen (117, 127).

Die p53-Färbung im Tumorgewebe wurde mit dem Lymphknotenstatus verglichen, zeigte jedoch keine signifikante Assoziation. In der Arbeit von Morton et al. konnte in einem Versuch mit Mäusen, die ein mutiertes p53-Protein exprimierten, eine gehäufte Metastasierung beobachtet werden (128).

Die PanIN-Vorstufen wurden in dieser Arbeit mit den Tumoren verglichen. Hierbei zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen Nachweis von p53 in Vorstufen und im Karzinom. Allerdings waren nur vier PanIN-Läsionen positiv, weshalb diese Aussage mit Vorbehalt zu betrachten ist.

Von Hermanova wurde eine Zunahme der Expression von p53 von PanIN I zu PanIN III und weiter zum Adenokarzinom beschrieben (129, 130). Auch andere Quellen beschrieben das gehäufte Auftreten von p53 erst in hochgradigen Vorstufen bzw. dem invasiven Adenokarzinom (131, 132).

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es eine deutliche Zunahme der p53-Proteinfärbung von der Krebsvorstufe zum Adenokarzinom gibt.

Dieser Umstand mag auf den ersten Blick verwirren, da p53 den Zellzyklus hemmt und die Apoptose einleiten kann. Es wäre zu erwarten, dass sich p53 in der Färbung ähnlich wie p16 verhält und eine erhöhte Expression eine Tumorentstehung hemmt.

Wie bereits oben beschrieben, verhält es sich mit der Färbung von p53 jedoch anders. Eine gute Erklärung für die erhöhte p53-Färbung in Tumoren wurde von Soussi et al. geliefert. Eine Akkumulation von p53 im Zellkern kommt bei gesunden Zellen kaum

vor. Wildtyp-p53 hat eine Halbwertszeit von ca. 20 Minuten. Ist p53 jedoch mutiert, kann es eine Halbwertszeit von bis zu fünf bis zehn Stunden haben und akkumuliert dann im Zellkern (95, 133). Somit weist eine immunhistochemische Färbung von p53 auf eine Mutation und einen Funktionsverlust in mindestens einem Allel hin (126). Witkiewicz et al. führten sowohl eine Gensequenzierung als auch eine immunhistochemische Färbung von p53 durch. Hier zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen einer positiven Färbung und einer Genmutation von p53 (40). Schlitter et al. konnten dies noch weiter spezifizieren, da sie ebenfalls eine immunhistochemische Färbung und eine DNA-Analyse durchführten. Sie konnten zeigen, dass es sowohl eine Färbung bei mutiertem p53 (52%) und beim p53-Wildtyp (21,5%) gibt. Ebenso zeigten sie jedoch, dass es auch zu einem vollständigen Verlust der Färbung kommen kann, wenn p53 (26,5%) mutiert ist. Alle drei Gruppen zeigten jedoch keine Korrelation mit den auch hier untersuchten Parametern (118). In dieser Studie zeigten insgesamt 58,6% der Tumoren eine erhöhte Expression. Geht man davon aus, dass eine immunhistochemische Anfärbung mit einer Mutation von p53 einhergehen kann, dann würde sich dies mit der von Scarpa et al. und Wadell et al. beschriebenen Häufigkeit der p53-Mutation im Pankreaskarzinom von 50%-75% decken (134, 135).

Der Trend zu einer kürzeren Überlebenszeit, wie er sich in dieser Studie bei moderater Färbung ergab, ist jedoch sehr wahrscheinlich als statistisches Artefakt zu werten. Sollte p53 ein prognostisch relevanter Marker sein, wäre bei moderater Färbung eher eine längere Überlebenszeit zu erwarten, da eine starke Färbung eher eine Akkumulation von mutiertem p53 widerspiegeln würde.

4.7 c-Myc-immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische c-Myc-Auswertung ergab keine signifikante Korrelation mit dem Überleben, Lymphknotenmetastasen, sowie dem Grading. Die positiven c-Myc Färbungen wurden trotz ihrer unterschiedlichen Ausprägung in zwei Gruppen eingeteilt. Für die statistische Auswertung wurde nur berücksichtigt, ob keine Färbung vorlag, oder ob die Tumorzellen angefärbt waren.

Da die Fallzahlen für eine genauere statistische Analyse der einzelnen positiven Färbungen zu gering waren, konnten diese nicht näher charakterisiert werden.

In einer Studie von He et al. wurden 162 Pankreaskarzinome mittels Microarray nach einer immunhistochemischen c-Myc-Färbung ausgewertet (101). Hier konnte eine

starke c-Myc-Zytoplasmafärbung mit einer signifikant schlechteren Überlebenszeit gegenüber einer schwachen c-Myc-Zytoplasmafärbung korreliert werden.

Schleger et al. zeigten zudem in ihrer Studie zum Pankreaskarzinom, dass eine erhöhte c-Myc-Expression mit einer niedrigeren Differenzierung der Tumorzellen einhergeht (136).

Bei La Rosa et al. zeigte sich keine Signifikanz bei einer c-Myc-Expression bezüglich der Prognose (137).

Weshalb es so unterschiedliche Ergebnisse für den prognostischen Wert von c-Myc gibt, ist nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung könnten die Erkenntnisse der Arbeit von Nie liefern. c-Myc ist demnach kein spezieller Transkriptionsfaktor für bestimmte Gene, sondern steigert vielmehr die Expression von bereits aktiven Genen in der Zelle (138).

