Universität Ulm
Institut für Pathologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Peter Möller

# Expression und prognostische Bedeutung verschiedener Proteine im Pankreaskarzinom mit Hauptaugenmerk auf den neuen prognostischen Marker c-FLIP (zelluläres FLICE-inhibitory-Protein)

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

vorgelegt von
**Sandra Schmid**
aus München

Ulm 2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Marko Kornmann

Tag der Promotion: 23. Oktober 2014

Meiner Familie gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

**Inhaltsverzeichnis ..... i**
**Abkürzungsverzeichnis ..... iii**
**1 Einleitung ..... 1**
1.1 Epidemiologie, Therapie und Prognose des Pankreaskarzinoms ..... 1
1.2 Entstehung eines Pankreaskarzinoms – Tumorprogressionsmodell ..... 2
1.3 Das Pankreaskarzinom – Klassifikation und Stadieneinteilung ..... 4
1.4 Biomarker und Ihre Funktion ..... 6
1.4.1 COX-2 ..... 6
1.4.2 Bcl-2 ..... 8
1.4.3 c-FLIP ..... 9
1.4.4 Ki-67 ..... 11
1.5 Fragestellung ..... 11
**2 Material und Methoden ..... 13**
2.1 Material ..... 13
2.1.1 Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien ..... 13
2.1.2 Allgemeine Chemikalien ..... 14
2.1.3 Antikörper und Detektions-Kits ..... 15
2.1.4 Software ..... 16
2.1.5 Patientenmaterial ..... 17
2.2 Methoden ..... 17
2.2.1 Patienten- und Datenerfassung ..... 17
2.2.2 Beschaffung der Paraffinschnitte ..... 18
2.2.3 Prinzip der Immunhistochemie (IHC) ..... 19
2.2.4 Immunhistochemische Behandlung des Pankreasgewebes ..... 20
2.2.4.1 COX-2 ..... 20
2.2.4.2 Bcl-2 ..... 21
2.2.4.3 c-FLIP ..... 22
2.2.4.4 Ki-67 ..... 23
2.2.4.5 Bemerkungen ..... 23
2.2.5 Auswertung und Statistik ..... 24
2.2.5.1 Immunhistochemische Auswertungsmethodik ..... 24
2.2.5.2 Statistische Auswertung ..... 25
**3 Ergebnisse ..... 27**
3.1 Patientenkollektiv ..... 27

3.1.1 Nachbeobachtungszeit und Überlebenswahrscheinlichkeit ..... 27
3.1.2 Erkrankungsalter ..... 29
3.1.3 Geschlecht ..... 31
3.2 Pathologische und klinische Parameter ..... 32
3.2.1 Tumorlokalistation ..... 32
3.2.2 Tumorgröße ..... 34
3.2.3 TNM - Klassifikation ..... 35
3.2.3.1 T (Tumor) ..... 35
3.2.3.2 N (Nodes / Lymph nodes / Lymphknoten) ..... 35
3.2.3.3 M (Metastasen) ..... 37
3.2.4 UICC 2002 - Klassifikation ..... 38
3.2.5 R-Klassifikation (Residualtumor) ..... 39
3.2.6 Grading ..... 41
3.3 Immunhistochemie/Prognostische Biomarker ..... 42
3.3.1 COX-2 ..... 42
3.3.2 Bcl-2 ..... 44
3.3.3 c-FLIP ..... 46
3.3.4 Ki-67 und weitere Biomarker ..... 48
3.3.5 Multivariate Analyse ..... 50
3.4 Übersichtstabelle ..... 51
**4 Diskussion ..... 52**
4.1 Epidemiologie ..... 52
4.2 Tumor- Charakteristiken ..... 53
4.3 COX-2 ..... 54
4.4 Bcl-2 ..... 55
4.5 c-FLIP ..... 56
4.6 Weitere prognostische Marker ..... 58
**5 Zusammenfassung ..... 59**
**6 Literaturverzeichnis ..... 61**
**7 Eigene Publikation ..... 72**
**8 Danksagung ..... 73**
**9 Lebenslauf ..... 74**

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| Ab | Antibody |
| Abb. | Abbildung |
| Ag | Antigen |
| AK | Antikörper |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| Apaf-1 | Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1 |
| APC | Adenomatous polyposis coli Protein |
| APO-1 | Apoptosis Antigen 1 |
| Bak | Apoptose-regulator BAK (Bcl-2-like protein 7) |
| Bax | Apoptose-regulator BAX (Bcl-2-like protein 4) |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma-2 |
| Bcl-w | B-cell lymphoma-w |
| Bcl-xL | B-cell lymphoma-extra large |
| BRCA 2 | Breast Cancer 2 |
| bzw. | Beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| CA | Karzinom |
| CCCU | Comprehensive Cancer Center Ulm |
| CD95 | Cluster of differentiation 95 |
| c-FLIP | Zelluläres FLICE-inhibitory-Protein |
| c-$FLIP_L$ | c-FLIP long |
| c-$FLIP_S$ | c-FLIP short |
| CML | Chronische myeloische Leukämie |
| c-Myc | Zelluläres myelocytomatosis Onkogen |
| COX-1 | Cyclooxygenase-1 |
| COX-2 | Cyclooxygenase-2 |
| CREDOS | Cancer Retrieval Evaluation and Documentation System |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| DPC4 | Deleted in Pancreatic Carcinoma, Locus 4 |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| G | Tumorgrading |

| | |
|---|---|
| g | Gramm |
| G0-Phase | Gap0-Phase |
| G1-Phase | Gap1-Phase |
| G2-Phase | Gap2-Phase |
| HE | Hämatoxilin-Eosin |
| HER-2/neu | Human epidermal growth factor receptor 2 |
| ICD-10 | International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems |
| IHC | Immunhistochemie |
| IPMT | Intraduktaler papillär-muzinöser Tumor |
| IS-H*med | Industry Solution - Healthcare medical |
| Ki-67 | Protein Ki-67, Proliferationsmarker |
| K-ras | Kirsten rat sarcoma viral oncogene |
| L | Liter |
| m | Männlich |
| M | Fernmetastasen |
| MIB-1 | Mindbomb homolog 1 |
| mL | Milliliter |
| µL | Mikroliter |
| mM | Millimolar |
| mm | Millimeter |
| M-Phase | Mitose-Phase |
| n | Anzahl |
| N | Lymphknotenbefall |
| NSAIDs | Non-steroidal anti-inflammatory drugs |
| p-Wert | Signifikanzwert |
| p16 | Protein 16 |
| p53 | Protein 53 |
| PanIN | Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie |
| PAP Pen | Hydrophober Barrierestift |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| pH | pH-Wert |
| R | Residualtumor |

| | |
|---|---|
| Rb | Retinoblastom-Protein |
| SAP | Systeme, Anwendungen und Produkte in der Datenverarbeitung |
| SMAD4 | SMAD family member 4 |
| S-Phase | Synthese-Phase |
| Src | Sarcoma Tyrosinkinase |
| T | Ausdehnung des Primärtumors |
| Tab. | Tabelle |
| TGF-ß | Transforming growth factor beta |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TNM | Tumorstaging: Tumor, Nodes, Metastasen |
| TRAIL | Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand |
| UICC 2002 | Union Internationale Contre Le Cancer 2002 |
| USA | United States of America |
| VWR | VWR International gegründet von Van Waters und Rogers |
| w | Weiblich |
| XIAP | X-linked inhibitor of apoptosis |
| z.B. | Zum Beispiel |

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie, Therapie und Prognose des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom ist einer der aggressivsten soliden Tumoren des Menschen und steht in den westlichen Industrieländern für Frauen und für Männer an vierter Stelle in der Krebstodesursachenstatistik [40, 48, 50]. Mit einem Anteil von etwa drei Prozent aller Krebserkrankungen ist das Pankreaskarzinom in der Bundesrepublik Deutschland relativ selten [50]. Es ist aber nach dem Kolon- und Magenkarzinom der dritthäufigste Tumor des Verdauungstraktes [39]. Die Inzidenz des Tumors beträgt 10 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner jährlich und tritt bei Männern im Mittel um das 68. Lebensjahr und bei Frauen im Mittel um das 75. Lebensjahr auf [1].

Unter den malignen Pankreastumoren ist das duktale Adenokarzinom mit 95% der häufigste Vertreter. Die meisten Adenokarzinome, 75%, entstehen im Pankreaskopf, 20 % im Korpus und fünf Prozent im Pankreasschwanz [1, 39].

Als sichere Risikofaktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms gelten das Rauchen [9] und das Vorliegen einer chronischen Pankreatitis [59]. Es werden auch eine Adipositas und das Vorliegen eines Diabetes mellitus zu den prädispositionierenden Faktoren gezählt [8, 24, 58, 72]. Eine familiäre Häufung bzw. eine genetische Disposition für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms konnte auch nachgewiesen werden [22].

Die ungünstige Prognose für das duktale Adenokarzinom des Pankreas, mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 6% nach Diagnosestellung, ergibt sich aus dem schnellen Tumorwachstum, einer frühen Metastasierung, dem Fehlen von charakteristischen Frühsymptomen und den bisher noch nicht ausreichenden Diagnose- und Therapiemöglichkeiten [48]. Bei Diagnosestellung kommt nur noch in 10-20% der Fälle eine radikale Resektion des Pankreaskarzinoms in kurativer Absicht in Frage, da in den restlichen 80-90% der Primärtumor schon angrenzende Strukturen befallen hat und/oder Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen vorhanden sind [101]. Die Prognose für das duktale

Adenokarzinom des Pankreas hat sich in den letzten 20 Jahren, auch nach der Einführung von Gemcitabine als Chemotherapeutikum, alleine oder in Kombination mit einer Strahlentherapie, nur geringfügig verbessert [13].
Neueste Behandlungsmöglichkeiten auf molekulargenetischer Ebene könnten der Schlüssel zum Erfolg in der Behandlung des Pankreaskarzinoms sein. Bei anderen Tumorerkrankungen werden diese neuen „target therapies“ schon erfolgreich eingesetzt. Zum Bespiel werden in der Therapie des Kolon- und Brustdrüsenkarzinoms EGFR-Antikörper und zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) Thyrosin-Kinase-Inhibitoren eingesetzt [27, 41]. Für die Entwicklung solcher spezifischen Therapieansätze ist das Verständnis der zugrundeliegenden molekulargenetischen Veränderungen bei der Entstehung einer Krebserkrankung essentiell.

## 1.2 Entstehung eines Pankreaskarzinoms – Tumorprogressionsmodell

Die Entwicklung einer Krebserkrankung basiert auf der Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen, die die Regulierung des Zell-Zyklus, des programmierten Zelltodes, der Zelldifferenzierung und letztlich des Zellwachstums aus dem Gleichgewicht bringen und den Krebszellen einen Wachstumsvorteil verschaffen [25]. Es werden zwei Kategorien von Genen unterschieden, die für die Veränderung im Wachstumsverhalten der Tumorzellen verantwortlich sind, Onkogene und Tumorsuppressorgene. Innerhalb der Onkogene, welche durch eine Mutation konstitutiv aktiviert werden können, gibt es einerseits Onkogene mit immortalisierender Wirkung, die Schutz vor Apoptose und Seneszenz verursachen (z.B. bcl2) und andererseits Onkogene mit transformierender Wirkung, die der Zelle ein von Wachstumsfaktoren unabhängiges Wachstum ermöglichen und so die Proliferation der Zelle fördern (z.B. ras, src) [18, 96]. Deaktivierende Mutationen (Punktmutationen und Deletionen) in den Genen von Tumorsuppressoren, wie p53, SMAD4, Retinoblastom-Protein (Rb) und APC (Adenomatous polyposis coli protein) führen auch zu einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen. Es müssen in der Regel

beide Allele des Tumorsuppressorgens betroffen sein, um einen Funktionsverlust hervorzurufen [54]. In Abhängigkeit des Tumortyps müssen im zeitlichen Verlauf der Tumorentwicklung mindestens vier bis sieben Veränderungen im Genom stattfinden [95].

In der Entstehung einer epithelialen Pankreasneoplasie treten nach neusten Erkenntnissen ebenso verschiedene Mutationen auf, die im Laufe der Zeit zur Entwicklung eines invasiven Karzinoms führen. Mit einem Tumorprogressions-modell werden diese genetischen Veränderungen, in Zusammenhang mit den histologischen Veränderungen, in eine zeitliche Abfolge gebracht [42, 95]. Für das postulierte Tumorprogressionsmodell spricht, dass Mutationen, die früh in der Entstehung des Karzinoms auftreten, wie z.B. eine Punktmutation im Proto-Onkogen K-ras in pankreatischen intraepithelialen Neoplasien Grad 1 (PanIN 1), auch in annähernd allen untersuchten invasiven Pankreaskarzinomen nachweisbar sind [3].

Im Übergang zwischen hyperplastischen flachen PanIN-1A-Läsionen, bzw. hyperplastischen papillären PanIN-1B-Läsionen zu dysplastischen PanIN-2-Läsionen, wie in Abbildung 1 ersichtlich, können Mutationen im p16-Gen gefunden werden. Dieses stellt ein Zellzyklus-Kontrollgen dar, welches in nahezu 100% aller Pankreaskarzinome inaktiviert ist [83]. Im Laufe der weiteren Progression in ein invasives Karzinom entstehen Mutationen im p-53- und im SMAD4/DPC4-Gen, die schon in PanIN-3-Läsionen (hochgradige duktale Dysplasien bzw. Carcinoma in situ) nachweisbar sind. Mutationen in diesen beiden Transkriptionsfaktoren findet man häufig in Pankreaskarzinomen, wobei p53 in der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose eine wichtige Rolle spielt und in 76% der Karzinome biallelisch inaktiviert ist und SMAD4 eine wichtige Rolle im TGFß-Signalweg bzw. der TGFß-induzierten Wachstumshemmung spielt und in 50% der Pankreaskarzinome inaktiviert ist [32, 74, 76]. In der Pathogenese des Pankreaskarzinoms gibt es noch weitere Onkogene, wie K-ras, die von Bedeutung sind. Diese sind in erster Linie der Transkriptionsfaktor c-Myc, der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) HER-2/neu und der Zellzyklusregulator Cyclin D1 [7, 81].

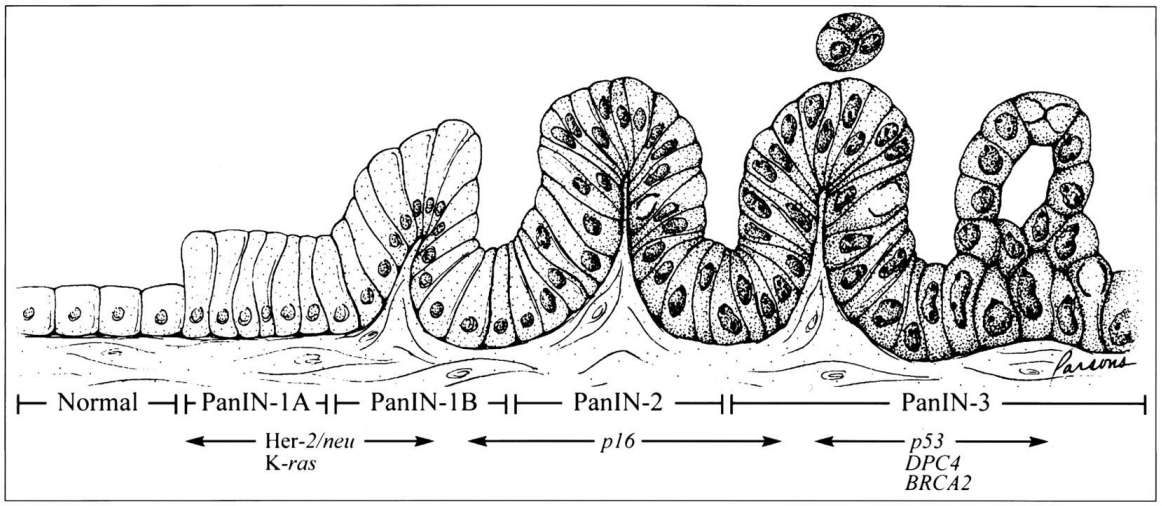


**Abbildung 1: Pankreastumorprogressionsmodell: Entwicklung von normalem pankreatischen Gangepithel in ein invasives Karzinom über mehrere histologisch definierte Vorstufen (PanINs) und bekannten genetischen Veränderungen, die den jeweiligen Stadien der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms zugeordnet sind [42]**

## 1.3 Das Pankreaskarzinom – Klassifikation und Stadieneinteilung

Die Klassifikation des Pankreaskarzinoms bezieht sich auf die Größe und die Ausdehnung des Primärtumors (T), die Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und das Vorliegen von Fernmetastasen (M) (siehe Tabelle 1). Durch diese eindeutige Klassifikation des Pankreaskarzinoms können Kliniken untereinander bzw. verschiedene Forschungszentren Diagnosen und Behandlungsverfahren besprechen, austauschen und validieren.

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation (T=Ausdehnung des Primärtumors, N=Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, M=Vorliegen von Fernmetastasen)**

| **T-Klassifikation** | |
|---|---|
| TX | Primärtumor nicht beurteilbar |
| T0 | Kein Anhalt für Primärtumor |
| Tis | Carcinoma in situ |
| T1 | Tumor begrenzt auf Pankreas, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung |
| T2 | Tumor begrenzt auf Pankreas, mehr als 2 cm in größter Ausdehnung |
| T3 | Tumor breitet sich jenseits des Pankreas aus, jedoch ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der A.mesenterica superior |
| T4 | Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder A.mesenterica superior |

| **N-Klassifikation** | |
|---|---|
| NX | Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar |
| N0 | Keine regionären Lymphknotenmetastasen |
| N1 | Regionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden |
| **M-Klassifikation** | |
| MX | Fernmetastasen nicht beurteilbar |
| M0 | Keine Fernmetastasen |
| M1 | Fernmetastasen vorhanden |

In den Industrieländern der westlichen Welt erfolgt dann anhand des TNM-Klassifikationssystems der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) die Einstufung der Tumorerkrankung in entsprechende Stadien. Dies ist für die Festlegung der Therapie von entscheidender Bedeutung (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: UICC 2002 - Stadieneinteilung**

| **Stadium UICC 2002** | **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 |

Von entscheidender Bedeutung ist es weiterhin, ob der Tumor durch die Operation vollständig entfernt wurde. Der Operationserfolg wird wie folgt beschrieben (Tab. 3).

**Tabelle 3: Resttumor nach Operation**

| **Residualtumor (R)** | |
|---|---|
| RX | Residualtumor kann nicht bestimmt werden |
| R0 | Kein Residualtumor |
| R1 | Mikroskopisch nachgewiesener Residualtumor |
| R2 | Sichtbarer Residualtumor |

Der Differenzierungsgrad, Grading, beschreibt inwiefern sich das Tumorgewebe von normalem exokrinem Pankreasgewebe unterscheidet (Tab. 4).

**Tabelle 4: Einteilung der Differenzierungsgrade des Pankreaskarzinoms**

| **Grading (G)** | |
|---|---|
| GX | keine Beurteilung des Differenzierungsgrades |
| G1 | gut differenziert |
| G2 | mäßig differenziert |
| G3 | schlecht differenziert |
| G4 | undifferenziert (anaplastisch) |

## 1.4 Biomarker und Ihre Funktion

Die Begutachtung verschiedener zellulärer Stoffwechselfaktoren ist für das Verständnis einer Krebserkrankung und die Entwicklung neuer Diagnostik- und Therapieverfahren essentiell.

### 1.4.1 COX-2

Die Cyclooxygenasen (COX), auch Prostaglandin-Endoperoxid-H-Synthasen genannt, sind die Schlüsselenzyme für die Biosynthese der Prostaglandine [87]. Es handelt sich bei diesen Enzymen um Dioxygenasen, die im ersten Reaktionsschritt einen Ringschluss zwischen den Kohlenstoffatomen $C_8$ und $C_{12}$ bilden und zwei Sauerstoffatome an $C_9$ und $C_{11}$ eingefügen. Dadurch entsteht das Zwischenprodukt Prostaglandin-$G_2$. Im zweiten Reaktionsschritt wird durch die Peroxidaseaktivität dieser Enzyme das Prostaglandin-$H_2$ gebildet [77].

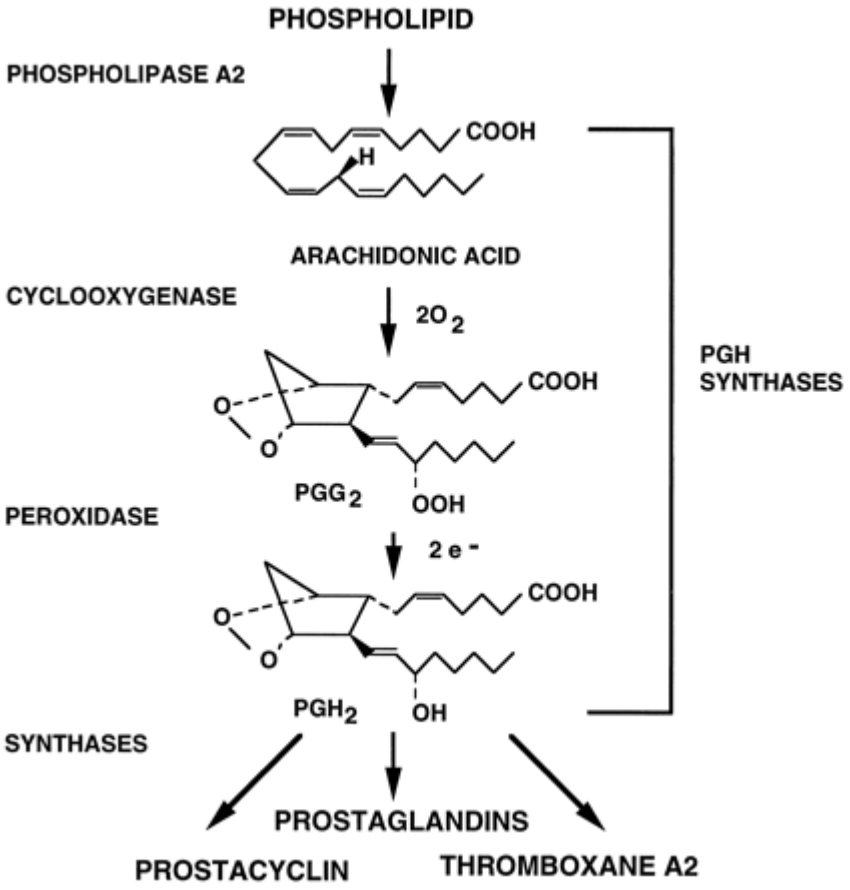


**Abbildung 2: Prostaglandin-$H_2$ ($PGH_2$)-Biosynthese durch Cyclooxygenasen [87]**

Es gibt zwei Isoformen unter den Cyclooxygenasen. Diese Proteine enthalten zwar beide Häm, sind glykosiliert und besitzen zwei katalytischen Zentren, ihre Expression und ihre Funktion variieren jedoch erheblich [88]. Die Cyclooxygenase-1 (COX-1), das „konstitutive“ Enzym, kann in fast allen Geweben detektiert werden und wird typischerweise in allen Phasen des Zellzyklus konstant exprimiert [20]. Die Cyclooxygenase-2 (COX-2), teils auch „induzierbare“ Isoform genannt, wird jedoch in einigen wenigen Geweben auch konstitutiv exprimiert, z.B. im Hoden, im Gehirn, im Epithel der Trachea und in der Macula densa der Niere [33, 98, 99]. Obwohl die beiden Isoformen der Cyclooxygenasen strukturell ähnlich aufgebaut sind, werden sie durch unterschiedliche Gene auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert. Die COX-2 Expression kann durch verschiedene Signalkaskaden induziert werden, in die die Proteinkinasen A und C, Tyrosinkinasen (z.B. src) und bakterielles Endotoxin (Lipopolysaccharide)

involviert sein können [88]. Die wichtigste Funktion des Enzyms COX-2 ist die Prostaglandin-Produktion während einer Entzündung.

Diese beiden Enzyme sind pharmakologisch von großer Bedeutung, da sie die Angriffspunkte der nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) sind. So entsteht zum Beispiel die Thrombozytenaggregations-inhibierende Wirkung von Aspirin durch dessen Wirkung an COX-1 und die somit entstandene Hemmung der Thromboxan-A2-Synthese [73]. Die Wirkung der NSAIDs an COX-2 ist die Reduktion bzw. die Hemmung von Entzündungsprozessen, Fieber, Schmerzen und nach neuen Studien auch das Risiko der Entstehung eines Kolonkarzinoms [14, 84, 92]. Es hat sich gezeigt, dass COX-2 nicht nur im Kolonkarzinom eine Rolle spielt, sondern dass dessen verstärkte Expression auch ein Marker für eine schlechtere Prognose im nicht kleinzelligen Lungenkarzinom [53], im Brustkrebs [19] und im Adenokarzinom des Ösophagus [11] ist. Auch im Pankreaskarzinom wurde dieses Enzym schon untersucht und festgestellt, dass ein COX-2-Polymorphismus eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und der Karzinomprognose spielen könnte [91]. Es wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die verstärkte Expression von COX-2 auch in Pankreaskarzinomen mit einer schlechteren Prognose einhergeht [49, 64]. Es konnte aber kein eindeutiger Zusammenhang mit der Wirkung von Aspirin und anderen NSAIDs und der Entstehung eines Pankreaskarzinoms gefunden werden [57].

### 1.4.2 Bcl-2

Das Bcl-2-Protein (B-cell lymphoma 2-Genprodukt) gehört zu einer der wichtigsten Apoptose-regulierenden Proteinfamilien [60]. Man unterteilt diese Proteinfamilie in Zelltod-Antagonisten (z.B. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w) und Zelltod-Agonisten (z.B. Bax, Bak) [16]. Bcl-2 ist ein integrales Membranprotein, welches in der äußeren mitochondrialen Membran, in der Kernmembran und in der Membran des endoplasmatischen Retikulums von gesunden Zellen lokalisiert ist und deren Integrität schützt [47]. Es kann die Auslösung der Apoptose als Antwort auf eine große Zahl von Todessignalen wie DNA-Schäden, γ-Strahlen, Glucocorticoide oder Chemotherapeutika verhindern, indem es die proapoptotische Wirkung

seines Gegenspielers Bax antagonisiert [102]. Es ist klinische Evidenz vorhanden, die eine positive Korrelation zwischen der Bcl-2-Expression und dem Überleben nach einer Pankreaskarzinomresektion unterstützt [62, 69, 70], wobei jedoch manche Studien darauf hinweisen, dass es auch keine Korrelation [12, 28, 71] bzw. einen negativen Zusammenhang zwischen der Bcl-2-Expression und dem Überleben geben kann [44, 90].

### 1.4.3 c-FLIP

Ein Charakteristikum von pankreatischen Krebszellen ist die Evasion der Apoptose (programmierter Zelltod). Dies trägt zur Chemo- und Stahlenresistenz des Pankreaskarzinoms bei [6, 29]. Der programmierte Zelltod spielt eine sehr wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und in der Vermittlung der Zytotoxizität der Therapeutika (Chemo- und Stahlentherapie) [30].
Es gibt zwei wesentliche Wege, die zur Apoptose führen. Extrinsisch durch die Aktivierung von Todesrezeptoren oder intrinsisch durch die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien, jeweils resultierend in der Aktivierung von Effektorcaspasen [35]. Die Effektorcaspasen führen einerseits selbst zum apoptotischen Tod der Zelle, andererseits aktivieren sie sekundäre Zielproteine, die dann Zellstrukturen abbauen. Extrinsisch wird durch die Bindung von Liganden, wie Tumornekrosefaktor (TNF) und anderen Zytokinen, an Rezeptoren der TNF-Rezeptorsuperfamilie wie CD95 (APO-1/Fas) oder den TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-Rezeptoren wie TRAIL-R1 und TRAIL-R2 die Caspase-8 aktiviert, welche dann die Effektorcaspasen aktivieren kann [4]. Der intrinsische Signalweg beginnt mit der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, welches dann mit dATP an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) bindet und dessen Bindung an die Procaspase 9 ermöglicht. Daraus resultiert der Cytochrom c/Apaf-1/Caspase-9-enthaltende Komplex, genannt Apoptosom [55, 79]. Die durch die Formation des Komplexes aktivierte Caspase 9 aktiviert nun analog zur Caspase 8 die Effektorcaspasen.

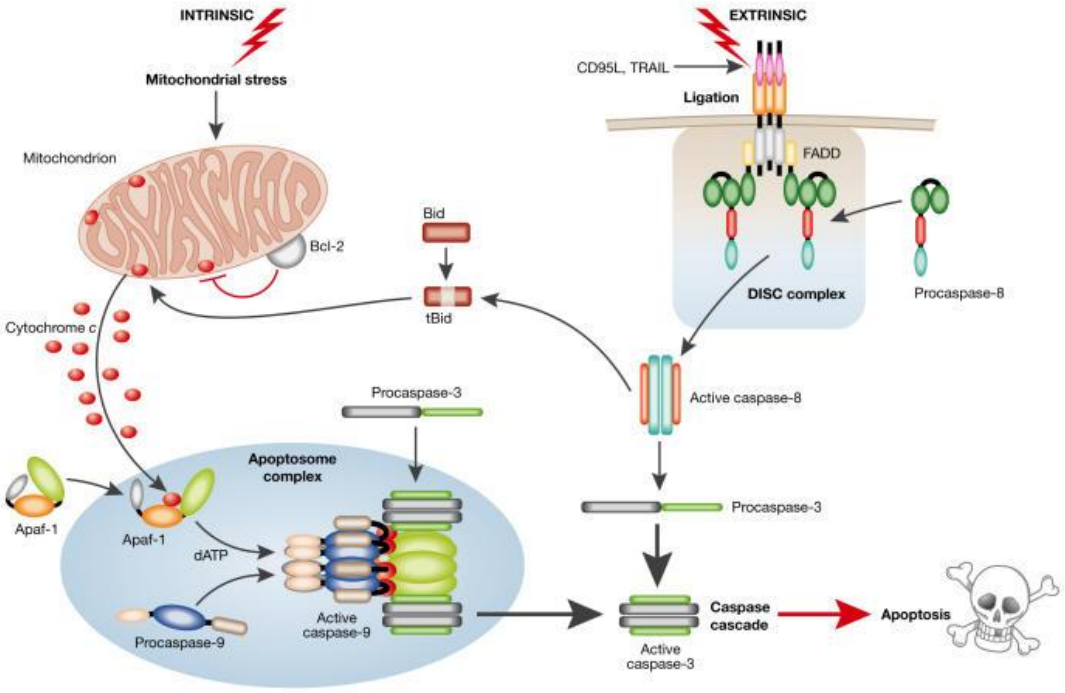


**Abbildung 3: Apoptose: Der extrinsische (CD95- und TRAIL-Rezeptoraktivierung) und intrinsische (mitochondriale Freisetzung von pro-apoptotischen Proteinen) Weg zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade [61].**

Spezifische Therapieansätze, die auf den TRAIL-Signalweg abzielen, werden als erfolgsversprechende Optionen angesehen, Apoptose in humanen Tumoren auszulösen [5, 45]. Monoklonale Antikörper gegen die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 wurden schon in klinischen Phase-I-Studien an verschiedenen bösartigen Tumoren, auch am Pankreaskarzinom, ausgetestet [5, 45]. Da pankreatische Karzinomzelllinien eine relativ geringe Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose zeigen, wurden auch Downstream-Modulatoren der TRAIL-Signalkaskade begutachtet [46, 94, 97]. Ein solches Molekül ist das zelluläre FLICE-inhibitory-Protein (c-FLIP), welches die Aktivierung der Caspase 8 verhindern kann [51, 80]. Es gibt zwei, durch alternierendes Splicing entstandene, Isoformen von c-FLIP, die lange (c-$FLIP_L$) und die kurze (c-$FLIP_S$) Isoform [51]. Bekannt ist, dass c-$FLIP_S$ die Rekrutierung der Caspase 8 an die Todesdomänen der TRAIL-Rezeptoren inhibiert und somit die Apoptose hemmt [56]. Die Rolle von c-$FLIP_L$ ist noch nicht ganz klar, da beschrieben wurde, dass es die Apoptose,

eventuell abhängig von dem Grad der Expression, sowohl hemmen als auch induzieren kann [15, 56, 67]. Um die genaue Funktion und die Rolle der beiden c-FLIP Isoformen in der Genese und Evolution von humanen Karzinomen und deren Nutzen für spezifische molekulare Therapieansätze aufzuklären, wird daran zurzeit intensiv geforscht.

### 1.4.4 Ki-67

Das Ki-67-Protein wird während allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phasen) exprimiert. In ruhenden Zellen (G0-Phase) tritt es jedoch nicht auf. Während der Interphase (G1-, S-, G2-Phasen) kann man das Antigen ausschließlich innerhalb des Zellkerns nachweisen und bei der Mitose wird ein Großteil des Proteins auf die Oberfläche der Chromosomen transportiert. Das Protein wird rasch abgebaut, wenn die Zelle in die nicht-proliferative Phase eintritt. Da das Ki-67-Antigen nur in proliferierenden und nicht in ruhenden Zellen exprimiert wird, ist es ein guter Proliferationsmarker. Damit ermöglicht der gegen Ki-67-Antigen verwendete Antikörper MIB-1 das Monitoring der proliferativen Fraktion der normalen und neoplastischen Zellen [82].

## 1.5 Fragestellung

Da das Pankreaskarzinom einer der aggressivsten soliden Tumoren des Menschen ist und es noch keinen erfolgreichen therapeutischen Ansatz gibt, war das Ziel dieser Studie einen biologischen Marker als Angriffspunkt für neue Therapien zu entdecken. Es war geplant, ein Molekül in Pankreaskarzinomzellen zu finden, dessen Expressionsniveau signifikant mit der Überlebenszeit der Patienten korreliert.

Unser Kollektiv an Patienten mit einem duktalen Adenokarzinom des Pankreas wurde speziell für diese Studie zusammengestellt. Um die Aussagekraft bzgl. eines neuen Markers zu erhöhen, wurde zuerst ein schon bekannter, und auch therapeutisch genutzter, prognostischer Marker, COX-2, in unserem Kollektiv

untersucht. Nach Bestätigung des Kollektivs, konnte dann die Suche nach einem neuen prognostisch aussagekräftigen Protein begonnen werden.

Da Mutationen und Expressionsveränderungen von apoptotischen Proteinen in Karzinomen häufig vorkommen und eine Kooperation mit Frau Prof. Dr. S. Fulda, Institut für Experimentelle Tumorforschung des Universitätsklinikums Frankfurt, bestand, die das noch relativ unbekannte Apoptose-regulierende Protein c-FLIP in Pankreaskarzinom-Zelllinien untersucht hat, wurde dieses Protein auch in unserem Kollektiv begutachtet und die Ergebnisse im Hinblick auf die prognostische Relevanz beim Pankreaskarzinom ausgewertet.

Es wurde zusätzlich noch ein weiteres Apoptose-regulierendes Protein, Bcl-2, und dessen Expression bzw. prognostische Relevanz in unserem Kollektiv untersucht. Da es mehrere widersprüchliche Ergebnisse zur Bedeutsamkeit der Bcl-2-Expression im Pankreaskarzinom gibt, war es unsere Absicht, diese Situation mit unserem Kollektiv zu klären.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien

- Kühlschrank
    - Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
- Mikrotom
    - Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
- Wärmeschrank
    - Memmert, Schwabach, Deutschland
- Objektträger
    - Menzel-Gläser Superfrost® plus, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
- Deckgläser (24mm × 50mm)
    - VWR, Darmstadt, Deutschland
- Küvetten
    - Glas-Küvetten und Behälter für Objektträger, VWR, Darmstadt, Deutschland
- Mikrowelle
    - Bosch, Stuttgart, Deutschland
- Steamer Multi Gourmet
    - Braun, Kronberg, Deutschland
- Schnellkochtopf Sicomatic-L
    - Silit, Riedlingen, Deutschland
- Trockentücher
    - Kimtech Science, Surrey, United Kingdom
- Handschuhe
    - Hartmann, Peha-Soft® nitrile, Heidenheim, Deutschland

- Barrierestift, hydrophob
    - Mini PAP Pen, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
- Feuchtkammer
    - Diaboxen, Universität Ulm, Ulm, Deutschland
- Pipetten
    - Mikropipetten (10µl, 50µl, 100µl, 1000µl), Gilson, Middleton, USA
    - Mikropipette (0,5 - 10µl), Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)
    - VWR, Darmstadt, Deutschland
- Röhrchen zur Herstellung von Antikörper-Verdünnungen
    - Dako, Hamburg, Deutschland
- Vortexer Reax 2000
    - Heidolph, Kelheim, Deutschland
- Mikroskop Axiophot
    - Zeiss, Jena, Deutschland
- Digitale Fotokamera KY-F75U
    - JVC, Tokyo, Japan
- DISKUS 4.50 (Computerprogramm zur mikroskopischen Diskussion)
    - Carl H. Hilgers, Königswinter, Deutschland

### 2.1.2 Allgemeine Chemikalien

- Destilliertes Wasser (aqua dest.)
    - Institut für Pathologie an der Universität Ulm, Ulm, Deutschland
- Xylol
    - Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol (70%, 90%, 100%)
    - Merck, Darmstadt, Deutschland
- Citratpuffer (pH 6, 10mM)
    - Selbstherstellung 5L-Ansatz: 9,6g Zitronensäure in 5L aqua dest. auflösen

- Zitronensäure
    - Roth, Karlsruhe, Deutschland
- PBS (phosphate buffered saline) (pH 7,3-7,4)
    - Selbstherstellung 15L-Ansatz: 13,8g $Na_2HPO_4$ + 3,0g KCl + 3,0g $KH_2PO_4$ + 120,0g NaCl und mit aqua dest. auf 15L auffüllen
- Chemikalien für PBS-Herstellung ($Na_2HPO_4$, KCl, $KH_2PO_4$, NaCl)
    - Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Hämalaun
    - Selbstherstellung 2L-Ansatz: 2g Hämatoxylin in 1800mL aqua dest. lösen + 0,4g Natriumjodat + 100g Kaliumaluminiumsulfat + 80g Chloralhydrat + 2g Citronensäure und alles auf 2000mL mit aqua dest. auffüllen
- Hämatoxylin
    - Dako, Glostrup, Dänemark
- Natriumjodat
    - Sigma, St. Louis, USA
- Kaliumaluminiumsulfat
    - Sigma, St. Louis, USA
- Chloralhydrat
    - Merck, Darmstadt, Deutschland
- Microscopy Aquatex®
    - Merck, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.3 Antikörper und Detektions-Kits

- Primärantikörper
    - COX-2, monoklonaler Antikörper aus Maus gegen COX-2-Human (160112) , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
    - c-FLIP (I-FLICE), polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen c-FLIP-Human (AP06808PU-N), Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland

  - Bcl-2, monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Bcl-2-Human (IR614), Dako, Glostrup, Dänemark
  - MIB-1, monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Ki-67-Human (M7240), Dako, Glostrup, Dänemark
- Sekundärantikörper
  - Dako REAL™ biotinylierter Antikörper aus Ziege gegen Maus/Kaninchen, Dako, Glostrup, Dänemark
- Detektions - Kit
  - Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP), Dako, Glostrup, Dänemark
  - Dako REAL™ Chromogen Red 1, 2, 3, Dako, Glostrup, Dänemark
  - Dako REAL™ AP Substrat Puffer, Dako, Glostrup, Dänemark
  - Dako REAL™ Levamisole, Dako, Glostrup, Dänemark
- Antikörper-Verdünnungsmedium
  - Zytomed Systems Antibody Diluent, Berlin, Deutschland

### 2.1.4 Software

- Datenbank
  - Archiv des Instituts für Pathologie an der Universität Ulm, Ulm, Deutschland
  - Klinisches Krebsregister Credos, Comprehensive Cancer Center Ulm (CCCU), Ulm, Deutschland
  - SAP IS-H*med, Siemens Medical Solutions GSD GmbH, Berlin, Deutschland
- Statistische Auswertung
  - Microsoft® Office Excel 2010, Microsoft Corporation, USA
  - XLSTAT-Medical für Microsoft® Excel, Digital River GmbH, Köln, Deutschland
  - EndNote X5, Thomson Reuters, New York, USA

### 2.1.5 Patientenmaterial

Das Paraffingewebe von 122 Patienten für die immunhistochemischen Versuche entstammt der Sammlung des Instituts für Pathologie an der Universität Ulm. Für die Verwendung des Gewebematerials im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen wurde die Einwilligung der Patienten vor der Pankreasresektion durch die behandelnden Chirurgen des Universitätsklinikums Ulm eingeholt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Patienten- und Datenerfassung

Speziell dieses, dieser Arbeit zugrundeliegende Patientenkollektiv wurde mit Hilfe des Berichte-Archivs der Pathologie der Universität Ulm zusammengestellt. Es wurden 122 Fälle von resektierten, duktalen Adenokarzinomen des Pankreas im Zeitraum von 1996 bis 2009 identifiziert. Gesucht wurden die Patienten in der Datenbank der Pathologie mit Stichwörtern wie „Adenokarzinom“ und „Pankreaskarzinom“ in Verbindung mit den Begriffen „duktal“, „Pankreaskopf“ und „drüsig“. Ausschlusskriterien für das Kollektiv waren andere Tumorarten wie intraduktale papillär-muzinöse Tumoren (IPMT), muzinös-zystische Tumoren, seröse Zystadenome, Azinuszellkarzinome, Tumoren der Papilla Vateri und endokrine Pankreastumore. Externe Fälle, die durch die Pathologie der Universität Ulm nur diagnostiziert und nicht am Uniklinikum Ulm behandelt wurden, wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Aus den Berichten wurden die pathologischen Daten zu den jeweiligen Patienten entnommen und in eine dafür konstruierte, vielfältige Excel-Tabelle eingefügt. Die Daten umfassten die pathologische Diagnose des Tumors, das T-Stadium (die Ausbreitung des Primärtumors), das N-Stadium (Lymphknotenbefall), das M-Stadium (Fernmetastasen), R-Stadium (Residualtumor), das Tumorgrading und das Vorhandensein von PanIN-Lesionen.

Die pathologischen Daten wurden dann durch eine Reihe von klinischen Diagnose-, Therapie- und Verlaufsdaten aus dem Credos System des Comprehensive Cancer Center Ulm (CCCU) ergänzt. Damit gemeint sind neben den Daten zur Person, das Diagnosedatum mit klinischer Diagnose und ICD10-Klassifikation, Angaben zu Metastasen, der Lifestatus und das Datum der letzten Information, die Todesursache und verschiedene Angaben zur chirurgischen und chemotherapeutischen Therapie. Fehlende Daten bezüglich der Pankreaskarzinompatienten wurden durch Recherche im IS-H*med für SAP der Uniklinik Ulm ergänzt.

Die Tumornachsorge erfolgte durch die Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie und die Onkologische Tagesklinik der Universität Ulm und/oder durch weiterbehandelnde Ärzte. Das CCCU hat sowohl die gesamten klinischen als auch die pathologischen Daten aus Arztbriefen gesammelt, in die Credos Datenbank eingegeben und aktualisiert fortlaufend den Status der Patienten.

Für diese Studie wurden die Patientennamen nach Durchführung aller Berechnungen verblindet. Für die Darstellung in dieser Arbeit und für die Publikation der Ergebnisse wurden die Daten kondensiert und sind in der publizierten Form nicht mehr zu einem personenbezogenen Datensatz zurückverfolgbar.

### 2.2.2 Beschaffung der Paraffinschnitte

Aus dem Gewebearchiv der Pathologie der Universität Ulm wurde von den Patienten jeweils ein representatives, in Paraffin eingebettetes Stück Tumorgewebe beschafft. Für einige Patienten konnte im Archiv kein paraffiniertes Tumorgewebe mehr gefunden werden, da es entweder durch Routinebefundung oder durch frühere Forschung schon aufgebraucht worden war.

Die Paraffinblöcke mit Tumorgewebe wurden von Mitarbeiterinnen der Routineabteilung der Pathologie am Mikrotom in Schnitte von einer Schichtdicke von 2 µm geschnitten, im Wasserbad geglättet und dann auf spezielle Objektträger für Immunhistochemie aufgebracht. Die Objektträger wurden dann mindestens drei Stunden in einem 56°C warmen Brutschrank zum Trocknen und zur besseren Haftung aufbewahrt. Danach konnte mit der immunhistochemischen Behandlung begonnen werden.

### 2.2.3 Prinzip der Immunhistochemie (IHC)

Die immunhistochemische Methode beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper Reaktion. Hierbei bindet ein Antikörper (AK) spezifisch an ein Epitop eines Proteins. Diese Verbindung kann dann farblich sichtbar gemacht werden [43].
Es gibt eine „direkte“ und eine „indirekte Methode“ der IHC. Bei der „direkten Methode“ ist der Antikörper direkt mit einem Enzym oder fluoreszierendem Farbstoff markiert, wodurch die Antigen-AK-Bindung sichtbar gemacht wird. Bei der „indirekten Methode“ der IHC wird die Antigen-AK-Bindung in zwei oder drei Schritten sichtbar gemacht. In dieser Arbeit wurde die indirekte „Labelled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode“ angewandt (siehe Abb. 4).
Zuerst wird ein Primärantikörper aus Maus oder Kaninchen auf das zu untersuchende Gewebe aufgetragen, der spezifisch an das spezielle Protein bindet, welches untersucht wird.
Im zweiten Schritt wird ein mit Biotin markierter (biotinylierter) Sekundärantikörper gegen Maus und/oder Kaninchen auf das Präparat gegeben, welcher dann an den gebundenen Primärantikörper bindet.
Als nächstes wird eine 3. Lösung mit einem an das Streptavidin konjugiertes Enzym (alkalische Phosphatase) appliziert. Das Streptavidin hat eine hohe Bindungsaffinität zu Biotin und bindet somit an den Antigen-PrimärAK-SekundärAK-Komplex.
Sichtbar gemacht wird die Antigen-AK-Bindung durch die Applikation von Chromogen Red, welches als Substrat für die alkalische Phosphatase fungiert,

sodass es zu einem farbigen (pinken) Endprodukt kommt. Dieses ist dann unter dem Mikroskop sichtbar.