Hessmann et al. gehen in einer Übersichtarbeit zu c-Myc auf die vielen komplexen Möglichkeiten ein, welche die Expression von c-Myc beeinflussen. Sowohl extrazelluläre Signalwege wie auch die intrazellulären Mechanismen und Wechselwirkungen zeigen multiple Optionen, um eine vermehrte Expression zu modulieren (139). Dadurch könnte man zu dem Schluss kommen, dass es vielmehr auf andere fehlregulierte Gene in der Tumorzelle ankommt und erst die Verstärkung dieser Gene durch c-Myc zu einer Tumorentstehung führt.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob uPAR als prognostisch unabhängiger Marker und wegen seiner in der Einleitung beschriebenen molekularen Eigenschaften eine solche Rolle einnimmt. Da eine HL-Amplifikation von uPAR sich als prognostisch unabhängiger negativer Marker erwiesen hat, wurde die Gruppe der LL-Amplifikationen auf ihre c-Myc-Expression hin untersucht. Patienten, welche eine LL-Amplifikation und eine erhöhte c-Myc-Expression aufweisen, müssten demnach ein kürzeres Überleben zeigen. In dieser Studie konnte aber kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit der beiden Gruppen nachgewiesen werden.

Warum eine erhöhte immunologische Färbung in manchen Pankreastumoren zu finden ist kann daher, auch nach intensiver Literaturrecherche, nicht abschließend geklärt werden.

4.8 c-Myc-FISH

11 (19,3%) der Tumorschnitte wiesen eine HL-, 10 (17,5%) eine LL- und 36 (63,2%) keine Amplifikation des c-Myc-Genlokus auf.

Der Amplifikationsstatus zeigte keine Korrelation mit der Überlebenszeit, dem Grading und der Lymphknotenmetastasierung.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen einer c-Myc-Amplifikation und einer immunhistochemisch nachgewiesenen c-Myc-Expression gefunden werden.

In der Arbeit von Schleger et al. an 69 Pankreaskarzinomen konnte ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen einer Genamplifikation und den auch von uns getesteten Parametern (Überlebenszeit und Proteinexpression) gefunden werden (136). Witkiewicz et al. wiesen bei 102 Patienten mit einem Pankreaskarzinom durch Sequenzierung der DNA eine Amplifikation von c-Myc nach und bestätigten diese durch eine FISH Analyse. Hier zeigten 55% keine Amplifikation, 35% eine LL- und 10% ein HL-Amplifikation. Es konnte jedoch eine signifikante Korrelation zu einem kürzeren Überleben sowohl bei der LL- als auch bei der HL-Gruppe nachgewiesen werden (40). Auch konnten La Rosa et al. eine Tendenz, wenn auch keine klare Signifikanz hin zu einer kürzeren Überlebenszeit zeigen (137).

In einer Studie über das Urothelkarzinom von Christoph et al. konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen einer vermehrten Expression und einer Gen-Amplifikation gezeigt werden (140).

Bei der FISH-Analyse scheint eine endgültige Aussage über den Wert von c-Myc als prognostischer Marker zumindest mit den hier verfügbaren Fallzahlen nicht möglich. Auch wegen der höheren Fallzahlen und der methodisch besseren Auswertung des Genlokus mittels FISH und DNA-Analyse geben die oben genannten Studien Anlass zu der Vermutung, dass eine c-Myc-Genamplifikation prognostisch relevant sein könnte.

Grading und Morphologie bei c-Myc Amplifikation

In dieser Studie zeigte sich ein statistisch nicht-signifikanter Zusammenhang zwischen c-Myc-Amplifikationen und dem Tumorgrading. Pankreastumoren mit einer Amplifikation zeigten tendenziell eher ein niedrigeres Grading. In einer weiteren Studie von Schleger et al. wurden die verschiedenen Amplifikationen der Pankreaskarzinome untersucht. Es konnte sich hier jedoch kein Zusammenhang mit der Anzahl bzw. der Art der verschiedenen Amplifikationsorte und dem Grading nachweisen lassen (141). Es war in unserer Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Amplifikation von c-Myc und uPAR nachzuweisen. Dies stützt die These, dass beide Gene nicht auf Grund einer vermehrten generellen Amplifikation im Rahmen einer

chaotischen Tumorentartung und erhöhter Mutationslast (mutation burden) amplifiziert wurden. Auch ein eher niedrigeres Tumorigradung spricht diesbezüglich für diese These.

Bei Witkiewicz et al. konnte keine erhöhte Mutationslast in den c-Myc-amplifizierten Tumoren festgestellt werden. Es zeigte sich zudem in Ihrer Studie eine signifikante Häufung des Adenosquamosen Karzinoms bei c-Myc-Amplifikation (40).

4.9 uPAR-FISH

Die Auswertung der Amplifikationen des uPAR-Gens mittels einer FISH-Analyse ergab folgende Verteilung. 27 (47,4%) Tumore zeigten keine Amplifikation, 21 (36,8%) zeigten eine LL- und 9 (15,8%) zeigten eine HL-Amplifikation.

In dieser Studie zeigte sich uPAR als ein unabhängiger prognostischer Marker beim Pankreaskarzinom. Patienten mit einer HL-Amplifikation starben signifikant früher als Patienten mit einer LL-Amplifikation bzw. ohne Amplifikation.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Amplifikationen und der Lymphknotenmetastasierung sowie dem Grading konnte nicht gezeigt werden.

Harvey et al. konnten in einer Studie eine Tendenz zu einem geringeren Überleben bei Patienten, die eine erhöhte Expression von uPA und uPAR in der Tumorzelle hatten, feststellen (142). Cantero et al. konnten bei einer vermehrten Expression von uPA und uPAR ein signifikant kürzeres postoperatives Überleben feststellen (143). In der Studie von Hildenbrand et al. korrelierten sowohl eine LL- wie auch eine HL-Amplifikation von uPAR mit einer signifikant geringeren Überlebenszeit. Es konnte zudem bei einer Genamplifikation auch eine erhöhte Proteinkonzentration in den Tumorzellen nachgewiesen werden (144). In der Studie von Hildenbrand et al. konnte ein Zusammenhang zwischen einer uPAR-Amplifikation und einer vermehrten Lymphknotenmetastasierung ebenfalls nicht festgestellt werden. In einer Studie mit Proben von Mammakarzinomen wurde sowohl uPA als auch uPAR untersucht. Es zeigte sich jedoch auch hier kein Zusammenhang mit dem Grading oder der Lymphknotenmetastasierung (145).

uPAR, uPAR und uPA sind bisher deutlich weniger gut in Pankreaskarzinomen erforscht als alle anderen untersuchten Marker in dieser Studie. Umso erstaunlicher ist es, dass sich eine HL-Amplifikation des Genlokus als prognostisch relevant erwies. Da es sich beim Genprodukt um ein extrazelluläres Signalprotein handelt, ist es auch einer potentiellen Antikörpertherapie leicht zugänglich. Wang et al. zeigten, dass es zu

einer vermehrten uPA-Expression nach Gemcitabin-Exposition bei Pankreastumoren kommt. Dies hatte eine Resistenz der Pankreastumoren gegenüber Gemcitabin zur Folge (146).

Gorantla et al. stellten eine interessante Studie vor, bei der menschliche Pankreastumorzellen in Mäuse implantiert wurden. Bei einigen Tumoren wurde zuvor die Expression von uPAR und UPA durch die Behandlung mit einem Plasmid gehemmt. Diese Tumoren zeigten eine geringere Angiogenese, die erneute Einleitung der Seneszenz sowie die Einleitung des extrinsischen Apoptosewegs (147).

Es ist daher dringend notwendig, das vielversprechende Potential dieses Signalproteins, dessen Genlokus und Liganden weiter zu untersuchen.

Grading bei uPAR Amplifikation

Das Grading korrelierte in dieser Studie zwar nicht signifikant mit der Genamplifikationen, zeigte jedoch eine statistische Tendenz. Erstaunlich dabei war jedoch, dass sowohl LL- wie auch HL-Amplifikationen eher häufiger mit einem G2- als mit einem G3-Grading einhergehen. Wie bereits beschrieben, ist das Grading jedoch ebenfalls ein unabhängiger prognostischer Marker. Sollte sich diese Tendenz in weiteren Studien bestätigen, so macht es uPAR zu einem umso wichtigeren prognostischen Faktor der Überlebenszeit. uPAR als prognostischer Marker würde damit auch das Patientenkollektiv mit einem niedrigen Grading durch einen zweiten Parameter weiter unterteilen und somit eine genauere prognostische Aussage zulassen. Da die Datenlage diesbezüglich dünn ist, kann jedoch keine abschließende Aussage getroffen werden.

4.10 KRAS

Die KRAS-DNA-Analyse zeigte keine Signifikanz bezüglich der Überlebenszeit, des Gradings und der Lymphknotenmetastasierung.

KRAS als prognostischer Marker wurde bereits in vielen Studien untersucht. Hier zeigte sich in vielen Studien kein signifikanter Zusammenhang mit der Überlebenszeit und dem Grading (115, 148-150). Die häufigste Punktmutation war in der Arbeit von Motojima, Hruban und Kawesha eine Punktmutation der 12. Aminosäure, was einen Tausch von Glycin (G) zu Asparaginsäure (D) zur Folge hatte. In der Arbeit von Hruban und Kawesha war zudem noch die zweithäufigste Mutation, von Glycin (G) zu Valin

(V) der 12. Aminosäure beschrieben. Diese Resultate decken sich mit den Ergebnissen in dieser Arbeit.

Kawesha konnte in seiner Studie keine Korrelation mit der Überlebenszeit und dem Grading für Punktmutationen im Allgemeinen finden. Er fand aber zwischen den verschiedenen Punktmutationen in Codon 12 Unterschiede in der Überlebenszeit (115). So zeigte sich für eine Mutation, die den Tausch von Glycin (G) zu Asparginsäure (D), G zu Arginin (R) sowie G zu Alanin (A) zur Folge hatte, eine signifikant kürzere Überlebenszeit.

In der Studie von Schlitter et al. zeigten 93% der Pankreastumoren überwiegend eine Mutation in Codon zwei des KRAS-Gens. Sie stellten zudem eine signifikant längere Überlebenszeit bei Patienten, welche einen Wildtyp im KRAS-Gen hatten, fest (118). Witkiewicz et al. stellten bei 93% der untersuchten Pankreastumoren eine Mutation im KRAS-Gen fest. Es zeigte sich ein signifikant längeres Überleben der Patienten, wenn das KRAS-Gen in Exon 3 im 61. Codon eine Mutation hatte (40).

In unserer Studie zeigten sich keine Unterschiede in der Überlebenszeit zwischen den vermeintlichen Risikogruppe, den anderen Punktmutationen und den KRAS-Wildtypen. Aufgrund des hohen prozentualen Anteils an Mutationen in KRAS ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein wesentliches Ereignis in der Entstehung des Pankreaskarzinoms handelt.

Auch wenn es in der Literatur Belege dafür gibt, dass es sich um einen prognostischen Marker für die Überlebenszeit handelt, ist diese Frage nicht abschließend geklärt. Der sehr hohe Anteil an mutiertem KRAS in Pankreaskarzinomen macht es jedoch ohnehin zu keinem idealen prognostischen Marker.

Die Blockierung von nachgeschalteten Signalwege von KRAS sind daher von um so größerem therapeutischen Interesse, wie bereits in der Einleitung erklärt.

Auch konnte in einer Studie an Lungen- und Kolonkarzinomen gezeigt werden, dass uPAR bei RAS-mutierten Tumoren deutlich häufiger exprimiert wird (151).