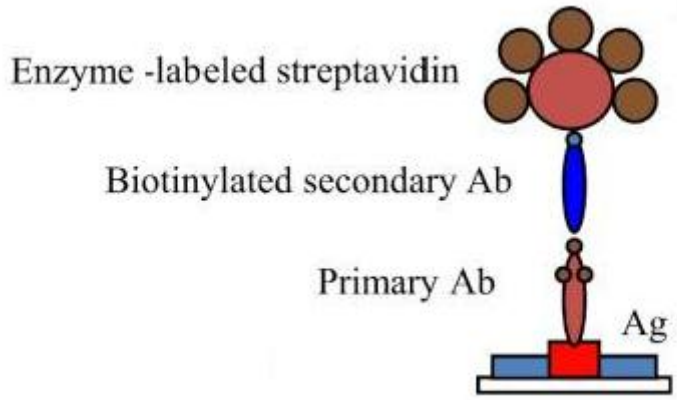


**Abbildung 4: Immunhistochemie mittels „indirekter Methode“ mit Streptavidin-Biotin-Alkalische Phosphatase/ Red (roter Farbstoff) - Nachweissystem modifiziert nach Hasui et al. [34]**

### 2.2.4 Immunhistochemische Behandlung des Pankreasgewebes

#### 2.2.4.1 COX-2

Der erste Schritt in der Behandlung der Schnitte war die Entparaffinierung. Man muss das Gewebe vom Paraffin befreien und wieder in wässriges Milieu überführen, bevor man durch eine Hitzebehandlung die Antigene demaskieren kann.

Die Schnitte wurden zuerst drei mal fünf Minuten in ein Xylol-Wasserbad (aufsteigende Xylol-Reihe) getaucht, anschließend einmal mit absolutem Alkohol gespült und dann jeweils fünf Minuten mit einer absteigenden Alkohol-Reihe (100%, 90%, 70% Ethanol) behandelt. Gespült wurden die Schnitte dann in destilliertem Wasser.

Für die hitzeinduzierte Antigendemaskierung wurden die Schnitte in den vorgeheizten Citratpuffer (pH 6, 10mM) gestellt und in einem Steamer bei 95-100°C 30 Minuten lang inkubiert. Die Hitzebehandlung sorgt dafür, dass die Antigene wieder vom Antikörper erkannt werden können, da die Proteinvernetzung, die durch die Formalinfixierung entstanden ist, durch das Kochen der Schnitte wieder aufgehoben wird. Zum Abkühlen werden die Schnitte

in ihren Küvetten für 10 Minuten in Eiswasser gestellt und danach mit destilliertem Wasser gespült.

Nach einer Spülung mit PBS-Puffer und einer Umfahrung des Gewebes mit einem hydrophoben Barrierestift (Mini PAP Pen) wurde pro Schnitt 100µl Primärantikörper gegen COX-2 aufgetragen und dieser für 30 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die optimale Verdünnung für den Antikörper gegen COX-2 auf Pankreasgewebe wurde durch vorherige Versuchsreihen mit verschieden Konzentration ermittelt und betrug 1:200. Verdünnt wurde der Antikörper mit Zytomed Systems Antibody Diluent.

Die Schnitte wurden erneut mit PBS-Puffer gespült und dann wurde der Sekundärantikörper (biotinylierter Ziege-anti-Maus/anti-Kaninchen Ak) aufgetragen. Dieser wurde auch für 30 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Spülung mit PBS-Puffer wurde das an das Enzym alkalische Phosphatase konjugierte Streptavidin aufgebracht und wiederum für 30 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Ein letztes Mal wurde mit PBS-Puffer gespült und dann die enzymatische Farbnachweisreaktion mit Chromogen Red durchgeführt.

Hierzu wurde anhand einer Dako-Mischtabelle, abhängig vom benötigten Volumen, entsprechende Mengen von Dako REAL™ AP Substrat-Puffer und Dako REAL™ Chromogen Red 1, 2, 3 gemischt und ein Tropfen Dako REAL™ Levamisole dazugegeben um die endogene alkalische Phosphatase zu blockieren. Es wurden jeweils 100µl von dieser Substratlösung aufgetragen und dann für 16 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit einer Spülung im Leitungswasser gestoppt.

Die Schnitte wurden dann zur besseren Übersicht mit Hämalaun-Lösung für drei Minuten gegengefärbt und 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Mit Hilfe von Aquatex® wurden die Schnitte dann mit Deckgläsern versehen.

#### 2.2.4.2 Bcl-2

Begonnen wurde dieser Färbeprozess mit der Entparaffinierung wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben. Danach wurden die Schnitte in der Mikrowelle hitzebehandelt

zur Antigendemaskierung. Für diese Behandlung wurden die Schnitte in Citratpuffer (pH 6, 10mM) überführt und für insgesamt 20 Minuten, in Etappen von jeweils 3, 4, 4, 4 und 5 Minuten, in der Mikrowelle gekocht. Nach jeder Etappe wurde der verdampfte Puffer in der Küvette mit destilliertem Wasser aufgefüllt, damit die Schnitte nicht austrockneten. Die Schnitte wurden dann unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten abgekühlt.
Nach der Spülung mit PBS-Puffer und der Behandlung mit dem hydrophoben Barrierestift wurden jeweils 100µl von dem Primärantikörper gegen Bcl-2 in einer Verdünnung von 1:500 aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Die Verdünnung war für Routinefärbungen der Pathologie Ulm schon früher bestimmt worden.
Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurde nach der Spülung mit PBS-Puffer der biotinylierte Ziege-anti-Maus/anti-Kaninchen Sekundärantikörper aufgetragen und in einer Feuchtkammer inkubiert. Dem folgte die Inkubation mit Streptavidin für 30 Minuten und die enzymatische Nachweisreaktion mit Chromogen Red. Auch diese Schnitte wurden zur besseren Übersicht für 3 Minuten mit Hämalaun gegengefärbt und dann mit Hilfe von Aquatex® eingedeckt.

#### 2.2.4.3 c-FLIP

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte mit einer aufsteigenden Xylol-Reihe und einer absteigenden Alkohol-Reihe wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben. Um das c-FLIP-Antigen zu demaskieren, wurde die Hitzebehandlung mittels Mikrowelle durchgeführt. Die Schnitte wurden wieder für 20 Minuten in Citratpuffer (pH 6, 10mM), wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben, gekocht und unter fließendem Leitungswasser abgekühlt.
Nachdem die Schnitte mit PBS-Puffer gespült wurden, schloss sich die Umrandung der Gewebes mit dem hydrophoben Barrierestift an. Im nächsten Schritt wurde jeweils 100µl Primärantikörper gegen c-FLIP aufgetragen und dieser für 30 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die optimale Antikörperverdünnung mit Zytomed Systems Antibody Diluent wurde hier durch vorherige Versuchsreihen mit verschieden Konzentrationen ermittelt und betrug 1:100.

Nach anschließender Spülung mit PBS-Puffer wurde wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben der biotinylierte Ziege-anti-Maus/anti-Kaninchen Sekundärantikörper aufgetragen und inkubiert, gefolgt von der Inkubation mit dem, an die alkalische Phosphatase konjugierten Streptavidin, und der Farbnachweisreaktion mit Chromogen Red. Analog zur Färbung in Abschnitt 2.2.4.1 wurden die Schnitte auch diesmal mit Hämalaun gegengefärbt und mit Hilfe von Aquatex® mit Deckgläsern versehen.

#### 2.2.4.4 Ki-67

Nach der Entparaffinierung, wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben, wurde das Ki-67-Antigen in den Schnitten mittels einer Behandlung im Schnellkochtopf demaskiert. Die Schnitte wurden hierfür in den schon vorgeheizten Citratpuffer (pH 6, 10mM) gestellt, bei 150°C für 20 Minuten inkubiert und danach 20 Minuten bei offenem Deckel abgekühlt.
Es wurden jeweils 100µl von dem Primärantikörper MIB-1 gegen das Ki-67-Antigen in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen, nachdem die Schnitte mit PBS-Puffer gespült und mit dem hydrophoben Barrierestift behandelt worden waren. Diese Verdünnung war für Routinefärbungen der Pathologie Ulm schon früher bestimmt worden.
Die weitere Behandlung mit dem Sekundärantikörper, Streptavidin, Chromogen Red und Hämalaun wurde, nach einer Spülung mit PBS-Puffer, wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte dann mit Hilfe von Aquatex® mit Deckgläsern versehen.

#### 2.2.4.5 Bemerkungen

Negativkontrolle:
Bei allen immunhistochemischen Färbungen wurde immer ein Schnitt mit Tonsillengewebe als Negativkontrolle mitbehandelt. Diese Negativkontrolle erfolgte ohne Applikation des Primärantikörpers, aber mit Inkubation aller nachfolgenden Reagenzien. So konnte man sicher sein, wenn das

Tonsillengewebe farblos blieb, dass die Färbung, wenn sie auf den zu untersuchenden Schnitten vorhanden war, spezifisch für das Antigen war.

Positivkontrolle:
Als Positivkontrolle, dass die Färbung wie erwünscht funktioniert hat und zur Absicherung, dass ein negativ erscheinendes Karzinom auch als wirklich negativ zu bewerten ist, diente bei der COX-2-Färbung die auf jedem Schnitt vorhandene intrinsische Anfärbung der endokrinen Langerhans-Inseln. Bei der c-FLIP-Färbung waren die endokrinen Langerhans-Inseln und die Entzündungszellen die intrinsische Positivkontrolle in jedem Schnitt. Die Positivkontrolle bei der Bcl-2-Färbung waren die in jedem Schnitt vorhandenen und angefärbten B-Lymphozyten während bei der Ki-67-Färbung ein Schnitt mit menschlichen Brustkrebszellen als Positivkontrolle mitgefärbt wurde.

### 2.2.5 Auswertung und Statistik

#### 2.2.5.1 Immunhistochemische Auswertungsmethodik

Die mikroskopische Auswertung der Schnitte erfolgte für alle Färbungen gemeinsam mit Prof. Dr. Möller (Chefarzt und Ärztlicher Direktor der Pathologie der Universität Ulm) am Diskussions-Mikroskop.

Für die COX-2-Färbung und die c-FLIP-Färbung wurde die Intensität der Anfärbung der Pankreaskarzinomzellen in vier Kategorien eingeteilt. Als Referenz diente die in allen Schnitten gleichbleibend zweifach positive (++) Farbintensität der Langerhans-Inseln (COX-2-Färbung) und die gleichbleibend dreifach positive (+++) Farbintensität der Langerhans-Inseln (c-FLIP-Färbung).

**Tabelle 5: Einteilung der Intensität der COX-2-Färbung und der c-FLIP-Färbung in den Pankreaskarzinomzellen**

| Intensität der Anfärbung | Grad der Expression von COX-2 und c-Flip |
|---|---|
| - | negativ |
| + | schwach positiv |
| ++ | mäßig positiv |
| +++ | stark positiv |

Die Expression von dem Bcl-2-Protein wurde in PanIN-Läsionen und in den Tumorzellen begutachtet. Hier gab es nur zwei Kategorien.

**Tabelle 6: Einteilung der Intensität der Bcl-2-Färbung in den Pankreasgewebeproben**

| Intensität der Anfärbung | Grad der Expression von Bcl-2 |
|---|---|
| - | negativ |
| + | positiv |

Die Farbintensität der Ki-67-Färbung wurde in zwei Kategorien eingeteilt; 10% oder weniger angefärbte Zellkerne und mehr als 10% angefärbte Zellkerne der Pankreaskarzinomzellen.

Alle Fotographien der verschiedenen Färbungen wurden mit einer JVC-Digitalkamera (Typ: KY-F75U) und der DISKUS 4.50 - Software zur mikroskopischen Diskussion, Bild-Aufnahme und -Dokumentation angefertigt.

### 2.2.5.2 Statistische Auswertung

Zur Kollektivbeschreibung und Veranschaulichung der Daten wurden mittels des Programms, XLSTAT-Medical für Microsoft® Excel, Histogramme und ein Box & Whiskers Plot erstellt.

Da es Ziel dieser Arbeit war, einen signifikanten Unterschied in den Überlebenszeiten der Patienten in Abhängigkeit von der Expression eines

bestimmten Biomarkers zu finden, wurde überwiegend mit der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse gearbeitet.

Die Überlebenszeit der Patienten für die Kaplan-Meier-Analyse wurde als Zeitspanne zwischen der Pankreasresektion und dem Todesdatum bzw. dem Datum der letzten Information (dem letzten Follow-Up) definiert. Alle Patienten, die zum Zeitpunkt der Analyse noch am Leben waren, wurden zensiert.

Unterscheiden kann man hierbei zwischen dem Gesamtüberleben und dem krankheitsspezifischen Überleben. Das Gesamtüberleben beschreibt das Überleben aller Patienten im Kollektiv unabhängig von der Todesursache. Beim krankheitsspezifischen Überleben wird dagegen das Versterben all der Patienten, deren Tod nicht in direkten Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom gebracht werden kann, zensiert und nicht als statistisches Ereignis im Sinne von Todeseintritt gewertet.

Unterschiede zwischen Überlebenszeiten, in Abhängigkeit von der Ausprägung eines Merkmals (z.B. COX-2 positiv / COX-2 negativ), wurden mittels des Logrank-Tests verglichen. Alle Faktoren, die sich in der univariaten Analyse als signifikant herausstellten, wurden in einer multivariaten Analyse mittels eines proportionalen Ausfallmodells (Cox-Regression) analysiert um die prognostische Relevanz der verschiedenen Einflussfaktoren auf das Überleben der Patienten zu vergleichen und das Hazard Ratio und dessen 95%-Konfidenzintervall zu ermitteln. Die statistische Signifikanz wurde definiert als $p\text{-Wert} < 0{,}05$.

Alle Überlebenszeitanalysen wurden mit dem Programm XLSTAT-Medical für Microsoft® Excel angefertigt.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Patientenkollektiv

Für diese Studie wurden wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben 122 Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas identifiziert und deren epidemiologische und demographische Parameter ausgewertet.

### 3.1.1 Nachbeobachtungszeit und Überlebenswahrscheinlichkeit

Die Nachbeobachtungszeit nach Diagnosestellung erstreckte sich von 0,16 Monaten bzw. 0,01 Jahren bis zu 118,57 Monaten bzw. 9,88 Jahren.

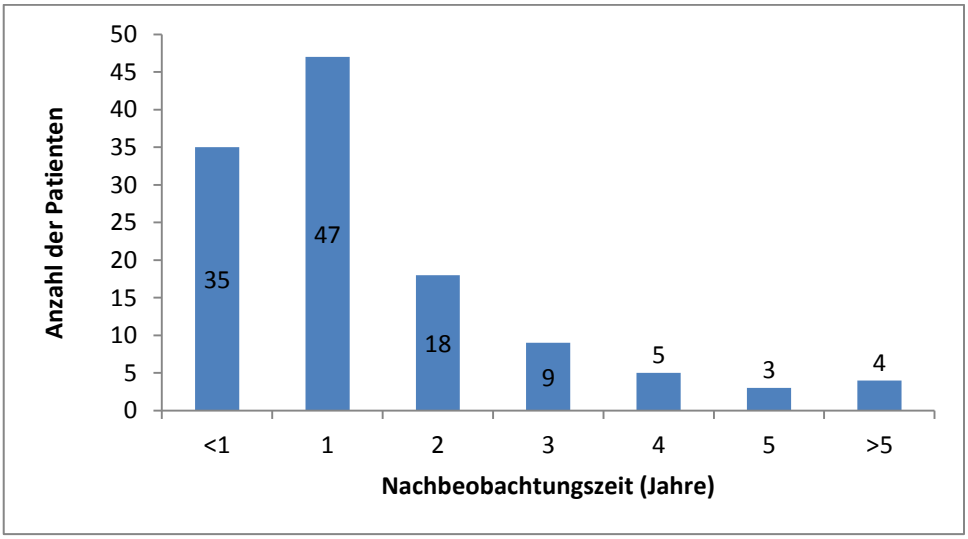


**Abbildung 5: Histogramm der Nachbeobachtungszeit der Patienten mit Pankreaskarzinom, dargestellt mit absoluten Werten der Patientenanzahl (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009)**

Die 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf das Gesamtüberleben im Kollektiv betrug 71,2%, die 2-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 37,5% und die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit 11,0% (Abb. 6).

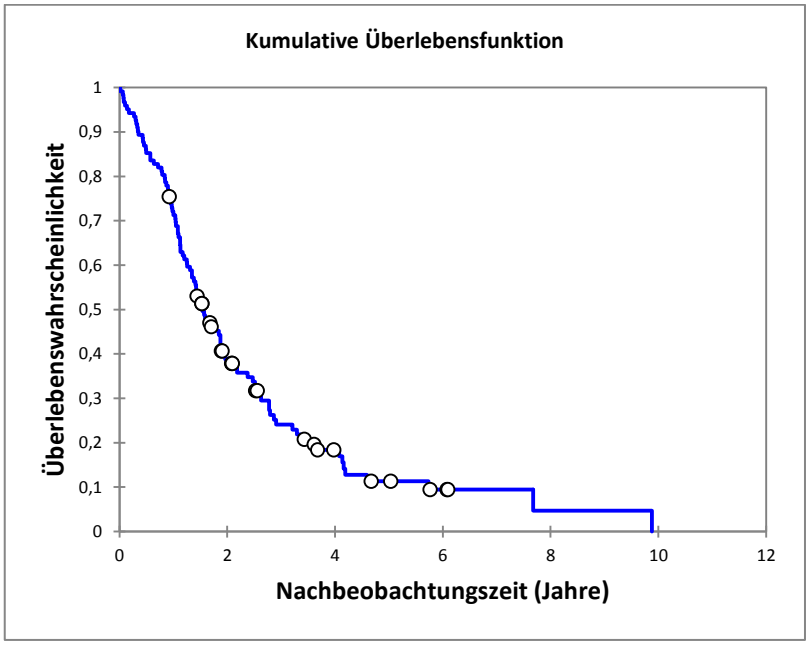


**Abbildung 6: Die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit im Kollektiv (Patienten mit Pankreaskarzinom, Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) als Kaplan-Meier-Kurve, zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

Betrachtet man nur die Pankreaskarzinom-bedingten Todesfälle (n=61), so betrug die 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 86,6%, die 2-Jahres-Überlebens-wahrscheinlichkeit 52,4% und die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit 25,2% (Abb. 7).

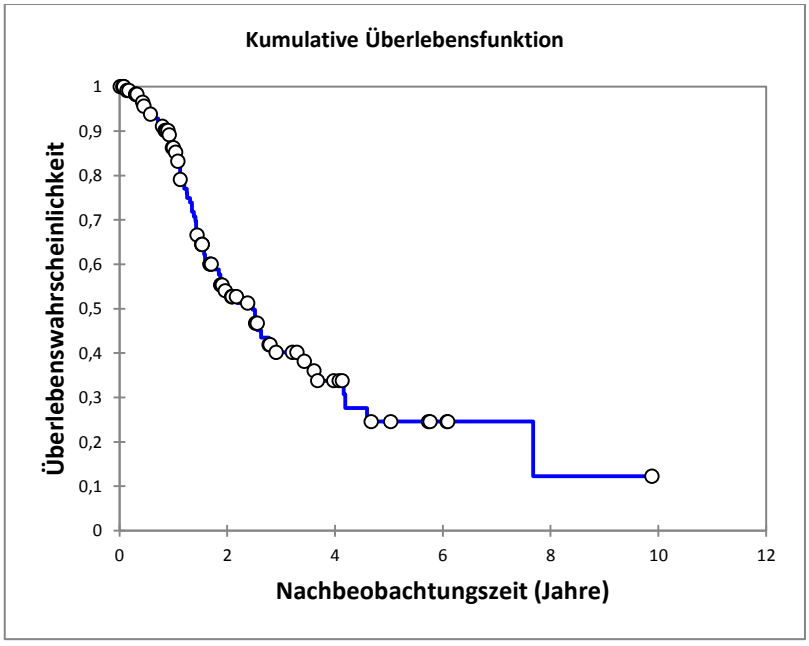


**Abbildung 7: Die Wahrscheinlichkeit des krankheitsspezifischen Überlebens im Kollektiv (Patienten mit Pankreaskarzinom, Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) als Kaplan-Meier-Kurve, zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

Alle in dieser Arbeit untersuchten Einflussfaktoren auf das Überleben der Patienten wurden in Bezug auf das Gesamtüberleben im Kollektiv analysiert.

### 3.1.2 Erkrankungsalter

Im Hinblick auf das Erkrankungsalter der Patienten in dieser Studie ergab sich ein durchschnittliches Alter bei Diagnosestellung von 65,40 Jahren. Der Median betrug 66,84 Jahre und die dazugehörige Standardabweichung der Stichprobe 9,78 Jahre. Der jüngste Patient war bei Diagnosestellung 40,32 Jahre alt und der Älteste 82,52 Jahre. Diese Verteilung ist im Folgenden graphisch als Histogramm (Abb. 8 und 9) und als Box & Whiskers-Plot (Abb. 10) dargestellt.