Unter dem Aspekt, dass KRAS-Mutationen nicht die Ausnahme, sondern die Regel bei Pankreaskarzinomen darstellen, wäre es daher sinnvoll, auch die damit in Zusammenhang stehenden Signalwege, wie es zum Beispiel das uPAR-System darstellt, näher zu untersuchen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen mehreren histopathologischen und molekularen Faktoren und der Prognose beim Pankreaskarzinom untersucht. Bei Patienten mit resektablem Pankreaskarzinom spielte das Alter bei Operation keine entscheidende Rolle für das tumorspezifische Überleben. Bei Lymphknotenmetastasen zeigte sich eine Tendenz bezüglich eines schlechteren Überlebens. Die Lymphgefäß- und Venengefäßinfiltration, der Resektionsstatus und das Grading zeigten eine signifikante Korrelation mit der Überlebenszeit. Lymphgefäßinfiltration und Lymphknotenstatus zeigten einen signifikanten Zusammenhang. Die immunhistochemischen Marker (c-Myc, p16, p53) und die DNA-Analyse von KRAS zeigten keine Korrelation mit der Überlebenszeit, der Lymphknotenmetastasierung sowie dem Grading. Der Verlust von p16 beim Übergang von der Tumorstufe zum Karzinom war in dieser Studie bei 86% der Fälle nachweisbar. Eine deutliche Zunahme der Proteinfärbung beim Übergang von der Tumorstufe zum Karzinom bei p53 konnte gezeigt werden.

Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass der Verlust von p16 und die Akkumulation von vermutlich mutiertem p53 eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms spielt. Die immunhistochemische c-Myc-Färbung zeigte keine Korrelation mit der c-Myc-Amplifikation in der c-Myc-FISH-Untersuchung. Der c-Myc-Genamplifikationsstatus zeigte keine signifikante Korrelation mit dem Überleben, dem Lymphknotenstatus und dem Grading. Es zeigte sich jedoch sowohl für c-Myc als auch für uPAR ein statistischer Trend zu einem niedrigeren Grading bei Vorliegen einer Amplifikation. Die HL-Amplifikation von uPAR ging mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit einher, zeigte jedoch keine Korrelation bezüglich des Lymphknotenstatus und des Grading. Die high-level-Amplifikation von uPAR erwies sich als relevanter prognostischer Marker und sollte bezüglich ihrer zellulären Konsequenzen weiter untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ogami Y, Otsuki M. Exocrine pancreatic physiology: overview. *Pancreas*. 1998;16(3):265-72.
2. Babu V, Paul N, Yu R. Animal models and cell lines of pancreatic neuroendocrine tumors. *Pancreas*. 2013;42(6):912-23.
3. Oberg K, Eriksson B. Endocrine tumours of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19(5):753-81.
4. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, et al. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol*. 2008;26(18):3063-72.
5. Robert Koch Institut zK. Übersichten zu den Krebsneuerkrankungs- und Krebssterbefällen. 2015.
6. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(2):71-96.
7. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;62(1):10-29.
8. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2011;378(9791):607-20.
9. Seufferlein T, Porzner M, Becker T, Budach V, Ceyhan G, Esposito I, et al. [S3-guideline exocrine pancreatic cancer]. *Z Gastroenterol*. 2013;51(12):1395-440.
10. Wittekind C. TNM Klassifikation maligner Tumoren: Wiley- VCH, Weinheim; 2017.
11. Wittekind C. TNM Klassifikation maligner Tumoren: Wiley- VCH, Weinheim; 2010.
12. Vrieling A, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC, Michaud DS, Severinsen MT, Overvad K, et al. Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2010;126(10):2394-403.
13. Chuang SC, Gallo V, Michaud D, Overvad K, Tjonneland A, Clavel-Chapelon F, et al. Exposure to environmental tobacco smoke in childhood and incidence of cancer in adulthood in never smokers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Causes Control*. 2011;22(3):487-94.
14. Tramacere I, Scotti L, Jenab M, Bagnardi V, Bellocco R, Rota M, et al. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Int J Cancer*. 2010;126(6):1474-86.
15. Michaud DS, Vrieling A, Jiao L, Mendelsohn JB, Steplowski E, Lynch SM, et al. Alcohol intake and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (PanScan). *Cancer Causes Control*. 2010;21(8):1213-25.
16. Ji BT, Chow WH, Gridley G, McLaughlin JK, Dai Q, Wacholder S, et al. Dietary factors and the risk of pancreatic cancer: a case-control study in Shanghai China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995;4(8):885-93.
17. Aune D, Greenwood DC, Chan DS, Vieira R, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, et al. Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol*. 2012;23(4):843-52.
18. Orgel E, Mittelman SD. The links between insulin resistance, diabetes, and cancer. *Curr Diab Rep*. 2013;13(2):213-22.

19. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer*. 2005;92(11):2076-83.
20. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Timmons LJ, Ransom J, de Andrade M, et al. Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. *Gastroenterology*. 2008;134(1):95-101.
21. Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Barrett AJ. Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid. Activation of human trypsinogen 1. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1988;369 Suppl:293-8.
22. Kolodecik T, Shugrue C, Ashat M, Thrower EC. Risk factors for pancreatic cancer: underlying mechanisms and potential targets. *Front Physiol*. 2013;4:415.
23. Baumgart S, Chen NM, Siveke JT, Konig A, Zhang JS, Singh SK, et al. Inflammation-induced NFATc1-STAT3 transcription complex promotes pancreatic cancer initiation by KrasG12D. *Cancer Discov*. 2014;4(6):688-701.
24. Spanier BW, Dijkgraaf MG, Bruno MJ. Trends and forecasts of hospital admissions for acute and chronic pancreatitis in the Netherlands. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20(7):653-8.
25. Jemal A, Simard EP, Xu J, Ma J, Anderson RN. Selected cancers with increasing mortality rates by educational attainment in 26 states in the United States, 1993-2007. *Cancer Causes Control*. 2013;24(3):559-65.
26. Silverman DT, Hoover RN, Brown LM, Swanson GM, Schiffman M, Greenberg RS, et al. Why do Black Americans have a higher risk of pancreatic cancer than White Americans? *Epidemiology*. 2003;14(1):45-54.
27. Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;6(12):699-708.
28. Petersen GM, de Andrade M, Goggins M, Hruban RH, Bondy M, Korczak JF, et al. Pancreatic cancer genetic epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(4):704-10.
29. Brune KA, Lau B, Palmisano E, Canto M, Goggins MG, Hruban RH, et al. Importance of age of onset in pancreatic cancer kindreds. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(2):119-26.
30. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *Jama*. 2007;297(3):267-77.
31. Ueno H, Kosuge T, Matsuyama Y, Yamamoto J, Nakao A, Egawa S, et al. A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Br J Cancer*. 2009;101(6):908-15.
32. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(12):1200-10.
33. Stocken DD, Buchler MW, Dervenis C, Bassi C, Jeekel H, Klinkenbijn JH, et al. Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2005;92(8):1372-81.
34. Poplin E, Feng Y, Berlin J, Rothenberg ML, Hochster H, Mitchell E, et al. Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2009;27(23):3778-85.