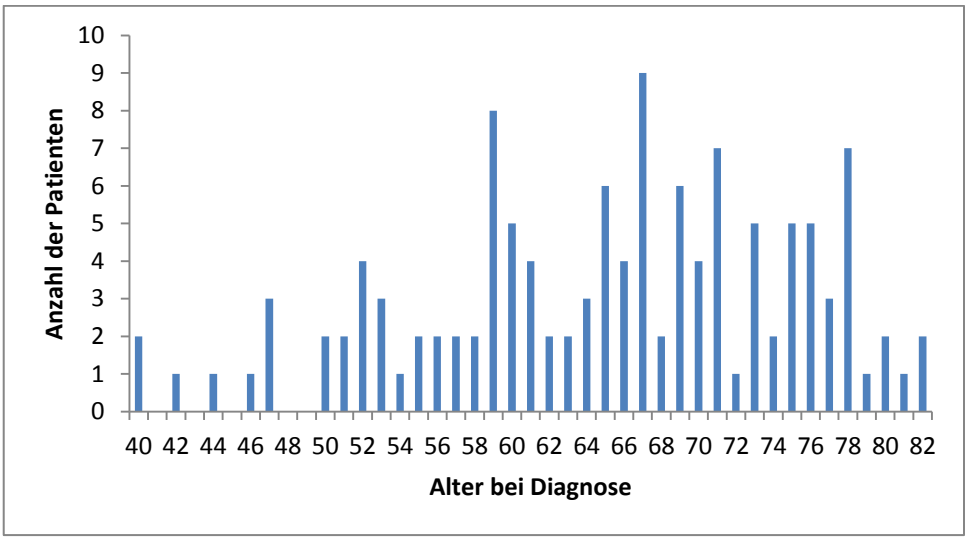


**Abbildung 8: Histogramm der Altersverteilung der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009), dargestellt mit absoluten Werten der Patientenanzahl**

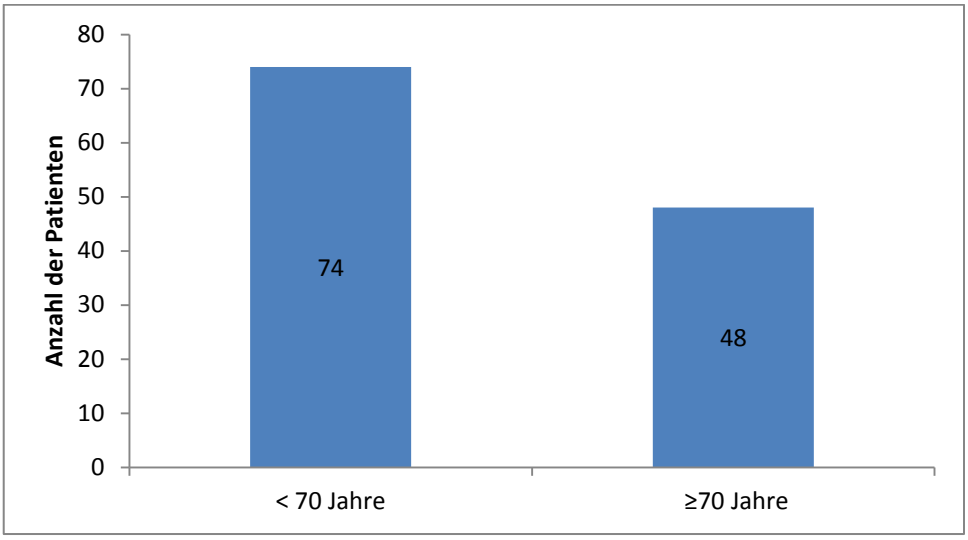


**Abbildung 9: Aufteilung der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) in zwei Altersgruppen (<70 Jahre und ≥70 Jahre) dargestellt als Histogramm mit absoluten Patientenzahlen**

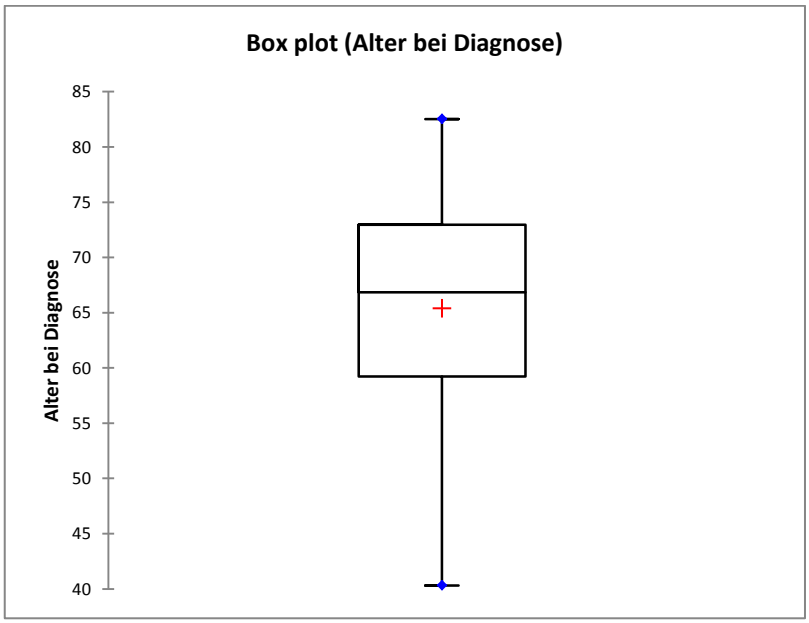


**Abbildung 10: Verteilung des Erkrankungsalters der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) in Jahren dargestellt als Box & Whiskers-Plot**

Mit einer Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier konnte gezeigt werden, dass die Patienten, die mit 70 Jahren oder älter die Diagnose duktales Pankreaskarzinom erhalten haben, eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit hatten im Vergleich zu den jüngeren Patienten (p-Wert: 0,076) (siehe Abb. 11). Die mediane Überlebensdauer für Patienten 70 Jahre oder älter war 16,36 Monate im Vergleich zu Patienten jünger als 70 Jahre, die 21,87 Monate überlebten.

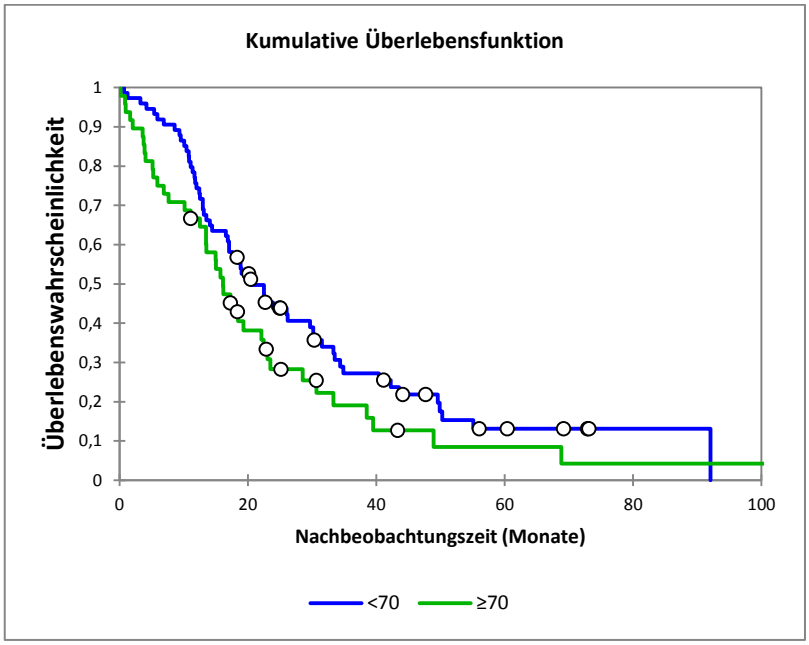


**Abbildung 11: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) abhängig vom Alter bei Diagnosestellung (<70 = jünger als 70 Jahre, ≥70 = 70 Jahre und älter), zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

### 3.1.3 Geschlecht

Die Geschlechterverteilung des Kollektivs ist in folgendem Histogramm dargestellt (Abb.12). Die männlichen Patienten überwiegen mit 58% im Vergleich zu den weiblichen Patienten mit 42%.

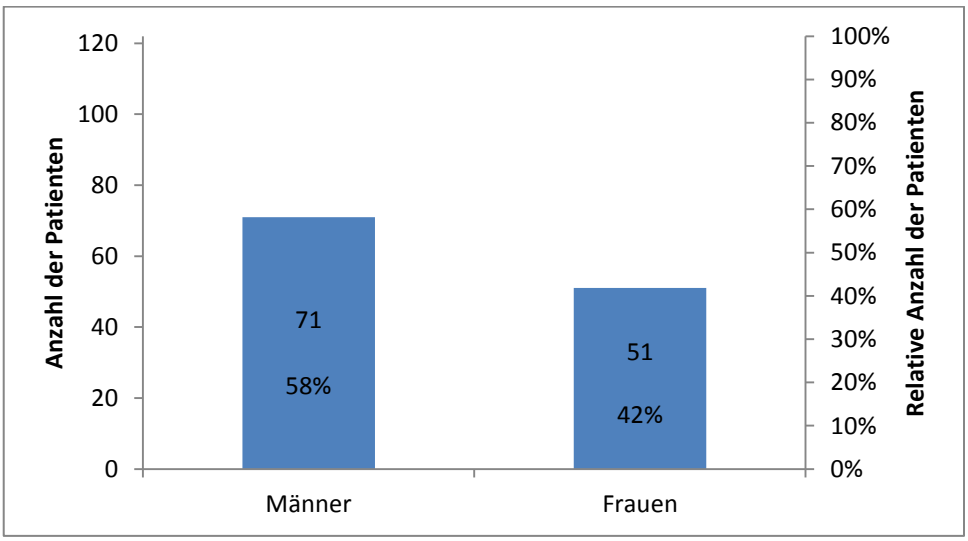


**Abbildung 12: Geschlechterverteilung der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) dargestellt als Histogramm mit absoluten Patientenzahlen (links) und in Prozentzahlen (rechts)**

Die Analyse der Überlebenszeit nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von dem Geschlecht der Patienten ergab keinen signifikanten Unterschied (p-Wert: 0,600) (siehe Abb. 13). Die mediane Überlebensdauer für Männer im Vergleich zu Frauen war 18,16 Monate bzw. 18,91 Monate.

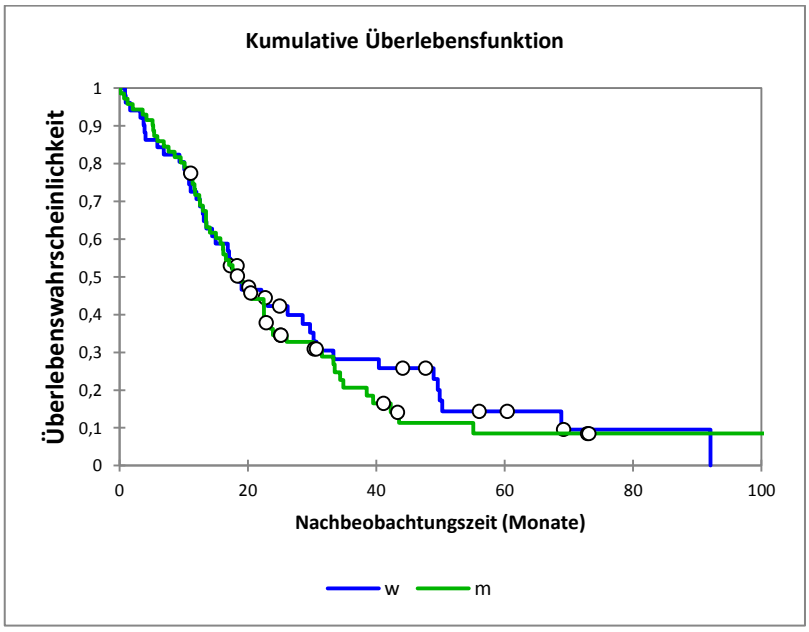


**Abbildung 13: Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) in Abhängigkeit des Geschlechtes (w = weiblich, m = männlich), zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

## 3.2 Pathologische und klinische Parameter

Die pathologischen und klinischen Parameter bzw. Daten der 122 duktalen, pankreatischen Adenokarzinome wurden gesammelt, statistisch ausgewertet und in Bezug auf das Überleben der Patienten analysiert.

### 3.2.1 Tumorlokalistation

Anhand Abbildung 14 kann man erkennen, dass sich ein Großteil der 122 Karzinome im Pankreaskopf befanden (87%).

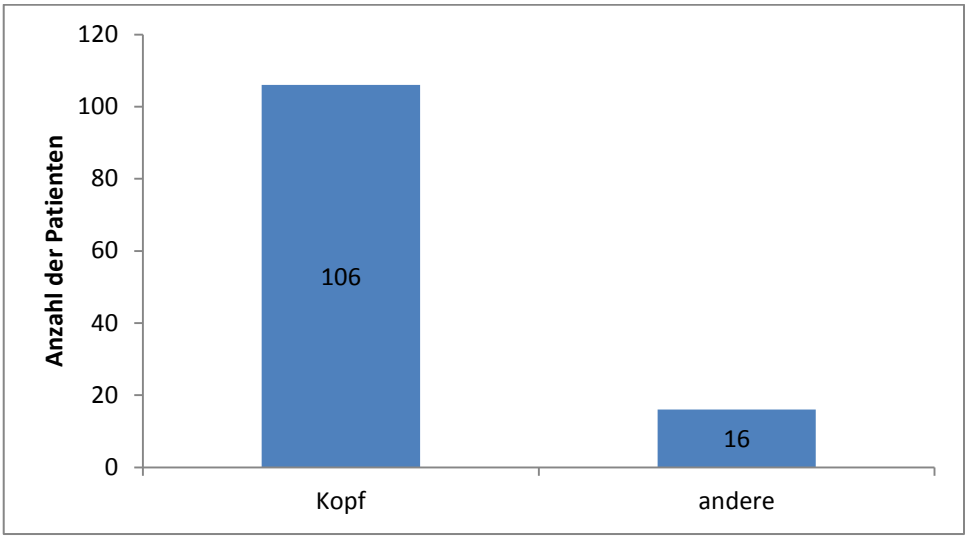


**Abbildung 14: Lokalisationsverteilung der Tumore der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) dargestellt als Histogramm mit absoluten Anzahlen (andere: Pankreaskorpus und/oder -schwanz)**

Die Lokalisation der Tumore innerhalb des Pankreas wurde im Hinblick auf das Überleben der Patienten mittels einer Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse untersucht. In der Analyse konnte kein wesentlicher Unterschied im Überleben abhängig von der Tumorlokalisation festgestellt werden (p-Wert: 0,371) (Abb.15).

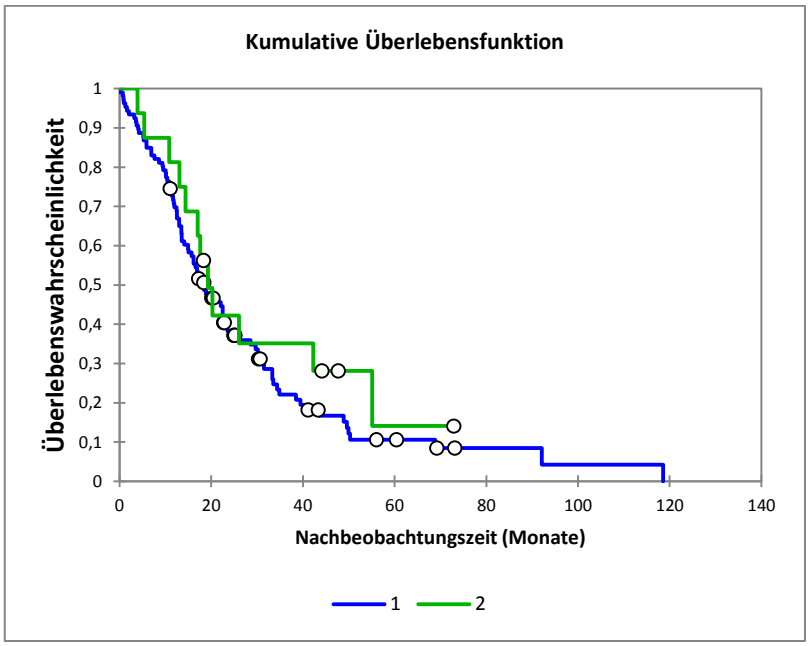


**Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Tumorlokalisation der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) (1 = Pankreaskopf, 2 = Pankreascorpus und/oder -schwanz), zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

### 3.2.2 Tumorgröße

Das Histogramm in Abbildung 16 zeigt, dass die Mehrzahl der untersuchten Pankreaskarzinome einen Primärtumor mit einer Größe >2cm hatten (82%).

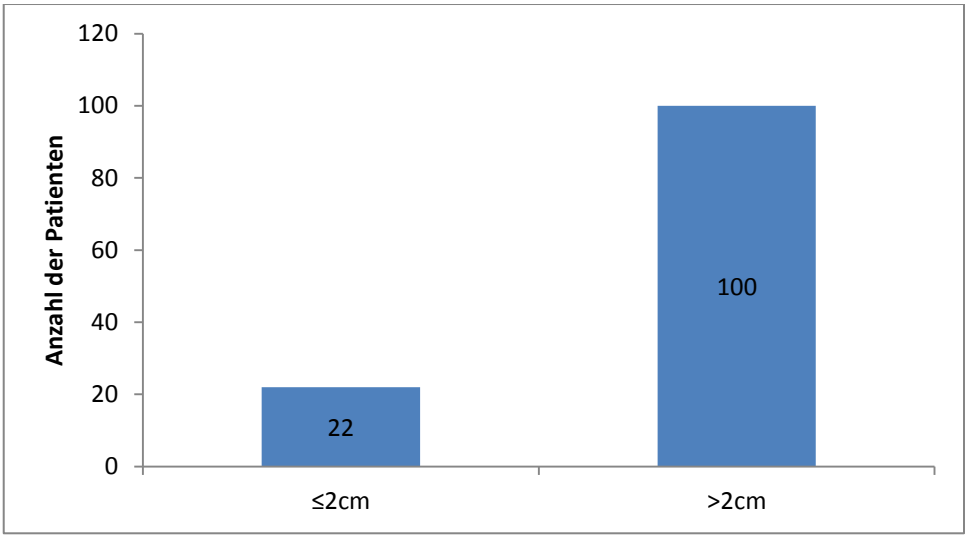


**Abbildung 16: Tumorgrößenverteilung der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) dargestellt als Histogramm mit absoluten Anzahlen**

In Abhängigkeit von der Tumorgröße zeigte sich in der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier kein signifikanter Unterschied im Überleben (p-Wert: 0,342).

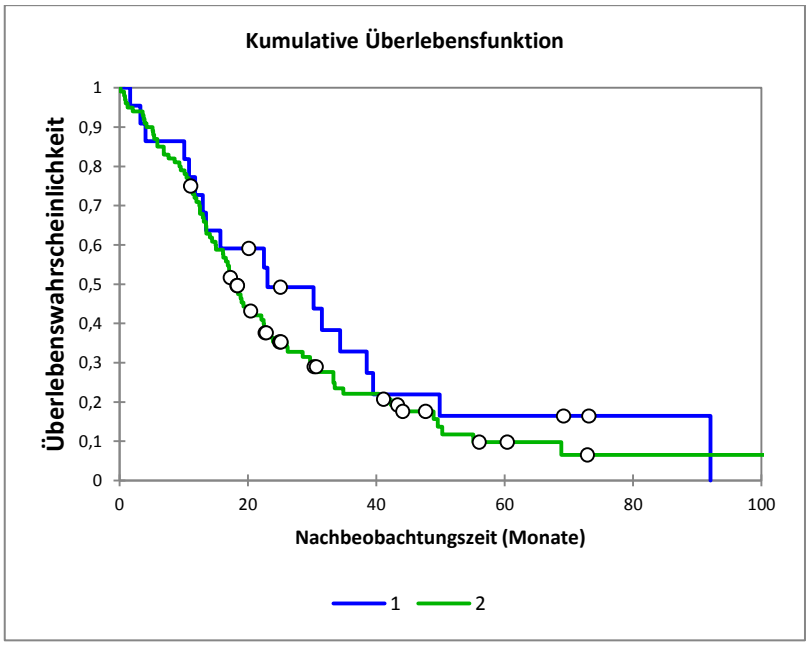


**Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Tumorgröße der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) (1 = ≤2cm, 2 = >2cm), zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

### 3.2.3 TNM - Klassifikation

#### 3.2.3.1 T (Tumor)

Alle vier T-Stadien (Beurteilung des Primärtumors) sind in diesem Kollektiv vertreten, da aber die Anzahl der Patienten in den einzelnen Stadien ungleich verteilt war, wurden Stadium 1+2 und Stadium 3+4 in der Überlebenszeitanalyse zusammengefasst. In dieser Analyse (Abb. 18) zeigte sich, dass die Patienten mit einem kleineren, weniger ausgedehnten Primärtumor (Stadium 1+2) eine bessere, wenn auch nicht signifikant bessere, Überlebensrate hatten als die Patienten mit einem Tumor in den fortgeschritteneren Stadien 3 oder 4 (p-Wert: 0,091). Die mediane Überlebensdauer der Patienten im Stadium 1+2 betrug 27,62 Monate, wohingegen die Patienten im Stadium 3+4 nur 17,91 Monate überlebten.

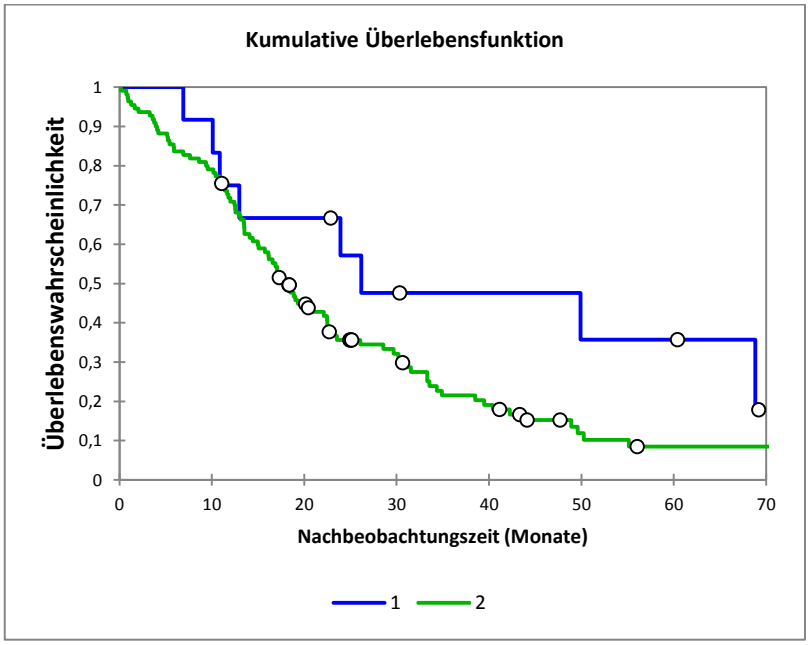


**Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von dem T-Stadium (siehe Tabelle in Einleitung) der Tumore der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) (1 = T-Stadium 1+2, 2 = T-Stadium 3+4), zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

#### 3.2.3.2 N (Nodes / Lymph nodes / Lymphknoten)

Lymphknotenmetastasen konnten bei 82 von 122 Patienten (67%) gefunden werden. Diese Verteilung ist im folgenden Histogramm dargestellt.

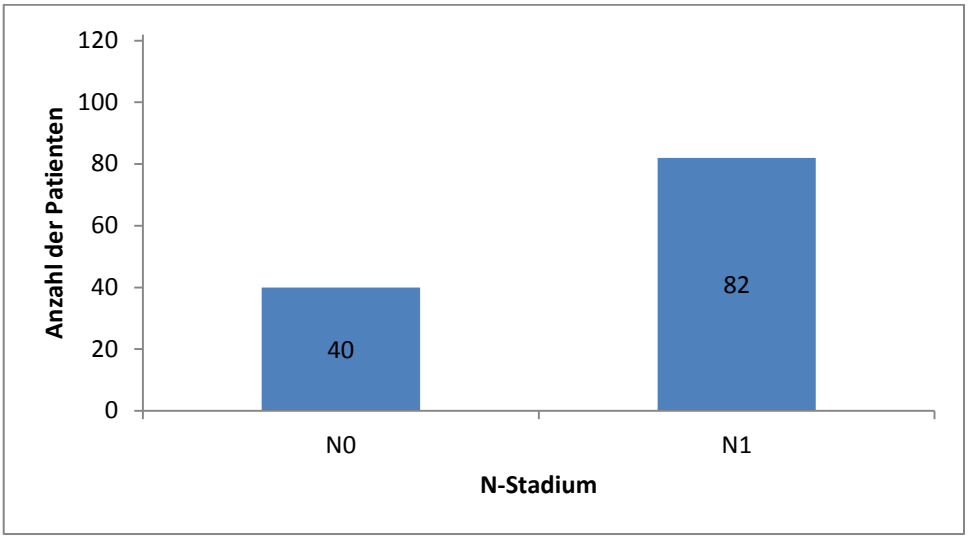


**Abbildung 19: Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen im Kollektiv (Patienten mit Pankreaskarzinom, Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) dargestellt als Histogramm mit absoluten Patientenzahlen (N0 = keine Lymphknotenmetastasen, N1 = Lymphknotenmetastasen vorhanden)**

Mit der Kaplan-Meier-Methode wurde auch hier analysiert, ob positive Lymphknoten einen Einfluss auf das Überleben der Patienten haben. Wie in der folgenden Abbildung (Abb. 20) gezeigt wird, gab es keinen signifikanten Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit abhängig vom Lymphknotenstatus (p-Wert: 0,498). Die mediane Überlebenszeit für die nodal-positiven Patienten war 17,54 Monate und für die nodal-negativen waren es 22,98 Monate.

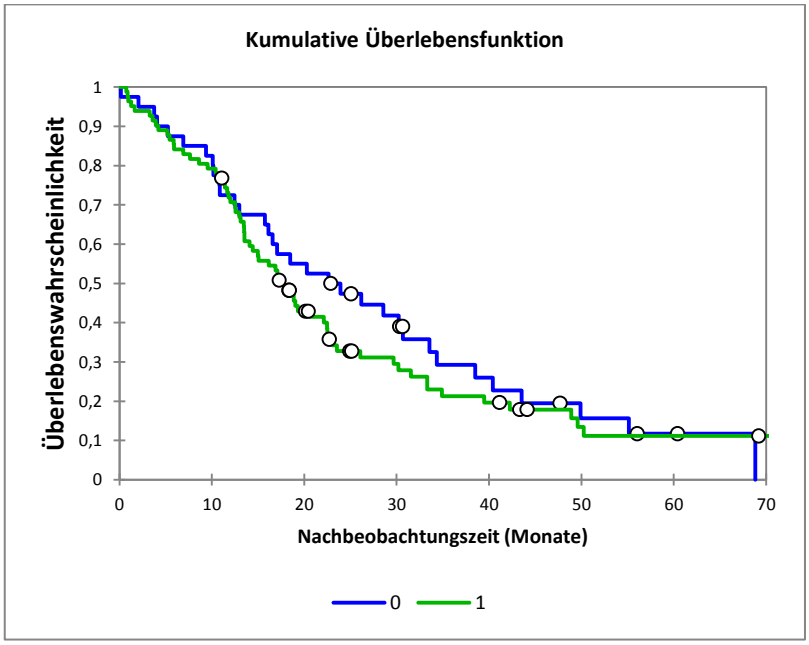


**Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) (0 = nodal-negativ, 1 = nodal-positiv), zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

### 3.2.3.3 M (Metastasen)

In diesem Kollektiv konnten bei 9 von 122 Patienten (7%) Metastasen nachgewiesen werden. In Abbildung 21 ist diese Verteilung als Histogramm dargestellt.

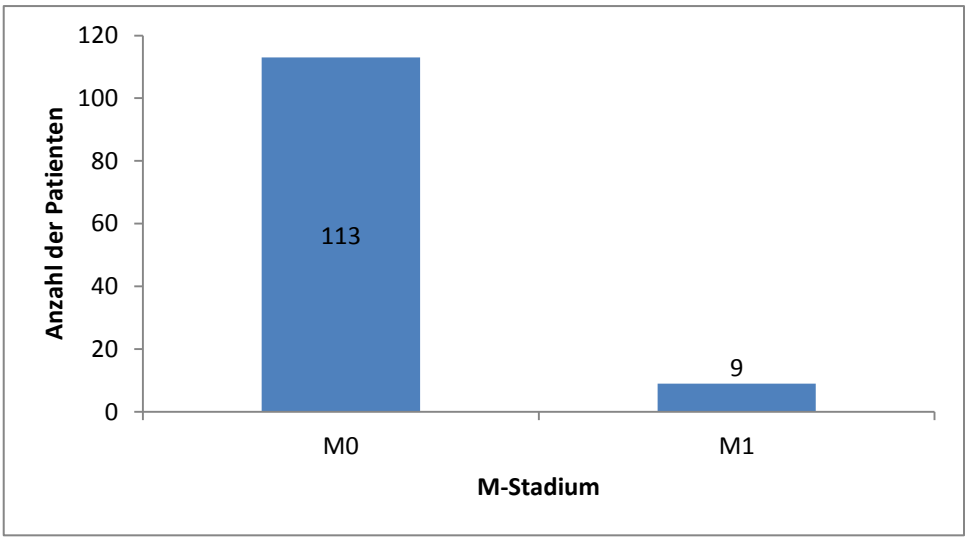


**Abbildung 21: Das Vorhandensein von Metastasen im Kollektiv (Patienten mit Pankreaskarzinom, Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) dargestellt als Histogramm mit absoluten Patientenzahlen (M0 = keine Metastasen, M1 = Metastasen vorhanden)**

In der folgenden Kaplan-Meier-Analyse wurde das Überleben der Patienten in Abhängigkeit von dem Vorhandensein von Metastasen begutachtet. In Abbildung 22 ist deutlich zu sehen, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten, bei denen man keine Metastasen gefunden hat, signifikant besser war als die der Patienten mit Metastasen (p-Wert: 0,048). Für die Patienten ohne Metastasen ergab sich eine mediane Überlebenszeit von 19,35 Monaten. Im Gegensatz dazu hatten die Patienten, bei denen Metastasen gefunden wurden, nur eine mediane Überlebenszeit von 13,50 Monaten.

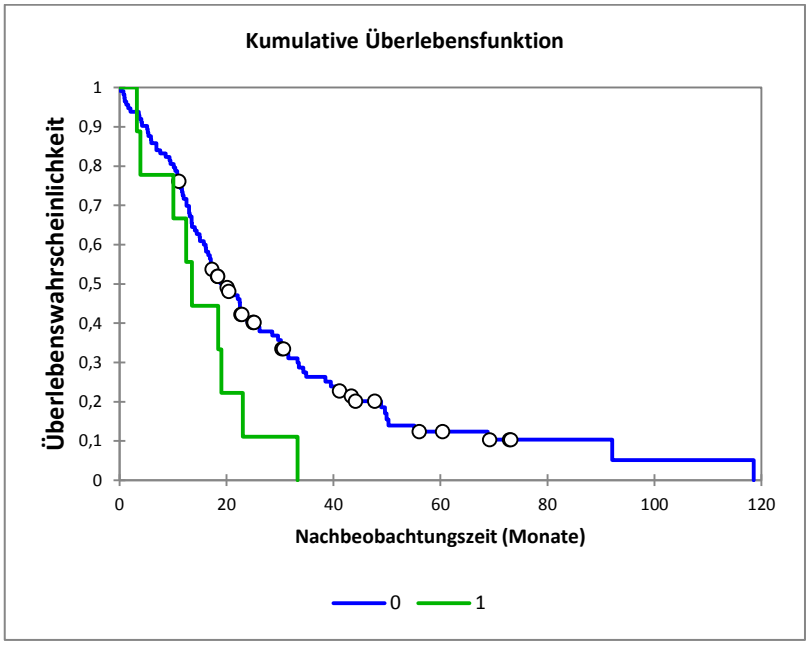


**Abbildung 22: Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) abhängig von dem Vorhandensein von Metastasen dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve (0 = keine Metastasen, 1 = Metastasen vorhanden), zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

### 3.2.4 UICC 2002 - Klassifikation

Das UICC 2002 – Stadium, beschrieben in Abschnitt 1.3, wurde für das gesamte Kollektiv anhand der jeweiligen TNM - Stadien ermittelt. In Abbildung 23 ist die Verteilung der UICC 2002 – Stadien im Kollektiv als Histogramm gezeigt. Alle Stadien sind in dieser Studie vertreten, mit dem Stadium II (82%) als Hauptvertreter.

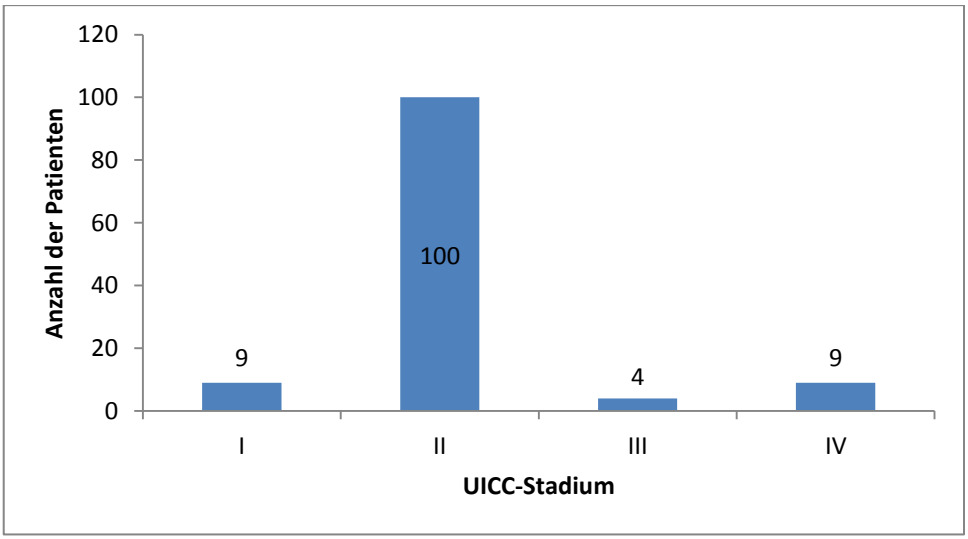


**Abbildung 23: Die Verteilung der UICC 2002 - Stadien im Kollektiv (Patienten mit Pankreaskarzinom, Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) dargestellt als Histogramm mit absoluten Werten (I = Stadium Ia & Ib, II = Stadium IIa & IIb, III = Stadium III, IV = Stadium IV)**

Die Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von dem UICC 2002 – Stadium (Abb. 24) zeigt dass die Patienten mit einem Pankreaskarzinom im UICC - Stadium I und II eine signifikant bessere Überlebensrate hatten als die Patienten im Stadium III und IV (p-Wert: 0,010). Die mediane Überlebensdauer für die Patienten im Stadium I war 48,30 Monate, für die Patienten im Stadium II waren es 19,04 Monate, im Stadium III 14,80 Monate und im Stadium IV 13,50 Monate.

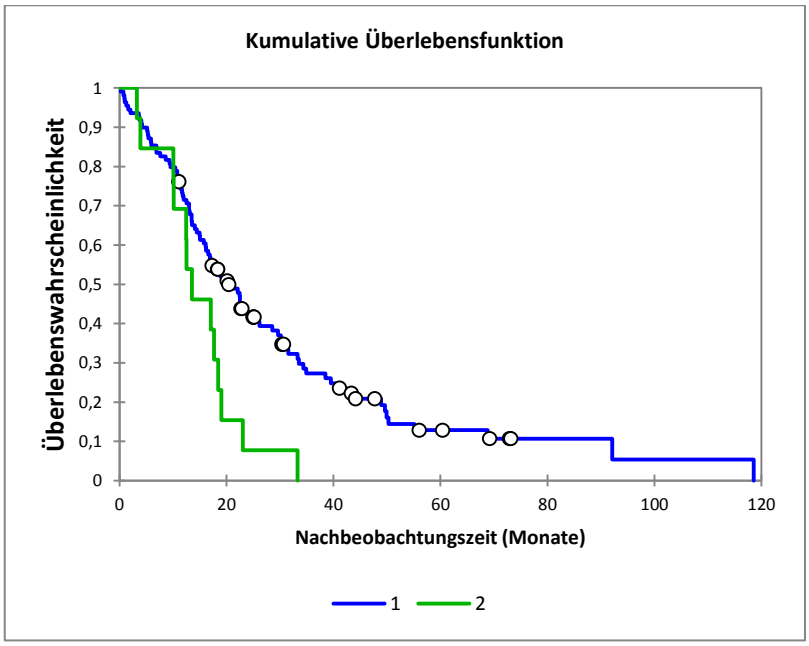


**Abbildung 24: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von dem UICC 2002 - Stadium der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) (1 = Stadium Ia & Ib und IIa & IIb, 2 = Stadium III und IV), zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

### 3.2.5 R-Klassifikation (Residualtumor)

In Abbildung 25 ist die Verteilung des R-Status, also das Vorhandensein beziehungsweise die Abwesenheit eines Residualtumors, im Kollektiv als Histogramm dargestellt.

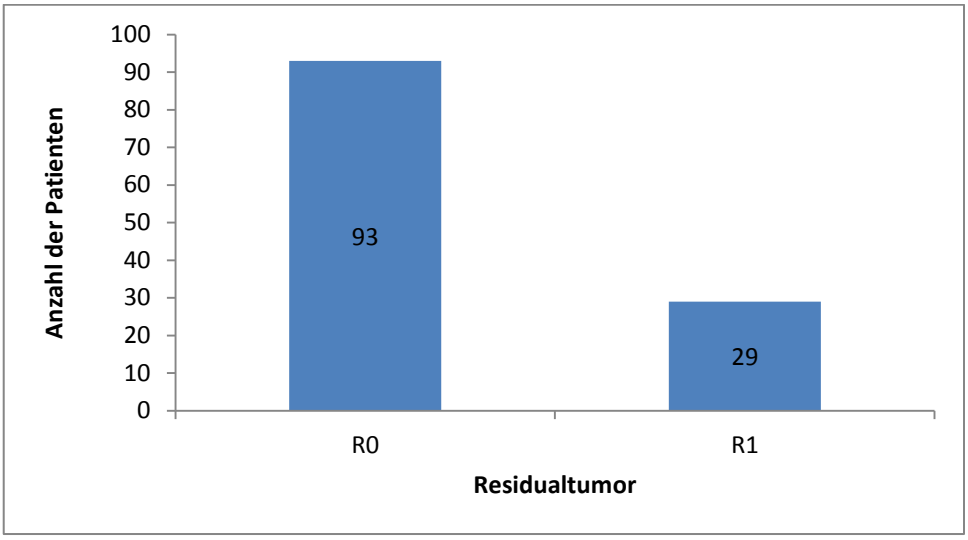


**Abbildung 25: Die R-Klassifikations-Verteilung im Kollektiv (Patienten mit Pankreaskarzinom, Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) dargestellt als Histogramm mit absoluten Werten (R0 = kein Residualtumor, R1 = mikroskopisch nachgewiesener Residualtumor)**

In der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier (Abb. 26) zeigte sich, dass die Patienten ohne Residualtumor nach Operation (R0) eine bessere, wenn auch nicht signifikant bessere, Überlebensrate hatten als die Patienten mit Residualtumor (R1) nach Pankreasresektion (p-Wert: 0,103). Patienten ohne Residualtumor hatten eine mediane Überlebenszeit von 19,33 Monaten, während Patienten mit Residualtumor nur eine mediane Überlebenszeit von 16,80 Monaten hatten.

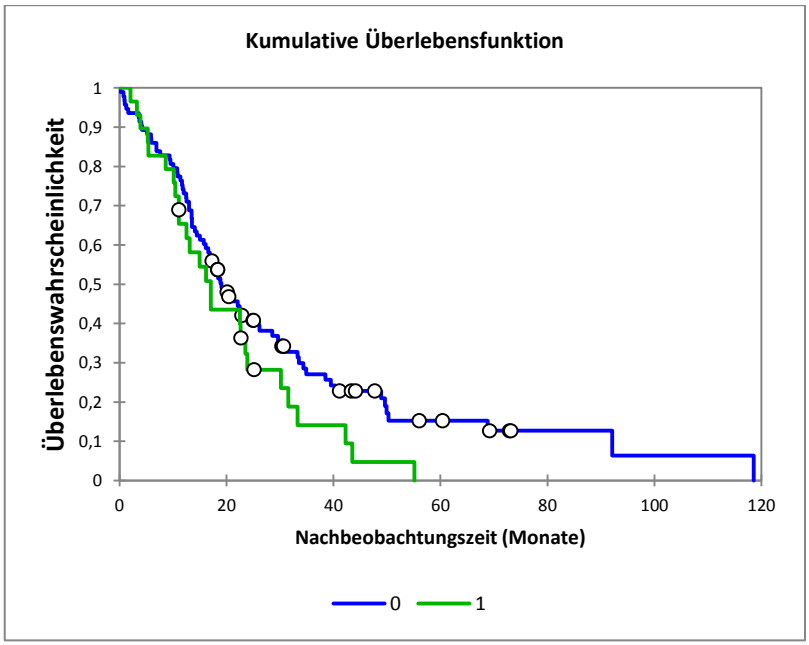


**Abbildung 26: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom R-Status der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) (0 = kein Residualtumor, 1 = mikroskopisch nachgewiesener Residualtumor), zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

### 3.2.6 Grading

Die Verteilung des Tumorgradings, also des Differenzierungsgrades der Karzinome im Kollektiv (in Abschnitt 1.3 erläutert), ist in Abbildung 27 zu sehen. Zusammengefasst wurden hier in GI = G1 & G1-2 (gut bis mäßig differenziert), in GII = G2 (mäßig differenziert) und in GIII = G2-3, G3 & G3-4 (mäßig bis schlecht bzw. undifferenziert).

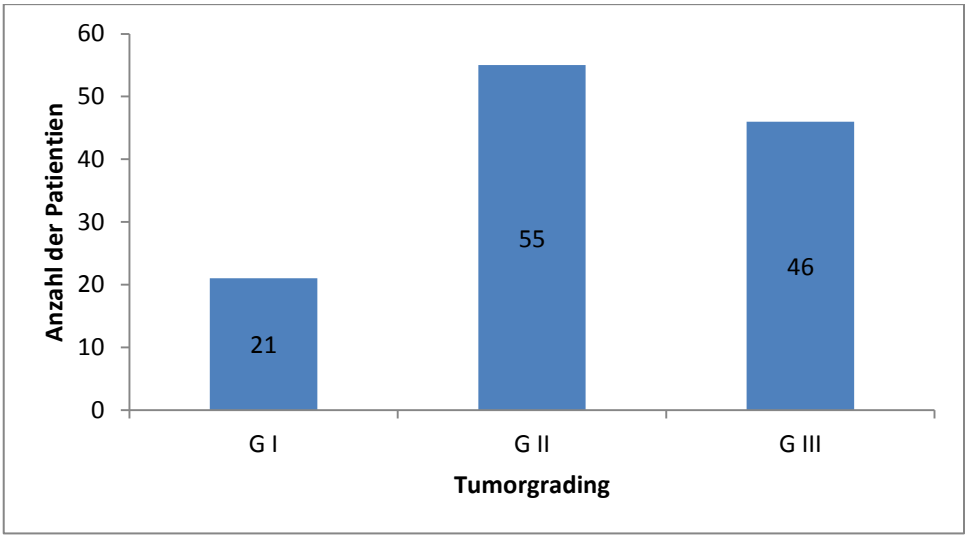


**Abbildung 27: Gradingverteilung der Tumore der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) dargestellt als Histogramm mit absoluten Anzahlen (zusammengefasst sind in GI = G1 & G1-2, in GII = G2, in GIII = G2-3, G3 & G3-4)**

Die Analyse des Gradings in Bezug auf das Überleben der Patienten ist in Abbildung 28 dargestellt. Die Patienten mit einem gut differenzierten (1) Tumor zeigten ein signifikant besseres Überleben als die Patienten mit einem mäßig differenzierten (2) Tumor (p-Wert: 0,009), diese wiederum ein signifikant besseres Überleben als die mit einem schlecht differenzierten (3) Tumor (p-Wert: 0,001). Die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit aller Differenzierungsgrade ergab einen hoch signifikanten Unterschied im Überleben der drei Gruppen mit einem p-Wert von < 0,0001. Die mediane Überlebensdauer der Patienten in Gruppe 1 (G1 & G1-2) betrug 48,31 Monate, die der Patienten in der 2. Gruppe (G2) 22,64 Monate und die der Patienten in der 3. Gruppe (G2-3, G3 & G3-4) 11,14 Monate.

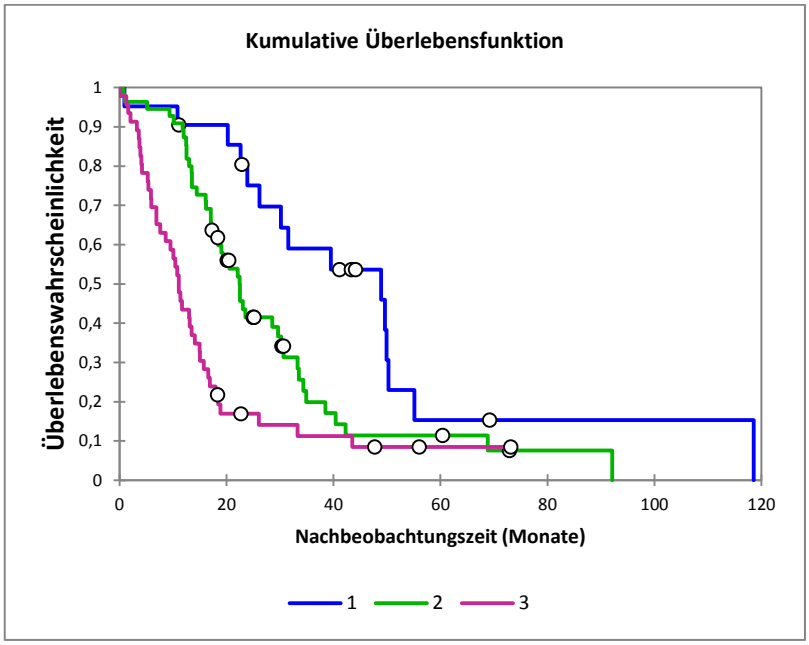


**Abbildung 28: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Differenzierungsgrade der Tumore der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) (1 = G1 & G1-2, 2 = G2, 3 = G2-3, G3 & G3-4), p-Wert: < 0,0001, zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

## 3.3 Immunhistochemie/Prognostische Biomarker

### 3.3.1 COX-2

Die immunhistochemische Anfärbung und Auswertung des Proteins COX-2 konnte an Gewebeproben von 114 der 122 Pankreaskarzinompatienten durchgeführt werden. In den positiven Proben wurde die COX-2-Expression im Zytoplasma der Adenokarzinomzellen detektiert. Von den 114 Proben zeigten 59 (52%) positive Tumorzellen für COX-2, auf den restlichen 55 (48%) Proben fand keine Anfärbung statt. Folgende Tabelle (Tab. 7) zeigt die unterschiedlichen Intensitäten der Anfärbung bzw. den unterschiedlichen Grad der Expression von COX-2 in den 114 Pankreaskarzinom-Gewebeproben.