35. Sultana A, Smith CT, Cunningham D, Starling N, Neoptolemos JP, Ghaneh P. Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(18):2607-15.
36. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figier A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.* 2007;25(15):1960-6.
37. Pelzer U, Schwaner I, Stieler J, Adler M, Seraphin J, Dorken B, et al. Best supportive care (BSC) versus oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (OFF) plus BSC in patients for second-line advanced pancreatic cancer: a phase III-study from the German CONKO-study group. *Eur J Cancer.* 2011;47(11):1676-81.
38. Agarwal A, Saif MW. KRAS in pancreatic cancer. *Jop.* 2014;15(4):303-5.
39. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16022.
40. Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Baek G, Lin WC, Mansour J, et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nature communications.* 2015;6:6744.
41. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 1991;349(6305):117-27.
42. Schneider G, Schmid RM. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer.* 2003;2:15.
43. Trahey M, McCormick F. A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science (New York, NY).* 1987;238(4826):542-5.
44. Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell.* 2012;149(3):656-70.
45. Lindberg JM, Newhook TE, Adair SJ, Walters DM, Kim AJ, Stelow EB, et al. Co-treatment with panitumumab and trastuzumab augments response to the MEK inhibitor trametinib in a patient-derived xenograft model of pancreatic cancer. *Neoplasia.* 2014;16(7):562-71.
46. Hayes TK, Neel NF, Hu C, Gautam P, Chenard M, Long B, et al. Long-Term ERK Inhibition in KRAS-Mutant Pancreatic Cancer Is Associated with MYC Degradation and Senescence-like Growth Suppression. *Cancer Cell.* 2016;29(1):75-89.
47. Berton. Immunohistochemische und molekulargenetische Charakterisierung kolorektaler Karzinome. 2015.
48. Nieminen AI, Eskelinen VM, Haikala HM, Tervonen TA, Yan Y, Partanen JI, et al. Myc-induced AMPK-phospho p53 pathway activates Bak to sensitize mitochondrial apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(20):E1839-48.
49. Nieminen AI, Partanen JI, Klefstrom J. c-Myc blazing a trail of death: coupling of the mitochondrial and death receptor apoptosis pathways by c-Myc. *Cell Cycle.* 2007;6(20):2464-72.
50. Hydbring P, Bahram F, Su Y, Tronnorsjo S, Hogstrand K, von der Lehr N, et al. Phosphorylation by Cdk2 is required for Myc to repress Ras-induced senescence in cotransformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(1):58-63.
51. Hydbring P, Larsson LG. Cdk2: a key regulator of the senescence control function of Myc. *Aging (Albany NY).* 2010;2(4):244-50.

52. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(10):764-76.
53. Hu Y, Zheng M, Gali R, Tian Z, Topal Gorgun G, Munshi NC, et al. A novel rapid-onset high-penetrance plasmacytoma mouse model driven by deregulation of cMYC cooperating with KRAS12V in BALB/c mice. *Blood Cancer J*. 2013;3:e156.
54. Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*. 1992;359(6395):552-4.
55. Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ*. 2011;18(9):1414-24.
56. Tao W, Levine AJ. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(12):6937-41.
57. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366(6456):704-7.
58. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1602(1):73-87.
59. Reid MD, Saka B, Balci S, Goldblum AS, Adsay NV. Molecular genetics of pancreatic neoplasms and their morphologic correlates: an update on recent advances and potential diagnostic applications. *Am J Clin Pathol*. 2014;141(2):168-80.
60. Mishra PK, Raghuram GV, Jain D, Jain SK, Khare NK, Pathak N. Mitochondrial Oxidative Stress-Induced Epigenetic Modifications in Pancreatic Epithelial Cells. *Int J Toxicol*. 2014.
61. Li G, Ji Y, Liu C, Li J, Zhou Y. Reduced levels of p15INK4b, p16INK4a, p21cip1 and p27kip1 in pancreatic carcinoma. *Mol Med Rep*. 2012;5(4):1106-10.
62. Ohtsubo K, Watanabe H, Yamaguchi Y, Hu YX, Motoo Y, Okai T, et al. Abnormalities of tumor suppressor gene p16 in pancreatic carcinoma: immunohistochemical and genetic findings compared with clinicopathological parameters. *J Gastroenterol*. 2003;38(7):663-71.
63. Gerdes B, Ramaswamy A, Ziegler A, Lang SA, Kersting M, Baumann R, et al. p16INK4a is a prognostic marker in resected ductal pancreatic cancer: an analysis of p16INK4a, p53, MDM2, and Rb. *Annals of surgery*. 2002;235(1):51-9.
64. Attri J, Srinivasan R, Majumdar S, Radotra BD, Wig J. Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma. *BMC Gastroenterol*. 2005;5:22.
65. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet*. 1994;8(1):27-32.
66. Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJ, Kang M, Goggins M, et al. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res*. 1998;58(20):4740-4.
67. Schulz P, Scholz A, Rexin A, Hauff P, Schirner M, Wiedenmann B, et al. Inducible re-expression of p16 in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Br J Cancer*. 2008;99(1):110-7.
68. Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene*. 1997;15(2):203-11.
69. van Leeuwen IM, Higgins M, Campbell J, McCarthy AR, Sachweh MC, Navarro AM, et al. Modulation of p53 C-terminal acetylation by mdm2, p14ARF, and cytoplasmic SirT2. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(4):471-80.

70. Qiu W, Sahin F, Iacobuzio-Donahue CA, Garcia-Carracedo D, Wang WM, Kuo CY, et al. Disruption of p16 and activation of Kras in pancreas increase ductal adenocarcinoma formation and metastasis in vivo. *Oncotarget*. 2011;2(11):862-73.
71. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358(6381):15-6.
72. Koshland DE, Jr. Molecule of the year. *Science (New York, NY)*. 1993;262(5142):1953.
73. Bucher N, Britten CD. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br J Cancer*. 2008;98(3):523-8.
74. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer*. 2007;7(7):495-507.
75. Thanasoula M, Escandell JM, Suwaki N, Tarsounas M. ATM/ATR checkpoint activation downregulates CDC25C to prevent mitotic entry with uncapped telomeres. *EMBO J*. 2012;31(16):3398-410.
76. Ewen ME. p53-dependent repression of cdk4 synthesis in transforming growth factor-beta-induced G1 cell cycle arrest. *J Lab Clin Med*. 1996;128(4):355-60.
77. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(6):400-14.
78. Okamoto K, Taya Y, Nakagama H. Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase. *FEBS Lett*. 2009;583(17):2710-4.
79. Basu A, Haldar S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod*. 1998;4(12):1099-109.
80. Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M, et al. Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost*. 2005;93(4):676-81.
81. Gandhari M, Arens N, Majety M, Dorn-Beineke A, Hildenbrand R. Urokinase-type plasminogen activator induces proliferation in breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2006;28(6):1463-70.
82. Hildenbrand R, Gandhari M, Stroebel P, Marx A, Allgayer H, Arens N. The urokinase-system--role of cell proliferation and apoptosis. *Histol Histopathol*. 2008;23(2):227-36.
83. Aguirre Ghiso JA, Kovalski K, Ossowski L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J Cell Biol*. 1999;147(1):89-104.
84. Aguirre-Ghiso JA, Liu D, Mignatti A, Kovalski K, Ossowski L. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol Biol Cell*. 2001;12(4):863-79.
85. Tang H, Kerins DM, Hao Q, Inagami T, Vaughan DE. The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998;273(29):18268-72.
86. Ma Z, Webb DJ, Jo M, Gonias SL. Endogenously produced urokinase-type plasminogen activator is a major determinant of the basal level of activated ERK/MAP kinase and prevents apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 18):3387-96.
87. Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, et al. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost*. 1997;78(1):285-96.
88. Hildenbrand R, Dilger I, Horlin A, Stutte HJ. Urokinase and macrophages in tumour angiogenesis. *Br J Cancer*. 1995;72(4):818-23.
89. Krishnamoorthy B, Darnay B, Aggarwal B, Dinh DH, Kouraklis G, Olivero WC, et al. Glioma cells deficient in urokinase plasminogen activator receptor expression are