**Tabelle 7: Ergebnisse der Immunhistochemie des Proteins COX-2 (monoklonaler Antikörper gegen humanes COX-2, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, Verdünnung 1:200, Detektion Alkaline Phosphatase/RED (Dako)), unterteilt nach der Intensität der Anfärbung der Tumore der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009)**

| Intensität / Grad | Anzahl | Anteil |
|---|---|---|
| - (negativ) | 55 | 48 % |
| + (schwach positiv) | 33 | 29 % |
| ++ (mäßig positiv) | 13 | 11,5 % |
| +++ (stark positiv) | 13 | 11,5 % |

Die immunhistochemische Anfärbung von COX-2 in den 114 Gewebeproben der Pankreaskarzinompatienten ist hier mit repräsentativen Abbildungen dargestellt.

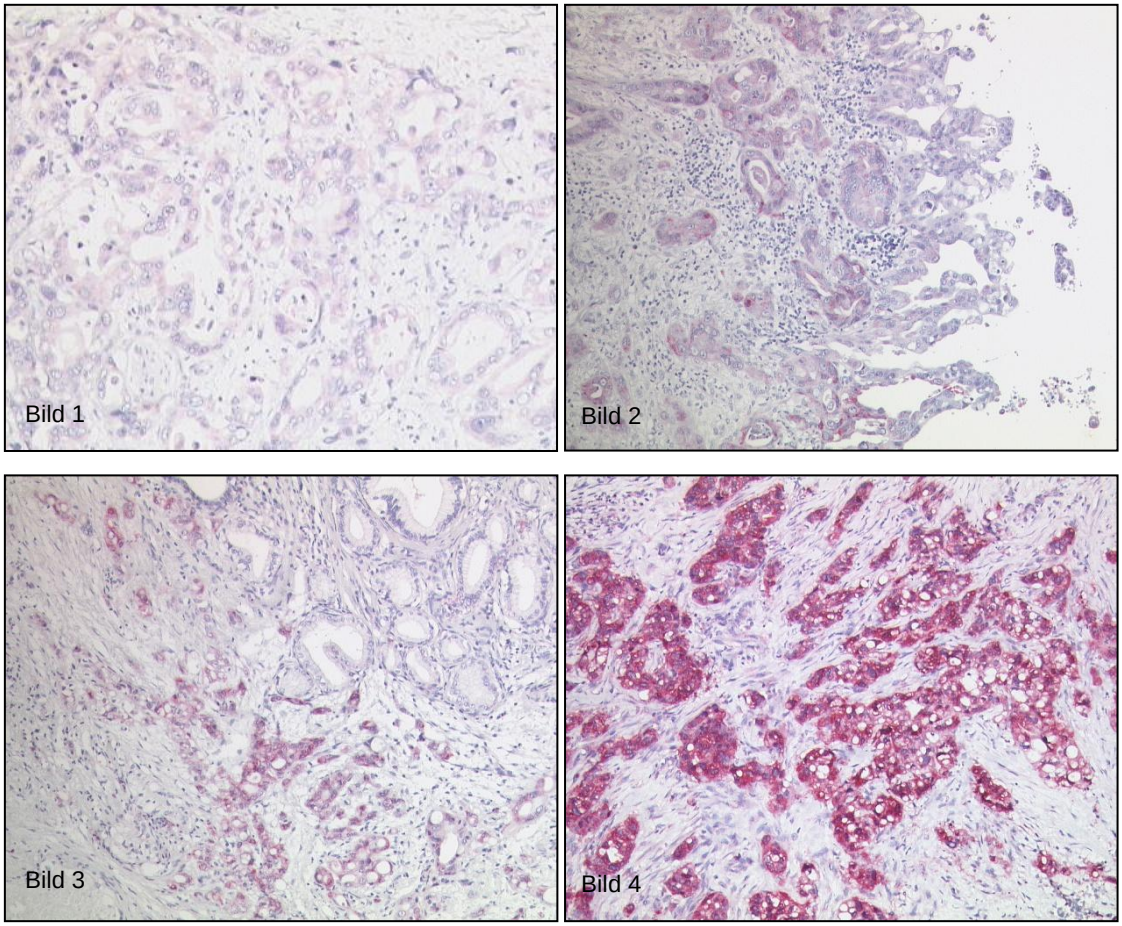


**Abbildung 29: Repräsentative Darstellung der Anfärbeintensitäten des Proteins Cox-2 in Tumoren der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009); benutzt wurde ein Primärantikörper gegen humanes COX-2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, Verdünnung 1:200) und detektiert mittels Alkaline Phosphatase/RED (Dako), (Bild 1: Karzinom (-) negativ, 20-fache Vergrößerung; Bild 2: Karzinom (+) schwach positiv, 10-fache Vergrößerung; Bild 3: Karzinom (++) mäßig positiv, 10-fache Vergrößerung; Bild 4: Karzinom (+++) stark positiv, 10-fache Vergrößerung)**

Die prognostische Korrelation der Expression von COX-2 in den Tumorzellen wurde in dieser Studie untersucht. Mittels einer Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse (Abb. 30) konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer COX-2-Expression eine signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit hatten im Vergleich zu Patienten, die COX-2 negativ waren (p-Wert: 0,035). Die mediane Überlebensdauer der COX-2 positiven Patienten war 17,35 Monate, wohingegen die COX-2 negativen Patienten 23,50 Monate überlebt haben.

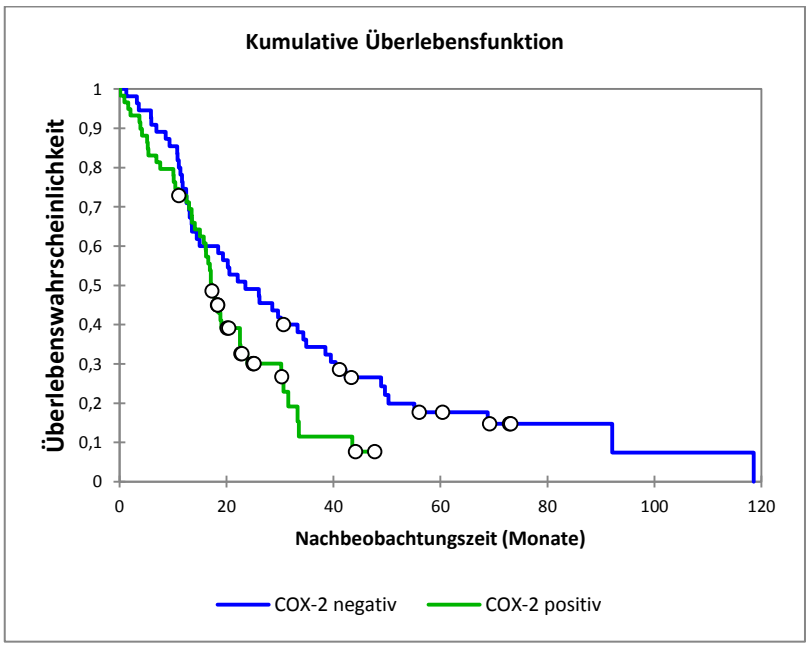


**Abbildung 30: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der COX-2 – Expression der Tumore der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009), zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

### 3.3.2 Bcl-2

Ein weiteres Protein, welches in dieser Studie analysiert wurde war Bcl-2. Alle untersuchten Pankreaskarzinom-Gewebeproben waren Bcl-2 negativ (Tab. 8). Die sich zum Teil in den Gewebeschnitten befindenden PanIN-Läsionen waren auch nahezu alle negativ. In nur einer einzigen PanIN-Läsion konnte eine Bcl-2-Expression nachgewiesen werden (siehe Bild 4 in Abb. 31). In jeder Tumorgewebeprobe waren kleine B-Lymphozyten vorhanden, die alle das Protein Bcl-2 exprimierten und daher eine starke Anfärbung zeigten. Diese immer

vorhandene Anfärbung der B-Lymphozyten wurde als intrinsische Positivkontrolle und Referenz für die Auswertung benutzt.

**Tabelle 8: Bcl-2-Expression in 111 duktalen pankreatischen Adenokarzinomen (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) unterteilt nach dem Differenzierungsgrad (Grading)**

| Grading | Positiv | Negativ |
|---|---|---|
| G I | 0 | 24 |
| G II | 0 | 57 |
| G III | 0 | 30 |

Eine repräsentative Auswahl der immunhistochemischen Färbungen des Proteins Bcl-2 in den duktalen pankreatischen Adenokarzinomen ist im Folgenden bildlich dargestellt.

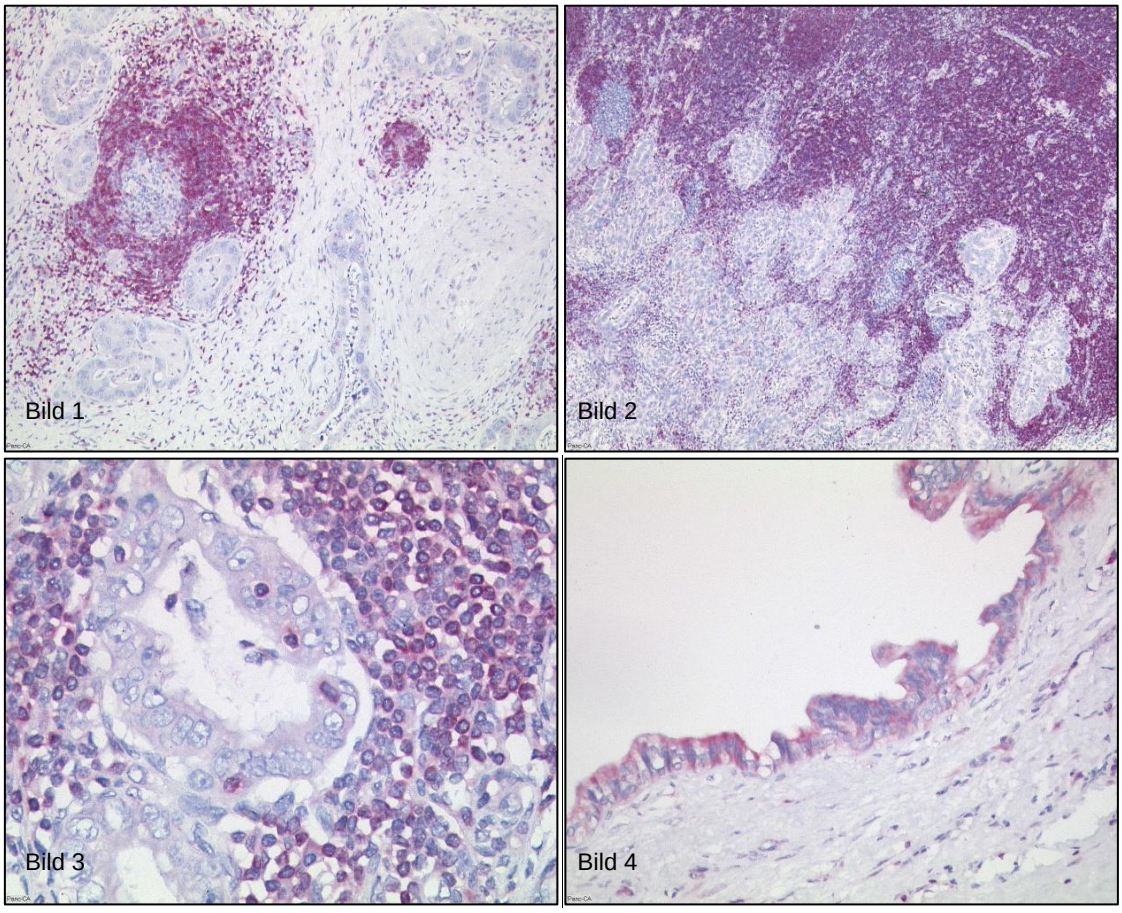


**Abbildung 31: Repräsentative Darstellung der Anfärbeintensitäten des Proteins Bcl-2 in Tumoren der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009); benutzt wurde ein Primärantikörper gegen humanes Bcl-2 (Dako, Glostrup, Dänemark, Verdünnung 1:500) und detektiert mittels Alkaline Phosphatase/RED (Dako), (Bild 1: Karzinom negativ, B-Zellen positiv (Proliferationszentrum negativ), 10-fache Vergrößerung; Bild 2: Karzinom negativ, B-Zellen im Lymphknoten positiv, 5-fache Vergrößerung; Bild 3: Karzinom negativ, B-Zellen positiv, 20-fache Vergrößerung; Bild 4: PanIN 1 positiv, 10-fache Vergrößerung)**

### 3.3.3 c-FLIP

An 120 Gewebeproben konnte die immunhistochemische Färbung des Apoptose-regulierenden Proteins c-FLIP durchgeführt werden. Die Anfärbung fand ausschließlich im Zytoplasma der Adenokarzinomzellen des Pankreas statt. Von den 120 Pankreaskarzinomen zeigten 111 (92,5%) eine c-FLIP-Expression, die restlichen 9 (7,5%) Karzinome waren c-FLIP negativ. In Tabelle 9 sind die verschiedenen Intensitäten der Anfärbung bzw. die unterschiedlichen Grade der Expression des Proteins c-FLIP im Kollektiv dargestellt.

**Tabelle 9: Ergebnisse der Immunhistochemie des Proteins c-FLIP (polyklonaler Antikörper gegen humanes c-FLIP, Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland, Verdünnung 1:100, Detektion Alkaline Phosphatase/RED (Dako)) unterteilt nach der Intensität der Anfärbung der Tumore der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009)**

| Intensität / Grad | Anzahl | Anteil |
|---|---|---|
| - (negativ) | 9 | 7,5 % |
| + (schwach positiv) | 60 | 50 % |
| ++ (mäßig positiv) | 44 | 36,7 % |
| +++ (stark positiv) | 7 | 5,8 % |

Im Folgenden sind repräsentative Abbildungen der immunhistochemischen Anfärbung des Proteins c-FLIP zu sehen (Abb. 32).

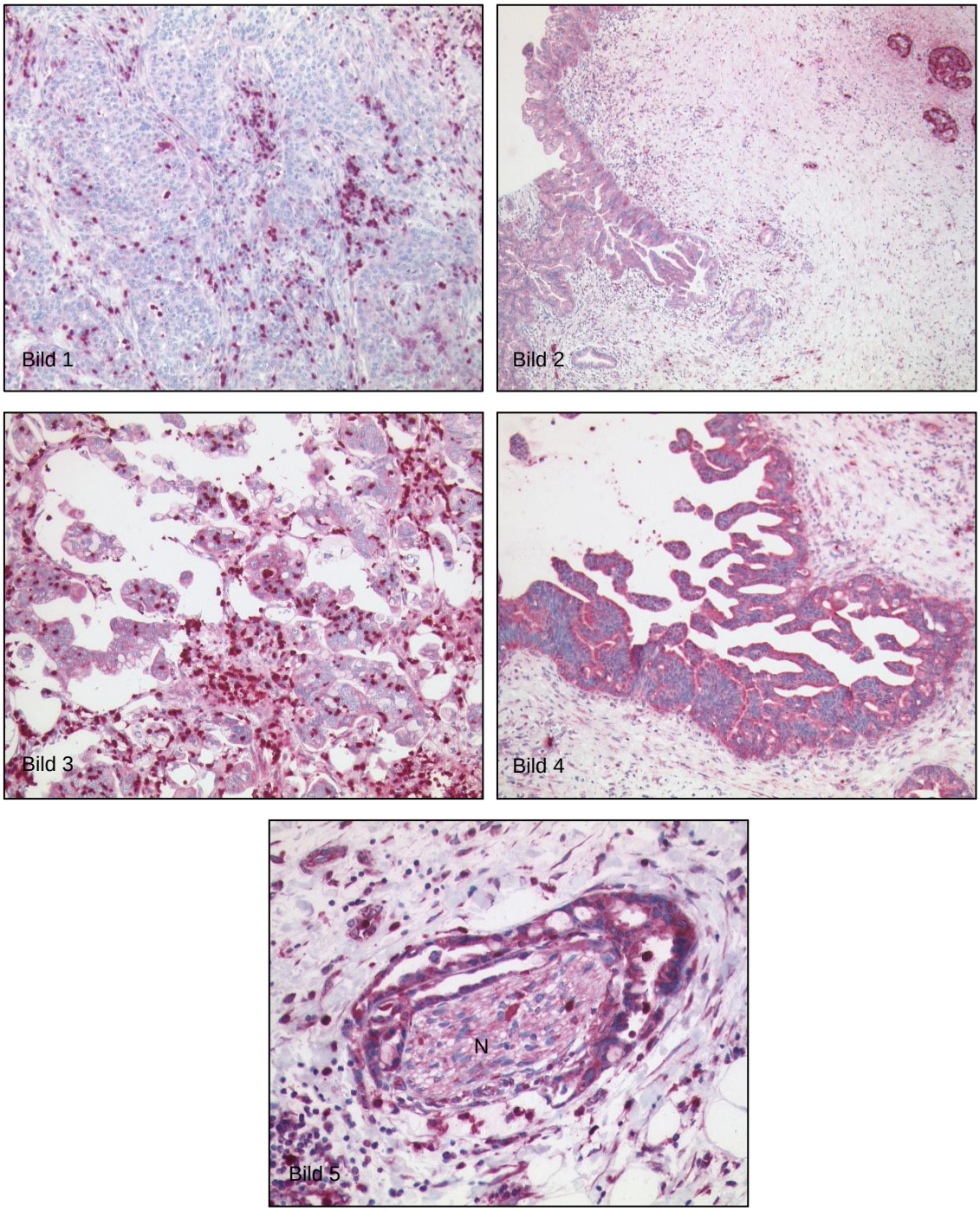


**Abbildung 32: Repräsentative Darstellung der Anfärbeintensitäten des Proteins c-FLIP in Tumoren der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009); benutzt wurde ein Primärantikörper gegen humanes c-FLIP (Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland, Verdünnung 1:100) und detektiert mittels Alkaline Phosphatase/RED (Dako), (Bild 1: Karzinom (-) negativ, Entzündungszellen als intrinsische Positivkontrolle (+++) stark positiv, 10-fache Vergrößerung; Bild 2: Karzinom (+) schwach positiv, Langerhans-Inseln als intrinsische Positivkontrolle (+++) stark positiv, 5-fache Vergrößerung; Bild 3: Karzinom (++) mäßig positiv, Entzündungszellen (+++) stark positiv, 10-fache Vergrößerung; Bild 4: PanIN (+++) stark positiv, 10-fache Vergrößerung; Bild 5: Karzinom mit Invasion eines Nerven (N) (+++) stark positiv, 20-fache Vergrößerung)**

In dieser Studie wurde auch die prognostische Korrelation der Expression von dem Apoptose-regulierenden Protein c-FLIP in Pankreaskarzinomzellen untersucht. Es konnte mit einer Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse (Abb. 33) gezeigt werden, dass die Patienten, deren Tumorzellen keine c-FLIP-Expression aufwiesen, eine wesentlich schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit hatten im Vergleich mit den Patienten, die c-FLIP positiv waren. Dieser Unterschied im Überleben war hoch signifikant (p-Wert: 0,0001). Anhand der medianen Überlebensdauer der zwei Patientengruppen (c-FLIP negativ / c-FLIP positiv) ist dieser Unterschied auch deutlich zu sehen, da die mediane Überlebensdauer der negativen Patienten 12,75 Monate und die der c-FLIP-exprimierenden Patienten 21,80 Monate war.

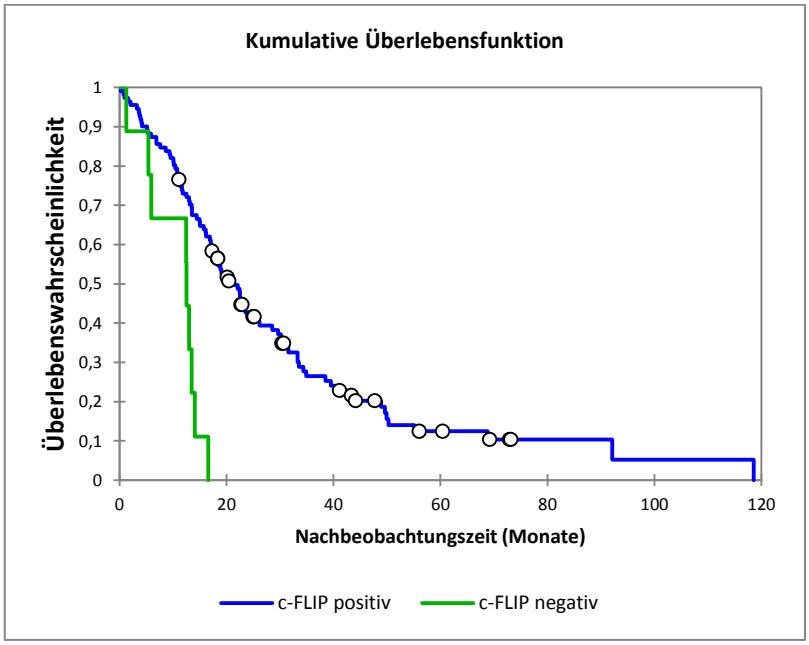


**Abbildung 33: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der c-FLIP – Expression der Tumore der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009) (p-Wert: 0,0001), zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

### 3.3.4 Ki-67 und weitere Biomarker

Die Proliferationsrate der Karzinome wurde mittels dem MIB-1-Antikörper, der das Ki-67 Protein detektiert, immunhistochemisch dargestellt. Die Anfärbung des Proteins fand im Zellkern der Adenokarzinomzellen des Pankreas statt.

Ausgewertet wurde die Färbung anhand des anteiligen Vorhandenseins von positiven Tumorzellen pro Gewebeprobe. In diesem Kollektiv hatten 51 Karzinome eine hohe Proliferationsrate von über 10% und 66 Karzinome eine niedrige Proliferationsrate von 0-10%.

Mit einer Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse konnte gezeigt werden, dass die Patienten, die einen Tumor mit einer geringeren Proliferationsrate von 0-10% hatten, eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit hatten im Vergleich mit den Patienten, die ein Pankreaskarzinom mit einer höheren Proliferationsrate von über 10% hatten (p-Wert: 0,017) (Abb. 34).