- susceptible to tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2001;7(12):4195-201.
90. Wick W, Wagner S, Kerkau S, Dichgans J, Tonn JC, Weller M. BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett.* 1998;440(3):419-24.
91. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977;74(12):5463-7.
92. Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nature reviews Genetics.* 2002;3(10):769-78.
93. Kacker C. Amplifikation von MYC bei strahleninduzierten Weichteilsarkomen. 2012.
94. Tomita T. Cyclin-dependent kinase (cdk6) and p16 in pancreatic endocrine neoplasms. *Pathology.* 2004;36(6):566-70.
95. Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;910:121-37; discussion 37-9.
96. Garcea G, Dennison AR, Pattenden CJ, Neal CP, Sutton CD, Berry DP. Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature. *JOP.* 2008;9(2):99-132.
97. Koppert LB, Lemmens VE, Coebergh JW, Steyerberg EW, Wijnhoven BP, Tilanus HW, et al. Impact of age and co-morbidity on surgical resection rate and survival in patients with oesophageal and gastric cancer. *Br J Surg.* 2012;99(12):1693-700.
98. Strasberg SM, Drebin JA, Soper NJ. Evolution and current status of the Whipple procedure: an update for gastroenterologists. *Gastroenterology.* 1997;113(3):983-94.
99. Gurusamy KS, Kumar S, Davidson BR, Fusai G. Resection versus other treatments for locally advanced pancreatic cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;2:CD010244.
100. Cameron JL, Riall TS, Coleman J, Belcher KA. One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies. *Annals of surgery.* 2006;244(1):10-5.
101. He C, Jiang H, Geng S, Sheng H, Shen X, Zhang X, et al. Expression and prognostic value of c-Myc and Fas (CD95/APO1) in patients with pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(2):742-50.
102. Konstantinidis IT, Deshpande V, Zheng H, Wargo JA, Fernandez-del Castillo C, Thayer SP, et al. Does the mechanism of lymph node invasion affect survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma? *J Gastrointest Surg.* 2010;14(2):261-7.
103. Baldwin S, Kukar M, Gabriel E, Attwood K, Wilkinson N, Hochwald SN, et al. Pancreatic cancer metastatic to a limited number of lymph nodes has no impact on outcome. *HPB (Oxford).* 2016;18(6):523-8.
104. Meyer W, Jurowich C, Reichel M, Steinhauser B, Wunsch PH, Gebhardt C. Pathomorphological and histological prognostic factors in curatively resected ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Surg Today.* 2000;30(7):582-7.
105. Chen JW, Bhandari M, Astill DS, Wilson TG, Kow L, Brooke-Smith M, et al. Predicting patient survival after pancreaticoduodenectomy for malignancy: histopathological criteria based on perineural infiltration and lymphovascular invasion. *HPB (Oxford).* 2010;12(2):101-8.
106. Hatzaras I, George N, Muscarella P, Melvin WS, Ellison EC, Bloomston M. Predictors of survival in periampullary cancers following pancreaticoduodenectomy. *Annals of surgical oncology.* 2010;17(4):991-7.
107. Kang MJ, Jang JY, Chang YR, Kwon W, Jung W, Kim SW. 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*. 2014;21(5):1545-51.
108. Allen PJ, Kuk D, Castillo CF, Basturk O, Wolfgang CL, Cameron JL, et al. Multi-institutional Validation Study of the American Joint Commission on Cancer (8th Edition) Changes for T and N Staging in Patients With Pancreatic Adenocarcinoma. *Annals of surgery*. 2017;265(1):185-91.
109. Li HJ, Chen YT, Yuan SQ. Proposal of a modified American Joint Committee on Cancer staging scheme for resectable pancreatic ductal adenocarcinoma with a lymph node ratio-based N classification: A retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(34):e12094.
110. Luttgies J, Schemm S, Vogel I, Hedderich J, Kremer B, Kloppel G. The grade of pancreatic ductal carcinoma is an independent prognostic factor and is superior to the immunohistochemical assessment of proliferation. *J Pathol*. 2000;191(2):154-61.
111. Andron A, Magnani C, Betta PG, Donna A, Mollo F, Scelsi M, et al. Malignant mesothelioma of the pleura: interobserver variability. *J Clin Pathol*. 1995;48(9):856-60.
112. Song JW, Lee JH. New morphological features for grading pancreatic ductal adenocarcinomas. *Biomed Res Int*. 2013;2013:175271.
113. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. 1997;57(9):1731-4.
114. Hustinx SR, Leoni LM, Yeo CJ, Brown PN, Goggins M, Kern SE, et al. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol*. 2005;18(7):959-63.
115. Kawesha A, Ghaneh P, Andren-Sandberg A, Ograed D, Skar R, Dawiskiba S, et al. K-ras oncogene subtype mutations are associated with survival but not expression of p53, p16(INK4A), p21(WAF-1), cyclin D1, erbB-2 and erbB-3 in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2000;89(6):469-74.
116. Biankin AV, Morey AL, Lee CS, Kench JG, Biankin SA, Hook HC, et al. DPC4/Smad4 expression and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2002;20(23):4531-42.
117. Smith RA, Tang J, Tudur-Smith C, Neoptolemos JP, Ghaneh P. Meta-analysis of immunohistochemical prognostic markers in resected pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2011;104(9):1440-51.
118. Schlitter AM, Segler A, Steiger K, Michalski CW, Jager C, Konukiewicz B, et al. Molecular, morphological and survival analysis of 177 resected pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs): Identification of prognostic subtypes. *Sci Rep*. 2017;7:41064.
119. Kriegl L, Neumann J, Vieth M, Greten FR, Reu S, Jung A, et al. Up and downregulation of p16(Ink4a) expression in BRAF-mutated polyps/adenomas indicates a senescence barrier in the serrated route to colon cancer. *Mod Pathol*. 2011;24(7):1015-22.
120. Bennecke M, Kriegl L, Bajbouj M, Retzlaff K, Robine S, Jung A, et al. Ink4a/Arf and oncogene-induced senescence prevent tumor progression during alternative colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2010;18(2):135-46.
121. Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng KH, Lopez LV, Hezel AF, et al. Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(15):5947-52.
122. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005;436(7051):642.

123. Perl S, Kushner JA, Buchholz BA, Meeker AK, Stein GM, Hsieh M, et al. Significant human beta-cell turnover is limited to the first three decades of life as determined by in vivo thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(10):E234-9.
124. Kohler CU, Olewinski M, Tannapfel A, Schmidt WE, Fritsch H, Meier JJ. Cell cycle control of beta-cell replication in the prenatal and postnatal human pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300(1):E221-30.
125. Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, et al. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature.* 2006;443(7110):453-7.
126. Guo N, Parry EM, Li LS, Kembou F, Lauder N, Hussain MA, et al. Short telomeres compromise beta-cell signaling and survival. *PLoS One.* 2011;6(3):e17858.
127. Ansari D, Rosendahl A, Elebro J, Andersson R. Systematic review of immunohistochemical biomarkers to identify prognostic subgroups of patients with pancreatic cancer. *Br J Surg.* 2011;98(8):1041-55.
128. Morton JP, Timpson P, Karim SA, Ridgway RA, Athineos D, Doyle B, et al. Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(1):246-51.
129. Hermanova M, Trna J, Nenutil R, Dite P, Kala Z. Expression of COX-2 is associated with accumulation of p53 in pancreatic cancer: analysis of COX-2 and p53 expression in premalignant and malignant ductal pancreatic lesions. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008;20(8):732-9.
130. Hermanova M, Lukas Z, Kroupova I, Kleibl Z, Novotny J, Nenutil R, et al. Relationship between K-ras mutation and the expression of p21WAF1/CIP1 and p53 in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasma.* 2003;50(5):319-25.
131. Jimenez RE, Warshaw AL, Z'Graggen K, Hartwig W, Taylor DZ, Compton CC, et al. Sequential accumulation of K-ras mutations and p53 overexpression in the progression of pancreatic mucinous cystic neoplasms to malignancy. *Annals of surgery.* 1999;230(4):501-9; discussion 9-11.
132. Chadwick B, Willmore-Payne C, Tripp S, Layfield LJ, Hirschowitz S, Holden J. Histologic, immunohistochemical, and molecular classification of 52 IPMNs of the pancreas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2009;17(1):31-9.
133. Beroud C, Soussi T. p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(1):200-4.
134. Scarpa A, Capelli P, Mukai K, Zamboni G, Oda T, Iacono C, et al. Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *Am J Pathol.* 1993;142(5):1534-43.
135. Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature.* 2015;518(7540):495-501.
136. Schleger C, Verbeke C, Hildenbrand R, Zentgraf H, Bleyl U. c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance. *Mod Pathol.* 2002;15(4):462-9.
137. La Rosa S, Bernasconi B, Vanoli A, Sciarra A, Notohara K, Albarello L, et al. c-MYC amplification and c-myc protein expression in pancreatic acinar cell carcinomas. New insights into the molecular signature of these rare cancers. *Virchows Arch.* 2018;473(4):435-41.