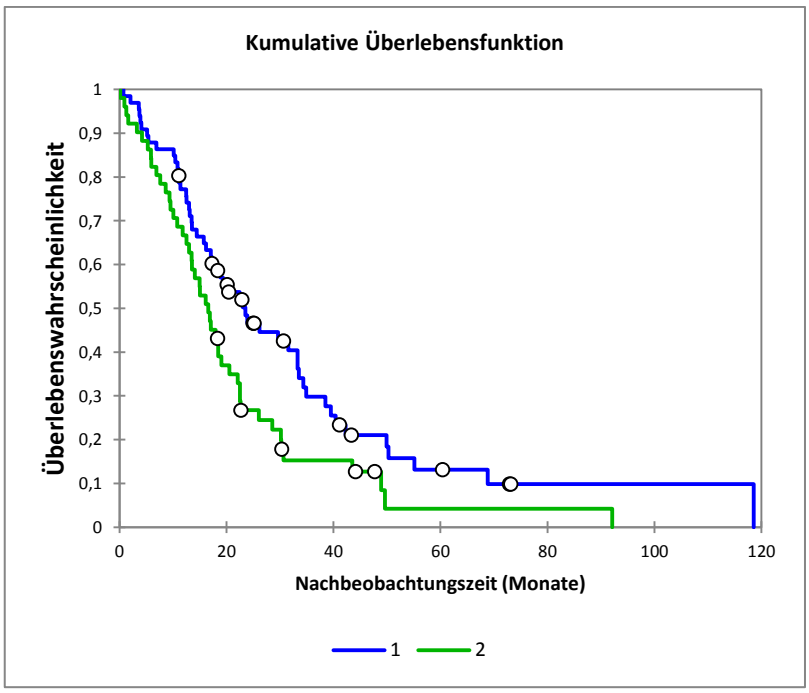


**Abbildung 34: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der Proliferationsrate der Tumore der Patienten mit Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009), sichtbar gemacht durch eine immunhistochemische Färbung des Proteins Ki-67 mit dem Primärantikörper MIB-1-Antikörper (monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Ki-67-Human (M7240), Dako, Glostrup, Dänemark, Verdünnung 1:200) (1 = Proliferationsrate von 0-10%, 2 = Proliferationsrate von >10%), zensierte Fälle sind als Kreise dargestellt**

Die weitere Auswertung der Ergebnisse des Proliferationsmarkers Ki-67 sowie die Darstellung der Ergebnisse von Cyclin E und p16 in diesem Pankreaskarzinomkollektiv sind Gegenstand der Dissertation von Marie-Charlotte Glatzel.

### 3.3.5 Multivariate Analyse

Alle Faktoren, die in der univariaten Analyse signifikant waren, wurden in der multivariaten Analyse mittels eines proportionalen Ausfallmodells (Cox-Regression) analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass der Differenzierungsgrad GIII der stärkste unabhängige prognostische Faktor in Bezug auf das Überleben der Patienten war (p-Wert: 0,0004). Das Hazard Ratio für das GIII-Stadium war 3,48. Dem GIII-Stadium folgte in der Signifikanz bezüglich der Prognose der Patienten die Variable c-FLIP-negativ. Hier war das Hazard Ratio 2,28 und der p-Wert: 0,035. Das UICC-Stadium hatte in der multivariaten Analyse auch einen unabhängig signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten (p-Wert: 0,041; Hazard Ratio: 3,12). Alle anderen begutachteten Faktoren, auch die in der Kaplan-Meier-Analyse signifikant das Überleben beeinflussende COX-2 Expression, hatten in der multivariaten Analyse keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10: Übersicht der Ergebnisse der multivariaten Analyse (Cox-Regression) aller Faktoren, die in der univariaten Analyse signifikant waren (Pr>Chi² beschreibt die prognostische Signifikanz) (Kollektiv: Patienten mit Pankreaskarzinom, Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009)**

| Variable | Wert | Wald-Chi-Quadrat | Pr > Chi² | Hazard Ratio | Hazard Ratio untere Grenze (95%) | Hazard Ratio obere Grenze (95%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Metastasen | -0,357 | 0,320 | 0,572 | 0,700 | 0,203 | 2,415 |
| UICC 1+2,3+4 | 1,136 | 4,183 | 0,041 | 3,115 | 1,048 | 9,253 |
| G III | 1,246 | 12,536 | 0,0004 | 3,476 | 1,744 | 6,928 |
| COX-2-positive | 0,049 | 0,039 | 0,844 | 1,051 | 0,643 | 1,716 |
| Ki67 >10% | 0,188 | 0,593 | 0,441 | 1,207 | 0,748 | 1,946 |
| c-FLIP-negative | 0,823 | 4,469 | 0,035 | 2,278 | 1,062 | 4,887 |

## 3.4 Übersichtstabelle

**Tabelle 11: Übersicht der Ergebnisse dieser Arbeit (Kollektiv: Patienten mit Pankreaskarzinom, Universitätsklinikum Ulm, 1996 – 2009); statistisch signifikante Werte sind mit einem Stern (*) markiert**

| | n absolut (n relativ %) | Medianes Überleben (Monate) | p-Wert (Log-rank) | p-Wert (Cox-Modell) |
|---|---|---|---|---|
| **Lebens-Status** | | | | |
| Verstorben | 100 (82) | | | |
| Lebend | 22 (18) | | | |
| **Alter bei Diagnose** | | | | |
| <70 Jahre | 74 (61) | 21,87 | 0,076 | |
| ≥70 Jahre | 48 (39) | 16,36 | | |
| **Geschlecht** | | | | |
| Weiblich | 51 (42) | 18,91 | 0,600 | |
| Männlich | 71 (58) | 18,16 | | |
| **Differenzierungsgrad** | | | | |
| Gut | 21 (17) | 48,31 | < 0,0001* | 0,0004* |
| Mäßig | 55 (45) | 22,64 | | |
| Schlecht | 46 (38) | 11,14 | | |
| **UICC 2002** | | | | |
| I & II | 9 (7,5) / 100 (82) | 48,30 / 19,04 | 0,010* | 0,041* |
| III & IV | 4 (3) / 9 (7,5) | 14,80 / 13,50 | | |
| **Tumorgröße** | | | | |
| ≤2 cm | 22 (18) | 23,85 | 0,342 | |
| >2 cm | 100 (82) | 17,91 | | |
| **Residuum** | | | | |
| Frei (R0) | 93 (76) | 19,33 | 0,103 | |
| Befallen (R1) | 29 (24) | 16,80 | | |
| **Lymphknoten** | | | | |
| Negativ | 40 (33) | 22,98 | 0,498 | |
| Positiv | 82 (67) | 17,54 | | |
| **Metastasen** | | | | |
| Negativ | 113 (92,5) | 19,35 | 0,048* | 0,572 |
| Positiv | 9 (7,5) | 13,50 | | |
| **COX-2 Expression** | | | | |
| COX-2 negativ | 55 (48) | 23,50 | 0,035* | 0,844 |
| COX-2 positiv | 59 (52) | 17,35 | | |
| **c-FLIP Expression** | | | | |
| c-FLIP negativ | 9 (7,5) | 12,75 | 0,0001* | 0,035* |
| c-FLIP positiv | 111 (92,5) | 21,80 | | |
| **Ki-67 Expression** | | | | |
| Ki-67 ≤10% | 66 (56) | 23,05 | 0,017* | 0,441 |
| Ki-67 >10% | 51 (44) | 16,60 | | |

# 4 Diskussion

## 4.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom, einer der aggressivsten soliden Tumoren, mit einer der schlechtesten Überlebenswahrscheinlichkeiten, wurde in dieser Studie auf prognostisch relevante Biomarker im Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten untersucht.

In dieser Studie wurde eine 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf das Gesamtüberleben von 71,2%, eine 2-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 37,5% und eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 11,0% für Patienten mit operablen Pankreaskarzinomen festgestellt. In der Literatur ist eine sehr niedrige 5-Jahres-Überlebensrate beim Pankreaskarzinom von nur 4% beschrieben. Hier sind aber die resektablen sowie die nicht mehr resektablen, palliativ behandelten Pankreaskarzinome mit inbegriffen [1, 100]. In Studien, die, wie wir, nur Patienten mit resektablen Pankreaskarzinomen begutachtet haben, wurde eine bessere 5-Jahres-Überlebensrate gefunden. Sohn et al. haben z.B. in ihrem untersuchten Kollektiv von 616 Patienten mit resektablen Pankreaskarzinomen eine 5-Jahres-Überlebensrate von 17% gefunden [89].

Das durchschnittliche Erkrankungsalter für das Pankreaskarzinom ist in der Literatur mit 60 bis 75 Jahren beschrieben [1, 2]. In unserem Kollektiv war das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung 65,4 Jahre und somit innerhalb der beschriebenen Alterspanne. In der Überlebenszeitanalyse konnte gezeigt werden, dass Patienten älter als 70 Jahre eine schlechtere, wenn auch nicht signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit hatten im Vergleich zu den jüngeren Patienten. In einigen Studien konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Alter bei Diagnosestellung und Überleben gezeigt werden [68], in anderen wiederum nicht [75].

Die männlichen Patienten überwiegen in unserem Kollektiv mit 58% im Vergleich zu den weiblichen Patienten mit 42%. Dies entspricht der in der Literatur beschriebenen gering erhöhten Inzidenz bei Männern [100]. In Abhängigkeit von dem Geschlecht der Patienten konnte in dieser Studie kein signifikanter Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit festgestellt werden, wie sich auch in anderen Studien gezeigt hat [68].

## 4.2 Tumor- Charakteristiken

In diesem Kollektiv befanden sich die meisten Karzinome im Pankreaskopf (87%) und es konnte kein wesentlicher Unterschied im Überleben abhängig von der Tumorlokalisation festgestellt werden. In anderen Studien waren die meisten Karzinome ebenfalls im Pankreaskopf zu finden und es konnte auch in diesen Studien kein Zusammenhang zwischen der Lokalisation des Tumors und dem Überleben der Patienten nachgewiesen werden [68, 75, 89].

Bei der Untersuchung der Größe des Primärtumors der Patienten hat sich ergeben, dass 82% der Karzinome einen Primärtumor >2cm hatten. In der Überlebenszeitanalyse konnte jedoch kein wesentlicher Unterschied im Überleben in Abhängigkeit der Größe des Tumors festgestellt werden. In manchen anderen Studien konnte auch keine signifikante Assoziation zwischen Tumorgröße und Überleben gezeigt werden [68], wohingegen in anderen schon ein Zusammenhang festgestellt werden konnte [75, 89].

In dieser Studie konnte ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der Tumordifferenzierung (Grading) und dem Überleben der Patienten festgestellt werden. Die Patienten mit einem gut differenzierten Tumor zeigten ein signifikant besseres Überleben als die Patienten mit schlechter differenzierten Tumoren. Dieser signifikante Zusammenhang konnte auch in mehreren anderen Studien nachgewiesen werden [38, 49, 89].

In unserer Analyse der TNM-Stadien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem niedrigeren T-Stadium eine bessere Überlebensrate hatten. Diese Steigerung der Überlebensrate in Abhängigkeit der T-Stadien war jedoch in unserer Studie nicht statistisch signifikant. Hermanova et al. [38] konnte, im Gegensatz zu diversen anderen Studien, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem T-Stadium und dem Überleben der Patienten gefunden haben, auch keine signifikante Korrelation feststellen [49, 68, 75].
Bei einer Mehrzahl der Patienten im Kollektiv konnten Karzinom-positive Lymphknoten gefunden werden. Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen hat in unserer Überlebenszeitanalyse keinen signifikanten prognostischen Einfluss auf das Überleben der Patienten gehabt. In anderen Studien konnte im Vergleich dazu aber ein signifikant schlechteres Überleben in Korrelation mit positiven Lymphknoten gezeigt werden [17, 36, 38, 68, 75, 89].
Fernmetastasen wurden bei einer geringen Anzahl von Patienten im Kollektiv gefunden. Anhand der jeweiligen TNM - Stadien wurde dann das UICC - Stadium für jedes Karzinom ermittelt. In der Überlebenszeitanalyse konnte gezeigt werden, dass es sowohl einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Metastasen und dem Überleben als auch dem UICC-Stadium und dem Überleben der Patienten gibt. Diese Korrelationen konnten auch in der Studie von Juuti et al. nachgewiesen werden [49].

## 4.3 COX-2

Unser Ergebnis, dass Pankreaskarzinompatienten mit einer COX-2-Expression eine signifikant kürzere Überlebenszeit hatten im Vergleich zu Patienten, deren Tumorzellen COX-2 negativ waren, bestätigt die Aussagen von Matsubayashi et al. und Juuti et al., dass eine COX-2-Expression im Pankreaskarzinom mit einer schlechten Prognose einhergeht [49, 64]. Andere Studien, wie z.B. Merati et al., zeigten zwar auch eine erhöhte COX-2-Expression in Pankreaskarzinomzellen, aber keine signifikante Korrelation mit dem Überleben [66]. Diese Diskrepanz der Ergebnisse könnte durch die Benutzung unterschiedlicher Antikörper erklärt werden. Wir haben ebenso, wie Matsubayashi et al. und Juuti et al., denselben

monoklonalen Maus-Antikörper gegen humanes COX-2 für unsere Studie verwendet und kamen zu demselben Ergebnis [49, 64]. Merati et al., der keine Korrelation mit dem Überleben feststellen konnte, hat im Vergleich dazu einen polyklonalen Antikörper benutzt [66]. Hermanova et al. konnte in seiner Studie, in der er mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gearbeitet hat, auch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen einer COX-2-Expression und dem Überleben von Pankreaskarzinompatienten feststellen [37]. Um die Bedeutung der angewendeten Antikörper zu testen, untersuchte Hermanova et al. die COX-2-Expression in Pankreastumoren mit dem monoklonalen Antikörper, den auch Matsubayashi et al. und Juuti et al. benutzt hatten [38, 49, 64]. Mit diesem monoklonalen Antikörper konnte dann eine signifikante Korrelation zwischen dem COX-2-Status und dem krankheitsfreiem Überleben festgestellt werden; das bedeutet, Patienten mit COX-2 positiven Tumoren zeigten ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben [38]. Unser Kollektiv konnte durch die übereinstimmenden Ergebnisse mit Matsubayashi et al. und Juuti et al., bezüglich der Korrelation einer COX-2-Expression im Pankreaskarzinom mit einer schlechteren Prognose, bestätigt werden. Allerdings war COX-2 in unserer Studie in der multivariaten Analyse (Cox-Regression) kein unabhängiger prognostischer Marker im Gegensatz zu den Studien von Matsubayashi et al. und Juuti et al. [49, 64].

## 4.4 Bcl-2

In unserer Studie waren alle Pankreaskarzinom-Gewebeproben und die sich zum Teil darin befindenden PanIN-Läsionen, bis auf eine, Bcl-2 negativ. Die Funktionalität des verwendeten Antikörpers war gegeben, da die kleinen B-Lymphozyten, die sich in jeder Probe befanden, eine starke Anfärbung zeigten und dieser Antikörper schon seit Jahren in der pathologischen Routinediagnostik der Universitätsklinik Ulm verwendet wird. In der Literatur gibt es widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Bedeutung des Apoptose-regulierenden Proteins Bcl-2 im Pankreaskarzinom. Es gibt Studien, die eine positive Korrelation zwischen einer Bcl-2-Expression und dem Überleben nach Pankreastumorresektion zeigen [62, 69, 85, 90], andere wiederum geben keine oder eine negative Korrelation an

[12, 28, 71]. Evans et al. konnte, analog zu unseren Ergebnissen, keine Bcl-2-Expression in Pankreaskarzinomzellen feststellen [23]. Unsere Ergebnisse weisen im Zusammenhang mit den nicht übereinstimmenden Aussagen anderer Untersuchungen darauf hin, dass das Apoptose-regulierende Protein Bcl-2 keine prognostische Relevanz beim Pankreaskarzinom hat.

## 4.5 c-FLIP

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das Expressionsniveau des zellulären FLICE-inhibitory-Proteins (c-FLIP) ein wertvoller prognostischer Biomarker für duktale Adenokarzinome des Pankreas ist. Patienten, deren Pankreaskarzinomzellen keine c-FLIP-Expression aufwiesen, hatten eine signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich mit Patienten, die c-FLIP positiv waren. Auch in der multivariaten Analyse (Cox-Regression) zeigte sich die c-FLIP-Expression als unabhängiger prognostischer Marker in Bezug auf das Gesamtüberleben der Patienten mit resektablen duktalen Adenokarzinomen des Pankreas. Diese Ergebnisse wurden in einer klar definierten Pankreaskarzinom-Kohorte festgestellt, welche im Hinblick auf pathologische und klinische Parameter mit einer Fülle von internationalen pankreatischen duktalen Adenokarzinom-Kohorten übereinstimmt [12, 38, 49, 52, 64, 86].

Das zelluläre FLICE-inhibitory-Protein ist ein Apoptose-regulierendes Protein welches laut Safa et al. antiapoptotische Funktionen ausübt [80]. Es konnte gezeigt werden, dass durch Suppression von sowohl c-$FLIP_L$ als auch c-$FLIP_S$ Pankreaskarzinomzellen in TRAIL- oder CD95-ausgelöste Apoptose getrieben werden können [31]. Neue Studien zeigen jedoch, dass c-FLIP auch Apoptose-aktivierende Wirkung haben kann, abhängig von, z.B. der Isoform, dem Expressionsniveau sowie dem jeweiligen Zelltodstimulus [15, 56, 80]. Die Aktivierung der Caspase 8 kann durch ein hohes Expressionsniveau von c-$FLIP_L$ blockiert werden [56], wobei physiologische Expressionslevels von c-$FLIP_L$ die Oligomerisierung und autoproteolytische Verarbeitung der Caspase 8 initiieren können [15]. Auch für c-$FLIP_S$ konnte gezeigt werden, dass es nicht nur in

antiapoptotischen Signalwegen eine Rolle spielt, sondern ebenfalls als ein Verstärker des Zelltodes fungieren kann. In neusten Untersuchungen stellte sich heraus, dass c-FLIP$_S$ Nekroptose, in Reaktion auf Toll-like-Rezeptor 3 Stimulation durch die Formation eines zytosolischen Komplexes aus RIP1, FADD und Caspase 8, fördern kann [26]. Somit ist das Ergebnis dieser Studie, dass das Fehlen von c-FLIP ein Indikator für eine schlechte Prognose ist, im Einklang mit der neuen Auffassung, dass c-FLIP sowohl antiapoptotische als auch proapoptotische Funktionen, abhängig vom molekularem Umfeld, haben kann. Die vollständige c-FLIP-Negativität der duktalen Adenokarzinome, welche sich in dieser Studie als neuen Indikator für sehr schlechtes Gesamtüberleben herausgestellt hat, könnte ein Überlebensvorteil der Pankreaskarzinomzellen sein, um den c-FLIP-induzierten Zelltod zu umgehen. Es herrscht sehr wahrscheinlich ein unterschiedliches Tumorzellmilieu in vivo im Vergleich mit dem Milieu in Zellkultur-Modellen. Dies könnte die verschiedenen Funktionen von c-FLIP in vivo und in vitro, wie z.B. die antiapoptotischen Eigenschaften von c-FLIP in Pankreaskarzinomzelllinien, erklären [31].

Im Moment gibt es nur eine geringe Anzahl an Studien, die die c-FLIP-Expression und dessen Korrelation mit klinisch-pathologischen Eigenschaften von Neoplasien untersuchen. Im malignen Melanom wurde z.B. eine erhöhte c-FLIP-Expression im Vergleich mit der Expression in benignen Pigmentnävi gefunden [10, 93]. Interessanterweise korrelierten die Expressionslevels mit der Tiefe der Invasion des Melanoms und dem Ki-67 Proliferationsindex [93]. In einer Untersuchung am Ovarialkarzinom von Duiker et al. konnte eine c-FLIP-Expression in ca. 84% der Fälle nachgewiesen werden, jedoch ohne Korrelation mit dem Überleben [21]. Im diffus großzelligen B-Zell-Lymphom wurde eine Expression von c-FLIP in ~58% der Fälle gezeigt. Auch hier konnte keine Korrelation mit klinischen, laborchemischen oder immunhistochemischen Parametern wie CD95, Caspase 3, XIAP, Survivin und Bcl-2 festgestellt werden [63]. In der kolorektalen Mukosa wurde c-FLIP in den Epithelzellen der Krypten nachgewiesen [65]. Im Vergleich mit der normalen Mukosa konnte beim kolorektalen Karzinom eine erhöhte c-FLIP-Expression in bis zu 84% der Fälle und eine erniedrigte Expression in 11% festgestellt werden [65, 78]. In der Studie von McLornan et al. konnte die erhöhte

c-FLIP-Expression mit verkürztem rezidivfreien Überleben, jedoch keiner Änderung des Gesamtüberlebens, in Verbindung gebracht werden [65].
Unser Ergebnis, dass eine c-FLIP-Negativität der pankreatischen Adenokarzinomzellen ein unabhängiger Indikator für sehr kurzes Gesamtüberleben ist, unterstützt die neue These, dass viele Apoptose-regulierende Moleküle, abhängig vom molekularen Milieu, sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Funktionen ausüben können. Dies impliziert, dass die prognostische Signifikanz von Apoptose-regulierenden Proteinen in Zukunft Tumor- und Kontext-spezifisch untersucht werden muss.

## 4.6 Weitere prognostische Marker

Die Diskussion der Ergebnisse der prognostischen Marker Ki-67, Cyclin E und p16 ist Gegenstand der Dissertation von Marie-Charlotte Glatzel.

# 5 Zusammenfassung

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas ist immer noch eine der aggressivsten und tödlichsten Tumorarten der Menschheit. Die schlechte Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von nur 6% nach Diagnosestellung hat sich auch nach Einführung neuer Chemotherapeutika und Verbesserung von Operationstechniken in den letzten 20 Jahren nur geringfügig verbessert. Daher die Suche nach neuen Behandlungsmöglichkeiten auf molekulargenetischer Ebene um mit diesen „target therapies“ Pankreaskarzinompatienten eine bessere Überlebenschance bieten zu können.

Das Ziel dieser Studie war ein prognostisch aussagekräftiges Protein in Pankreaskarzinomzellen zu finden, dessen Expressionsniveau signifikant mit dem Überleben von Pankreaskarzinompatienten korreliert. Zuerst untersuchten und bestätigten wir die prognostische Relevanz eines schon bekannten und therapeutisch benutzten Biomarkers, COX-2 (Cyclooxygenase-2), in unserem Pankreaskarzinom-Kollektiv um die Aussagekräftigkeit weiterer Ergebnisse zu untermauern. Unsere Ergebnisse, bezüglich der prognostischen Bedeutung von COX-2 im Pankreaskarzinom, stimmten mit mehreren anderen Studien überein und belegten somit die Aussage, dass eine COX-2-Expression in Pankreaskarzinomzellen mit einer schlechten Prognose einhergeht.

Um die vielen widersprüchlichen Aussagen in Bezug auf die Bedeutung von Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) im Pankreaskarzinom zu klären, untersuchten wir in unserem nun bestätigten Kollektiv dessen Expression und prognostische Bedeutsamkeit. Wir konnten mit einem in der Routinediagnostik oft verwendeten Antikörper keine Expression von Bcl-2 in unseren Pankreaskarzinom-Gewebeproben finden und mussten in Zusammenschau mit den unstimmigen Ergebnissen vieler anderer feststellen, dass das Protein Bcl-2 keine prognostische Relevanz beim Pankreaskarzinom hat.