138. Nie Z, Hu G, Wei G, Cui K, Yamane A, Resch W, et al. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell*. 2012;151(1):68-79.
139. Hessmann E, Schneider G, Ellenrieder V, Siveke JT. MYC in pancreatic cancer: novel mechanistic insights and their translation into therapeutic strategies. *Oncogene*. 2016;35(13):1609-18.
140. Christoph F, Schmidt B, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA. Over-expression and amplification of the c-myc gene in human urothelial carcinoma. *Int J Cancer*. 1999;84(2):169-73.
141. Schleger C, Arens N, Zentgraf H, Bleyl U, Verbeke C. Identification of frequent chromosomal aberrations in ductal adenocarcinoma of the pancreas by comparative genomic hybridization (CGH). *J Pathol*. 2000;191(1):27-32.
142. Harvey SR, Hurd TC, Markus G, Martinick MI, Penetrante RM, Tan D, et al. Evaluation of urinary plasminogen activator, its receptor, matrix metalloproteinase-9, and von Willebrand factor in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(13):4935-43.
143. Cantero D, Friess H, Deflorin J, Zimmermann A, Brundler MA, Riesle E, et al. Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer*. 1997;75(3):388-95.
144. Hildenbrand R, Niedergethmann M, Marx A, Belharazem D, Allgayer H, Schleger C, et al. Amplification of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene in ductal pancreatic carcinomas identifies a clinically high-risk group. *Am J Pathol*. 2009;174(6):2246-53.
145. Andres SA, Edwards AB, Wittliff JL. Expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR), and inhibitor (PAI-1) in human breast carcinomas and their clinical relevance. *J Clin Lab Anal*. 2012;26(2):93-103.
146. Wang L, Zhang Y, Wang W, Zhu Y, Chen Y, Tian B. Gemcitabine treatment induces endoplasmic reticular (ER) stress and subsequently upregulates urokinase plasminogen activator (uPA) to block mitochondrial-dependent apoptosis in Panc-1 cancer stem-like cells (CSCs). *PLoS One*. 2017;12(8):e0184110.
147. Gorantla B, Asuthkar S, Rao JS, Patel J, Gondi CS. Suppression of the uPAR-uPA system retards angiogenesis, invasion, and in vivo tumor development in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2011;9(4):377-89.
148. Dergham ST, Dugan MC, Kucway R, Du W, Kamarauskiene DS, Vaitkevicius VK, et al. Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol*. 1997;21(2):127-43.
149. Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol*. 1993;143(2):545-54.
150. Motojima K, Urano T, Nagata Y, Shiku H, Tsunoda T, Kanematsu T. Mutations in the Kirsten-ras oncogene are common but lack correlation with prognosis and tumor stage in human pancreatic carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 1991;86(12):1784-8.
151. Mauro CD, Pesapane A, Formisano L, Rosa R, D'Amato V, Ciciola P, et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression enhances invasion and metastasis in RAS mutated tumors. *Sci Rep*. 2017;7(1):9388.

7 LEBENS LAUF

Personalien

Name: Haas
Vorname: Dominik Alexander
Geburtsdatum: 24.12.1984
Geburtsort: Ulm
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg

09/1995-06/2004 Hans und Sophie Scholl-Gymnasium Ulm
Abschluss: Abitur am 24.06.2004

10/2005-09/2007 Studium Gymnasiallehramt
Universität Ulm
Fächer: Biologie und Chemie
Abschluss des Grundstudiums am 30.09.2007

10/2007-09/2009 Studium Humanmedizin
Semmelweis Universität Budapest
Abschluss: M1 am 01.07.2009

10/2009-11/2013 Studium Humanmedizin
Universität Heidelberg Fakultät Mannheim
Abschluss: M2 am 10.10.2013
M3 am 05.11.2013

Berufliche Erfahrung

2004-2005 Freiwilliges Soziales Jahr im Rettungsdienst
Rotes Kreuz Ulm
Ausbildung zum Rettungshelfer

04/2014-04/2019 Weiterbildung zum Facharzt
Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
Universitätsklinikum Mannheim

ab 05/2019

Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde

Universitätsklinikum Wuppertal

Erlangung der Bezeichnung Facharzt für Hals-
Nasen-Ohren-Heilkunde am 07.08.2019

8 DANKSAGUNG

Danken möchte ich Herrn Prof. Marx für die Überlassung des Themas und die freundliche Supervision dieser Arbeit. Meinem Betreuer Herrn Prof. Ströbel danke ich für die stetige Unterstützung und den freundlichen Umgang während dieser Promotion. Auch ohne die Hilfe und Unterstützung, besonders bei der Tätigkeit im Labor, durch das Team der wissenschaftlichen Mitarbeiter des pathologischen Institutes in Mannheim wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Herrn Prof. Rößner von der chirurgischen Klinik der Universitätsklinik Mannheim danke ich für die Bereitstellung der Pankreasdatenbank. Der Abteilung für medizinische Statistik, Biomathematik und Informationsverarbeitung unter der Leitung von Frau Prof. Weiß danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten. Frau Obermüller, Frau Brechtel und Herrn Bader möchte ich für die Hilfe bei der Korrektur und der Überarbeitung dieser Arbeit danken.