Unsere Suche nach einem neuen prognostischen Biomarker für das Pankreaskarzinom war erfolgreich. Das Apoptose-regulierende Protein c-FLIP

(zelluläres FLICE-inhibitory-Protein) erwies sich als unabhängiger prognostischer Marker in Bezug auf das Gesamtüberleben der Patienten mit resektablen duktalen Adenokarzinomen des Pankreas. Wir konnten zeigen, dass das Fehlen von c-FLIP ein Indikator für eine schlechte Prognose beim Pankreaskarzinom ist. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der neuen Ansicht, dass Apoptose-regulierende Moleküle, wie c-FLIP, sowohl antiapoptotische als auch proapoptotische Funktionen, abhängig von ihrem molekularen Umfeld, haben können. Man sollte daher die prognostische Signifikanz von Apoptose-regulierenden Proteinen in Zukunft Tumor- und Kontext-spezifisch untersuchen. Wir hoffen, dass diese Studie die weitere Erforschung des Proteins c-FLIP anregt, um dessen prognostische Relevanz beim Pankreaskarzinom zu bestätigen.

# 6 Literaturverzeichnis


1. Adler G, Seufferlein T, Bischoff S C, Brambs H J, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr J M, Lutz M P, Micke O, Neuhaus H, Neuhaus P, Oettle H, Schlag P M, Schmid R, Schmiegel W, Schlottmann K, Werner J, Wiedenmann B, and Kopp I: S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007. Z Gastroenterol 45: 487-523 (2007)
2. Ahlgren J D: Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer. Semin Oncol 23: 241-50 (1996)
3. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, and Perucho M: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. Cell 53: 549-54 (1988)
4. Ashkenazi A: Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. Cytokine Growth Factor Rev 19: 325-31 (2008)
5. Ashkenazi A, Holland P, and Eckhardt S G: Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). J Clin Oncol 26: 3621-30 (2008)
6. Bardeesy N and DePinho R A: Pancreatic cancer biology and genetics. Nat Rev Cancer 2: 897-909 (2002)
7. Baumgart M, Heinmoller E, Horstmann O, Becker H, and Ghadimi B M: The genetic basis of sporadic pancreatic cancer. Cell Oncol 27: 3-13 (2005)
8. Ben Q, Xu M, Ning X, Liu J, Hong S, Huang W, Zhang H, and Li Z: Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies. Eur J Cancer 47: 1928-37 (2011)
9. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman D T, Petersen G, Bracci P M, Ji B T, Negri E, Li D, Risch H A, Olson S H, Gallinger S, Miller A B, Bueno-de-Mesquita H B, Talamini R, Polesel J, Ghadirian P, Baghurst P A, Zatonski W, Fontham E, Bamlet W R, Holly E A, Bertuccio P, Gao Y T, Hassan M, Yu H, Kurtz R C, Cotterchio M, Su J, Maisonneuve P, Duell E J, Boffetta P, and La Vecchia C: Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis

from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). Ann Oncol (2011)

10. Bullani R R, Huard B, Viard-Leveugle I, Byers H R, Irmler M, Saurat J H, Tschopp J, and French L E: Selective expression of FLIP in malignant melanocytic skin lesions. J Invest Dermatol 117: 360-4 (2001)
11. Buskens C J, Van Rees B P, Sivula A, Reitsma J B, Haglund C, Bosma P J, Offerhaus G J, Van Lanschot J J, and Ristimaki A: Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in patients with adenocarcinoma of the esophagus. Gastroenterology 122: 1800-7 (2002)
12. Campani D, Esposito I, Boggi U, Cecchetti D, Menicagli M, De Negri F, Colizzi L, Del Chiaro M, Mosca F, Fornaciari G, and Bevilacqua G: Bcl-2 expression in pancreas development and pancreatic cancer progression. J Pathol 194: 444-50 (2001)
13. Cascinu S, Verdecchia L, Valeri N, Berardi R, and Scartozzi M: New target therapies in advanced pancreatic cancer. Ann Oncol 17 Suppl 5: v148-52 (2006)
14. Chan C C, Boyce S, Brideau C, Ford-Hutchinson A W, Gordon R, Guay D, Hill R G, Li C S, Mancini J, Penneton M, and et al.: Pharmacology of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745,337: a novel nonsteroidal anti-inflammatory agent with an ulcerogenic sparing effect in rat and nonhuman primate stomach. J Pharmacol Exp Ther 274: 1531-7 (1995)
15. Chang D W, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimnich A, Barnhart B C, Yaish-Ohad S, Peter M E, and Yang X: c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. EMBO J 21: 3704-14 (2002)
16. Chao D T and Korsmeyer S J: BCL-2 family: regulators of cell death. Annu Rev Immunol 16: 395-419 (1998)
17. Corsini M M, Miller R C, Haddock M G, Donohue J H, Farnell M B, Nagorney D M, Jatoi A, McWilliams R R, Kim G P, Bhatia S, Iott M J, and Gunderson L L: Adjuvant radiotherapy and chemotherapy for pancreatic carcinoma: the Mayo Clinic experience (1975-2005). J Clin Oncol 26: 3511-6 (2008)

18. De Nigris F, Balestrieri M L, and Napoli C: Targeting c-Myc, Ras and IGF cascade to treat cancer and vascular disorders. Cell Cycle 5: 1621-8 (2006)
19. Denkert C, Winzer K J, Muller B M, Weichert W, Pest S, Kobel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H, and Hauptmann S: Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. Cancer 97: 2978-87 (2003)
20. DeWitt D L and Meade E A: Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. Arch Biochem Biophys 306: 94-102 (1993)
21. Duiker E W, van der Zee A G, de Graeff P, Boersma-van Ek W, Hollema H, de Bock G H, de Jong S, and de Vries E G: The extrinsic apoptosis pathway and its prognostic impact in ovarian cancer. Gynecol Oncol 116: 549-55 (2010)
22. Efthimiou E, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine N R, and Brentnall T A: Inherited predisposition to pancreatic cancer. Gut 48: 143-7 (2001)
23. Evans J D, Cornford P A, Dodson A, Greenhalf W, Foster C S, and Neoptolemos J P: Detailed tissue expression of bcl-2, bax, bak and bcl-x in the normal human pancreas and in chronic pancreatitis, ampullary and pancreatic ductal adenocarcinomas. Pancreatology 1: 254-62 (2001)
24. Everhart J and Wright D: Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. JAMA 273: 1605-9 (1995)
25. Fearon E R and Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61: 759-67 (1990)
26. Feoktistova M, Geserick P, Kellert B, Dimitrova D P, Langlais C, Hupe M, Cain K, MacFarlane M, Hacker G, and Leverkus M: cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. Mol Cell 43: 449-63 (2011)
27. Ferretti G, Felici A, Papaldo P, Fabi A, and Cognetti F: HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. Curr Opin Obstet Gynecol 19: 56-62 (2007)

28. Friess H, Lu Z, Graber H U, Zimmermann A, Adler G, Korc M, Schmid R M, and Buchler M W: bax, but not bcl-2, influences the prognosis of human pancreatic cancer. Gut 43: 414-21 (1998)
29. Fulda S: Apoptosis pathways and their therapeutic exploitation in pancreatic cancer. J Cell Mol Med 13: 1221-7 (2009)
30. Fulda S and Debatin K M: Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Oncogene 25: 4798-811 (2006)
31. Haag C, Stadel D, Zhou S, Bachem M G, Moller P, Debatin K M, and Fulda S: Identification of c-FLIP(L) and c-FLIP(S) as critical regulators of death receptor-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. Gut 60: 225-37 (2011)
32. Hahn S A, Schutte M, Hoque A T, Moskaluk C A, da Costa L T, Rozenblum E, Weinstein C L, Fischer A, Yeo C J, Hruban R H, and Kern S E: DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. Science 271: 350-3 (1996)
33. Harris R C, McKanna J A, Akai Y, Jacobson H R, Dubois R N, and Breyer M D: Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. J Clin Invest 94: 2504-10 (1994)
34. Hasui K, Wang J, Tanaka Y, Izumo S, Eizuru Y, and Matsuyama T: Development of ultra-super sensitive immunohistochemistry and its application to the etiological study of adult T-cell leukemia/lymphoma. Acta Histochem Cytochem 45: 83-106 (2012)
35. Hengartner M O: The biochemistry of apoptosis. Nature 407: 770-6 (2000)
36. Herman J M, Swartz M J, Hsu C C, Winter J, Pawlik T M, Sugar E, Robinson R, Laheru D A, Jaffee E, Hruban R H, Campbell K A, Wolfgang C L, Asrari F, Donehower R, Hidalgo M, Diaz L A, Jr., Yeo C, Cameron J L, Schulick R D, and Abrams R: Analysis of fluorouracil-based adjuvant chemotherapy and radiation after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas: results of a large, prospectively collected database at the Johns Hopkins Hospital. J Clin Oncol 26: 3503-10 (2008)
37. Hermanova M, Karasek P, Nenutil R, Kyr M, Tomasek J, Baltasova I, and Dite P: Clinicopathological correlations of cyclooxygenase-2, MDM2, and

p53 expressions in surgically resectable pancreatic invasive ductal adenocarcinoma. Pancreas 38: 565-71 (2009)

38. Hermanova M, Karasek P, Tomasek J, Lenz J, Jarkovsky J, and Dite P: Comparative analysis of clinicopathological correlations of cyclooxygenase-2 expression in resectable pancreatic cancer. World J Gastroenterol 16: 1879-84 (2010)
39. Herold G, und Mitarbeiter: Pankreaskarzinom. In: Herold G (Hrsg) Innere Medizin, Köln, S. 478-479 (2009)
40. Hidalgo M: Pancreatic cancer. N Engl J Med 362: 1605-17 (2010)
41. Hochhaus A, O'Brien S G, Guilhot F, Druker B J, Branford S, Foroni L, Goldman J M, Muller M C, Radich J P, Rudoltz M, Mone M, Gathmann I, Hughes T P, and Larson R A: Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. Leukemia 23: 1054-61 (2009)
42. Hruban R H, Goggins M, Parsons J, and Kern S E: Progression model for pancreatic cancer. Clin Cancer Res 6: 2969-72 (2000)
43. Hsu S M, Raine L, and Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 29: 577-80 (1981)
44. Hu Y X, Watanabe H, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Ha A, Motoo Y, Okai T, and Sawabu N: Bcl-2 expression related to altered p53 protein and its impact on the progression of human pancreatic carcinoma. Br J Cancer 80: 1075-9 (1999)
45. Humphreys R C and Halpern W: Trail receptors: targets for cancer therapy. Adv Exp Med Biol 615: 127-58 (2008)
46. Ibrahim S M, Ringel J, Schmidt C, Ringel B, Muller P, Koczan D, Thiesen H J, and Lohr M: Pancreatic adenocarcinoma cell lines show variable susceptibility to TRAIL-mediated cell death. Pancreas 23: 72-9 (2001)
47. Janiak F, Leber B, and Andrews D W: Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes. J Biol Chem 269: 9842-9 (1994)
48. Jemal A, Siegel R, Xu J, and Ward E: Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 60: 277-300 (2010)

49. Juuti A, Louhimo J, Nordling S, Ristimaki A, and Haglund C: Cyclooxygenase-2 expression correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. J Clin Pathol 59: 382-6 (2006)
50. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Baras N, Barnes B, Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Laudi A, Wolf U, and Mitarbeiter: Krebs in Deutschland 2007/2008. In: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin, S. 11-51 (2012)
51. Kataoka T: The caspase-8 modulator c-FLIP. Crit Rev Immunol 25: 31-58 (2005)
52. Kawesha A, Ghaneh P, Andren-Sandberg A, Ograed D, Skar R, Dawiskiba S, Evans J D, Campbell F, Lemoine N, and Neoptolemos J P: 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 89: 469-74 (2000)
53. Khuri F R, Wu H, Lee J J, Kemp B L, Lotan R, Lippman S M, Feng L, Hong W K, and Xu X C: Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 7: 861-7 (2001)
54. Knudson A G, Jr.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A 68: 820-3 (1971)
55. Kroemer G, Galluzzi L, and Brenner C: Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev 87: 99-163 (2007)
56. Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer P H, and Kirchhoff S: Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. J Biol Chem 276: 20633-40 (2001)
57. Larsson S C, Giovannucci E, Bergkvist L, and Wolk A: Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15: 2561-4 (2006)
58. Larsson S C, Permert J, Hakansson N, Naslund I, Bergkvist L, and Wolk A: Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in

relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. Br J Cancer 93: 1310-5 (2005)

59. Lowenfels A B, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann R W, Lankisch P G, Andersen J R, Dimagno E P, Andren-Sandberg A, and Domellof L: Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. New England Journal of Medicine 328: 1433-1437 (1993)
60. Lu Q L, Abel P, Foster C S, and Lalani E N: bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. Hum Pathol 27: 102-10 (1996)
61. MacFarlane M and Williams A C: Apoptosis and disease: a life or death decision. EMBO Rep 5: 674-8 (2004)
62. Makinen K, Hakala T, Lipponen P, Alhava E, and Eskelinen M: Clinical contribution of bcl-2, p53 and Ki-67 proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. Anticancer Res 18: 615-8 (1998)
63. Markovic O, Marisavljevic D, Cemerikic V, Perunicic M, Savic S, Filipovic B, and Mihaljevic B: Clinical and prognostic significance of apoptotic profile in patients with newly diagnosed nodal diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Eur J Haematol 86: 246-55 (2011)
64. Matsubayashi H, Infante J R, Winter J, Klein A P, Schulick R, Hruban R, Visvanathan K, and Goggins M: Tumor COX-2 expression and prognosis of patients with resectable pancreatic cancer. Cancer Biol Ther 6: 1569-75 (2007)
65. McLornan D P, Barrett H L, Cummins R, McDermott U, McDowell C, Conlon S J, Coyle V M, Van Schaeybroeck S, Wilson R, Kay E W, Longley D B, and Johnston P G: Prognostic significance of TRAIL signaling molecules in stage II and III colorectal cancer. Clin Cancer Res 16: 3442-51 (2010)
66. Merati K, said Siadaty M, Andea A, Sarkar F, Ben-Josef E, Mohammad R, Philip P, Shields A F, Vaitkevicius V, Grignon D J, and Adsay N V: Expression of inflammatory modulator COX-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its relationship to pathologic and clinical parameters. Am J Clin Oncol 24: 447-52 (2001)
67. Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson D W, Briand C, and Grutter M G: The long form of FLIP is an activator of

caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. J Biol Chem 277: 45162-71 (2002)

68. Moghanaki D, Mick R, Furth E E, Sohal D, Salmon P M, Behbahani A, Morgans A K, Miller S M, Giantonio B J, Whittington R W, Haller D G, Rosato E F, and Plastaras J P: Resection status, age and nodal involvement determine survival among patients receiving adjuvant chemoradiotherapy in pancreatic adenocarcinoma. JOP 12: 438-44 (2011)
69. Nio Y, Dong M, Iguchi C, Yamasawa K, Toga T, Itakura M, and Tamura K: Expression of Bcl-2 and p53 protein in resectable invasive ductal carcinoma of the pancreas: effects on clinical outcome and efficacy of adjuvant chemotherapy. J Surg Oncol 76: 188-96 (2001)
70. Nio Y, Iguchi C, Yamasawa K, Sasaki S, Takamura M, Toga T, Dong M, Itakura M, and Tamura K: Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax proteins in invasive ductal carcinoma of the pancreas. Pancreas 22: 230-9 (2001)
71. Ohshio G, Suwa H, Imamura T, Yamaki K, Tanaka T, Hashimoto Y, and Imamura M: An immunohistochemical study of bcl-2 and p53 protein expression in pancreatic carcinomas. Scand J Gastroenterol 33: 535-9 (1998)
72. Patel A V, Rodriguez C, Bernstein L, Chao A, Thun M J, and Calle E E: Obesity, recreational physical activity, and risk of pancreatic cancer in a large U.S. Cohort. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14: 459-66 (2005)
73. Patrono C: Aspirin as an antiplatelet drug. N Engl J Med 330: 1287-94 (1994)
74. Pellegata N S, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone B E, Solcia E, and Ranzani G N: K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. Cancer Res 54: 1556-60 (1994)
75. Qureshi A, Hassan U, and Azam M: Morphology, TNM staging and survival with Pancreatico-duodenectomy specimens received at Shaukat Khanum Memorial Cancer Hospital and Research Centre, Pakistan. Asian Pac J Cancer Prev 12: 953-6 (2011)

76. Redston M S, Caldas C, Seymour A B, Hruban R H, da Costa L, Yeo C J, and Kern S E: p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. Cancer Res 54: 3025-33 (1994)
77. Ruzicka T and Printz M P: Arachidonic acid metabolism in skin: a review. Rev Physiol Biochem Pharmacol 100: 121-60 (1984)
78. Ryu B K, Lee M G, Chi S G, Kim Y W, and Park J H: Increased expression of cFLIP(L) in colonic adenocarcinoma. J Pathol 194: 15-9 (2001)
79. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, and Vandenabeele P: Toxic proteins released from mitochondria in cell death. Oncogene 23: 2861-74 (2004)
80. Safa A R, Day T W, and Wu C H: Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. Curr Cancer Drug Targets 8: 37-46 (2008)
81. Schneider G and Schmid R M: Genetic alterations in pancreatic carcinoma. Mol Cancer 2: 15 (2003)
82. Scholzen T and Gerdes J: The Ki-67 protein: From the known and the unknown. Journal of Cellular Physiology 182: 311-322 (2000)
83. Schutte M, Hruban R H, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran S K, Moskaluk C A, Hahn S A, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin S B, Kern S E, and Herman J G: Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. Cancer Res 57: 3126-30 (1997)
84. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, and Isakson P: Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 12013-7 (1994)
85. Sinicrope F A, Evans D B, Leach S D, Cleary K R, Fenoglio C J, Lee J J, and Abbruzzese J L: bcl-2 and p53 expression in resectable pancreatic adenocarcinomas: association with clinical outcome. Clin Cancer Res 2: 2015-22 (1996)
86. Skalicky D A, Kench J G, Segara D, Coleman M J, Sutherland R L, Henshall S M, Musgrove E A, and Biankin A V: Cyclin E expression and

outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15: 1941-7 (2006)

87. Smith W L and Dewitt D L: Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. Adv Immunol 62: 167-215 (1996)
88. Smith W L, Garavito R M, and DeWitt D L: Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. J Biol Chem 271: 33157-60 (1996)
89. Sohn T A, Yeo C J, Cameron J L, Koniaris L, Kaushal S, Abrams R A, Sauter P K, Coleman J, Hruban R H, and Lillemoe K D: Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. J Gastrointest Surg 4: 567-79 (2000)
90. Sun C Y, Wang B L, Hu C Q, Peng R Y, Gao Y B, Gu Q Y, and Wang D W: Expression of the bcl-2 gene and its significance in human pancreatic carcinoma. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 1: 306-8 (2002)
91. Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Olakowski M, Lampe P, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, and Malecka-Panas E: Role of cyclooxygenase-2 gene polymorphisms in pancreatic carcinogenesis. World J Gastroenterol 17: 4113-7 (2011)
92. Thun M J, Namboodiri M M, and Heath C W, Jr.: Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. N Engl J Med 325: 1593-6 (1991)
93. Tian F, Lu J J, Wang L, Li L, Yang J, Li Y, Liu Y Q, Shen G X, Tu Y T, and Tao J: Expression of c-FLIP in malignant melanoma, and its relationship with the clinicopathological features of the disease. Clin Exp Dermatol 37: 259-65 (2012)
94. Trauzold A, Wermann H, Arlt A, Schutze S, Schafer H, Oestern S, Roder C, Ungefroren H, Lampe E, Heinrich M, Walczak H, and Kalthoff H: CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. Oncogene 20: 4258-69 (2001)
95. Vogelstein B and Kinzler K W: The multistep nature of cancer. Trends Genet 9: 138-41 (1993)
96. Vogelstein B and Kinzler K W: Cancer genes and the pathways they control. Nat Med 10: 789-99 (2004)

97. Vogler M, Walczak H, Stadel D, Haas T L, Genze F, Jovanovic M, Bhanot U, Hasel C, Moller P, Gschwend J E, Simmet T, Debatin K M, and Fulda S: Small molecule XIAP inhibitors enhance TRAIL-induced apoptosis and antitumor activity in preclinical models of pancreatic carcinoma. Cancer Res 69: 2425-34 (2009)

98. Walenga R W, Kester M, Coroneos E, Butcher S, Dwivedi R, and Statt C: Constitutive expression of prostaglandin endoperoxide G/H synthetase (PGHS)-2 but not PGHS-1 in hum an tracheal epithelial cells in vitro. Prostaglandins 52: 341-59 (1996)

99. Yamagata K, Andreasson K I, Kaufmann W E, Barnes C A, and Worley P F: Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. Neuron 11: 371-86 (1993)

100. Yeo T P, Hruban R H, Leach S D, Wilentz R E, Sohn T A, Kern S E, Iacobuzio-Donahue C A, Maitra A, Goggins M, Canto M I, Abrams R A, Laheru D, Jaffee E M, Hidalgo M, and Yeo C J: Pancreatic cancer. Curr Probl Cancer 26: 176-275 (2002)

101. Zamboni G, Capelli P, Pesci A, Beghelli S, Luttges J, and Kloppel G: Pancreatic head mass: what can be done? Classification: the pathological point of view. Journal of the Pancreas 1: 77-84 (2000)

102. Zhan Q, Kontny U, Iglesias M, Alamo I, Yu K, Hollander M C, Woodworth C D, and Fornace A J: Inhibitory effect of Bcl-2 on p53-mediated transactivation following genotoxic stress. Oncogene 18: 297-304 (1999)

# 7 Eigene Publikation

Schmid S J, Glatzel M C, Welke C, Kornmann M, Kleger A, Barth T F, Fulda S, Lennerz J K, and Möller P: Absence of FLICE-Inhibitory Protein Is a Novel Independent Prognostic Marker for Very Short Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Pancreas 42: 1114-9 (2013)

# 8 Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Möller für die wundervolle Betreuung und Unterstützung bei der Planung und Auswertung dieser Dissertation bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an Marie-Charlotte Glatzel für die gute Zusammenarbeit, die vielen interessanten Diskussionen, unsere Freundschaft und die zahlreichen vergnüglichen Stunden im gemeinsamen Laboralltag.

Ich möchte mich auch bei allen MitarbeiterInnen des Immunhistologie-Labors der Abteilung für Pathologie, vor allem Julia Kiedaisch, Iwona Nerbas, Dr. Ulrike Kostezka und Margit Rid, für ihre zeitintensive Hilfestellung und Anleitung bei der Laborarbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Marko Kornmann und der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Uniklinik Ulm sowie PD Dr. Alexander Kleger und der Klinik für Innere Medizin I der Uniklinik Ulm für die gute Zusammenarbeit. Frau Claudia Welke danke ich für ihre Hilfe bei der klinischen Datenakquirierung im Comprehensive Cancer Center Ulm. Herzlichen Dank auch an Dr. Jochen Lennerz für die Hilfestellung bei der Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Partner möchte ich an dieser Stelle für die liebevolle Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Allen hier nicht namentlich genannten Personen, die mir ebenfalls bei der Fertigstellung meiner Dissertation geholfen haben, sei herzlich gedankt.

# 9 Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt