

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

Stellenwert von Survivin als klinisch-pathologischer und  
prognostischer Marker im duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Shahrooz Babaei

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Krieg

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino

Für Sahar, meine Frau, und Saam, unseren Sohn.

Für Maryam und Ali, meine Eltern.

Ich danke euch für eure immerwährende Unterstützung!

## I. Zusammenfassung deutsch

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist eine Tumorentität mit einer weltweit hohen Prävalenz und Inzidenz, das trotz extensiver Forschung mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 7 bis 8 % vergesellschaftet ist. Survivin, ein Mitglied der *Inhibitor-of-Apoptosis*-Proteinfamilie, ist an der Regulation des Zellzyklus und des programmierten Zelltodes beteiligt und bietet sich als mögliches Ziel für eine alternative Therapie des Pankreaskarzinoms an. Es ist zudem in nahezu allen Tumorarten überexprimiert und könnte sich daher als prognostischer Marker eignen. Die Rolle von Survivin im Pankreaskarzinom wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Relevanz von Survivin als potenzieller Marker und Zielstruktur im duktalem Adenokarzinom des Pankreas untersucht.

Die Survivinexpression wurde in verschiedenen Tumorkompartimenten von 236 Patienten mittels Immunhistochemie an Tissue Microarrays analysiert und anhand eines immunreaktiven Scores quantifiziert. Es wurde hierbei zwischen der nukleären und zytoplasmatischen Survivinexpression differenziert. Anschließend wurde die Expression mit klinisch-pathologischen Parametern und den Überlebensdaten der Patienten korreliert.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikant erhöhte nukleäre und zytoplasmatische Survivinexpression im Tumorzentrum, der Tumordinvasionsfront, und Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe. In der Analyse mit klinisch-pathologischen Parametern zeigte sich eine signifikante Assoziation einer hohen Survivinexpression mit dem Tumorstadium, dem Auftreten von Fernmetastasen und einer Perineuralscheideninvasion.

Ein hohes Lebensalter zum Zeitpunkt der Operation, die Veneninvasion sowie ein R0-Resektionsstatus waren prognostische Faktoren für die kumulative Überlebensrate der Patienten in der multivariaten Überlebensanalyse. In der univariaten Subgruppenanalyse des Gesamtüberlebens korrelierte eine hohe zytoplasmatische Survivinexpression in der Tumordinvasionsfront signifikant mit dem Gesamtüberleben aller R0-resezierten Patienten, aller R0-reserzierter Patienten ohne Fernmetastasierung sowie von Patienten mit einem Pankreasschwanzkarzinom. Eine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben konnte in der multivariaten Analyse der Subgruppen für die nukleäre Survivinexpression im Tumorzentrum, in der Subgruppe der Pankreasschwanzkarzinome ermittelt werden. Die an die Analyse des Gesamtüberlebens

anschließende differenzierte Betrachtung des krankheitsfreien Überlebens konnte hingegen demonstrieren, dass eine hohe nukleäre Survivinexpression ein geeigneter prognostischer Faktor ist. Sowohl die univariate als auch die multivariate Analyse des krankheitsfreien Überlebens zeigten eine signifikante Korrelation zwischen einer hohen nukleären Survivinexpression und einer kürzeren krankheitsfreien Überlebensrate.

Diese Ergebnisse unterstreichen eine potenzielle Rolle von Survivin in der Onkogenese des duktales Adenokarzinoms des Pankreas. Eine erhöhte Survivinexpression deutet hierbei auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium und schlechteres tumorfreies Überleben der Patienten mit Pankreaskarzinom. Survivin könnte als Bestandteil einer multimodalen Therapie als Zielstruktur in der Therapie dieses Karzinoms zukünftig eine zunehmende Rolle spielen.

## II. Zusammenfassung englisch

The ductal adenocarcinoma of the pancreas is a tumor entity with a globally high prevalence and incidence and a poor prognosis and low 5-year survival rate despite continuous research efforts. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis protein family, is involved in the regulation of the cell cycle and programmed cell death and may therefore constitute a suitable target for alternative therapies for patients with pancreatic carcinomas. Moreover, it is overexpressed in most if not all tumor types and may serve as a prognostic marker. The role of survivin in pancreatic cancer remains controversial. In the present study, the relevance of survivin as a potential marker and target protein for the treatment of the ductal adenocarcinoma of the pancreas was therefore investigated.

Survivin expression was analyzed in different tumor compartments of 236 patients with immunohistochemistry using tissue microarrays and was quantified with an immunoreactive score. It was differentiated between nuclear and cytoplasmatic survivin expression. The expression levels were then correlated with clinicopathological parameters and the patients' survival rates.

The results show a significant elevation of both nuclear and cytoplasmatic survivin expression in the tumor center, the tumor invasive front, and in lymph node metastases compared to the adjacent non-tumorigenic tissue. An analysis of clinicopathological parameters revealed a significant association between a high survivin expression and the tumor grade as well as the incidence of distant and perineural metastases.

The patient's age at the time of surgery, venous invasion and an R0 resection status were prognostic factors for the cumulative patient survival in the multivariate survival analysis. A univariate subgroup analysis of overall survival revealed a significant correlation between a high cytoplasmatic survivin expression in the tumor invasion front and overall survival of all R0-resected patients, all R0-resected patients without distant metastases and those with a carcinoma of the pancreas tail. A significant correlation with overall survival was confirmed in the multivariate subgroup analysis for nuclear survivin expression in the tumor center only in the subgroup of pancreatic tail carcinoma.

The analysis of the disease-free survival that followed the analysis of overall survival demonstrated that high levels of nuclear survivin expression is a suitable prognostic factor. Univariate and multivariate analysis of the disease-free survival

demonstrated a significant correlation between a high nuclear survivin expression and a shorter disease-free survival period.

These results corroborate a potential role of survivin in the oncogenesis of the ductal pancreatic adenocarcinoma. An elevated expression of survivin indicates an advanced tumor stage and a shorter disease-free survival of patients with pancreatic cancer. Survivin might play an increasingly important role as a target in multimodal therapy approaches of this carcinoma.

### III. Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AIP	aryl hydrocarbon receptor-interacting protein
APAF1	apoptotischer Protease-aktivierender Faktor 1
BIR	baclovirus IAP Repeat
CAK	CDK-activating kinase
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
CDK	cyclin-dependent kinase
CPC	chromosomal passenger complex
EGFR	epidermal growth factor receptor
FAMMM	familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom
HBXIP	hepatitis B virus X-interacting protein
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IBM	IAP-binding motif
ILP-2	IAP-like Protein 2
INCENP	inneres Centromer-Protein
HNPCC	hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
MD-CT	Multidetector-Computertomografie
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikografie
MRT	Magnetresonanztomographie
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa beta
NOD	Nukleotid-Bindungs- und Oligomerisierungsdomäne mit ATPase-Aktivität
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasien

TAB1	TAK1-binding protein
TAK1	tumor growth factor beta activating kinase
TNFR	tumor necrosis factor receptor
UBA	ubiquitin-associated
UBC	ubiquitin-conjugating
UICC	Union International Contre Cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor
XIAP	X-linked IAP

## IV. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die vier Phasen des Zellzyklus.....	8
Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteinsequenzen der acht humanen IAP.....	14
Abb. 3: Mechanismen der Apoptose-Inhibition durch Survivin.....	19
Abb. 4: Repräsentative Bilder der Survivin-Färbungen im Tumorzentrum (links), in Lymphknotenmetastasen (Mitte) und im Pankreasnormalgewebe (rechts), 400× Vergrößerung. ....	29
Abb. 5: Nukleäre Survivinexpression [IRS] im Tumorzentrum, der Tumorinvasionsfront, in Lymphknotenmetastasen und im Normalgewebe. Die Survivinexpression ist sowohl im Tumor als auch in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Normalgewebe hochsignifikant erhöht (Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben; ***p < 0,001).....	30
Abb. 6: Zytoplasmatische Survivinexpression [IRS] im Tumorzentrum, der Tumorinvasionsfront, in Lymphknotenmetastasen und im Normalgewebe. Die Survivinexpression ist sowohl im Tumor als auch in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Normalgewebe hochsignifikant erhöht (Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben; ***p < 0,001). ....	31
Abb. 7: Korrelation der Survivinexpression [IRS] mit klinisch-pathologischen Parametern (UICC-Stadien). Eine erhöhte zytoplasmatische Survivinexpression korrelierte signifikant mit dem UICC-Tumorstadium (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test, *p < 0,05).....	32
Abb. 8: Korrelation der Survivinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern (Perineuralscheideninvasion Pn). Die zytoplasmatische Survivinexpression im Tumorzentrum und in der Tumorinvasionsfront war in Tumoren mit Perineuralscheideninvasion (Pn1) signifikant gegenüber solchen ohne Perineuralscheideninvasion (Pn0) erhöht (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test, *p < 0,05). ....	33
Abb. 9: Kaplan-Meier-Kurve der kumulativen Überlebensrate der Patienten in der Subgruppe „Alle Patienten, R0 reseziert“ relativ zu der zytoplasmatischen Survivinexpression [IRS]. Eine hohe zytoplasmatische Survivinexpression (IRS>4) korrelierte in der univariaten Überlebensanalyse der Subgruppen signifikant (p<0.05) mit einem kürzeren postoperativen Überleben. ....	39
Abb. 10: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der kumulativen Überlebensrate der Patienten in der Subgruppe Pankreasschwanzkarzinom relativ zu der zytoplasmatischen	

Survivinexpression [IRS]. Eine hohe zytoplasmatische Survivinexpression (IRS>4) korrelierte in der univariaten Überlebensanalyse der Subgruppen signifikant ( $p<0.05$ ) mit einem kürzeren postoperativen Überleben. ....	40
Abb. 11: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des krankheitsfreien Überlebens von Pankreaskarzinompatienten relativ zu der nukleären Expression von Survivin [IRS]. Eine hohe nukleäre Survivinexpression (IRS>4) korrelierte in der univariaten Überlebensanalyse signifikant mit einer kürzeren krankheitsfreien Überlebensdauer ( $p<0,05$ ).....	41

## V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation und UICC-Stadien der Tumoren des exokrinen Pankreas. .....	4
Tabelle 2: Schema zur Auswertung der HRP-Immunhistochemie anhand des IRS.....	25
Tabelle 3: Klinisch-pathologische Parameter der untersuchten Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas. ....	28
Tabelle 4: Korrelation zwischen nukleärer Survivinexpression und klinisch pathologischen Parametern von Adenokarzinomen des Pankreas. Berechnung der p-Werte erfolgte mittels Fisher's exact Test. ....	34
Tabelle 5: Korrelation zwischen zytoplasmatischer Survivinexpression und klinisch pathologischen Parametern von Adenokarzinomen des Pankreas. Berechnung der p-Werte erfolgte mittels Fisher's exact Test.....	35
Tabelle 6: Univariate und multivariate Analyse des Gesamtüberlebens zur Identifikation prädiktiver Faktoren für das Outcome von Patienten mit einem Adenokarzinom des Pankreas. ....	36
Tabelle 7: Univariate Subgruppenanalyse der Survivinexpression zur Bewertung von Survivin als prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben. ....	38
Tabelle 8: Multivariate Subgruppenanalyse der Survivinexpression zur Bewertung von Survivin als prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben. ....	38
Tabelle 9: Analyse des krankheitsfreien Überlebens von Pankreaskarzinom-patienten (n = 94). ....	41

## VI. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Pankreaskarzinom .....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.3	Pathologie und Pathogenese .....	2
1.1.4	Klinik und Therapie .....	5
1.2	Zellzyklus.....	8
1.3	Apoptose .....	11
1.4	Die Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-Familie .....	14
1.5	Survivin.....	16
1.6	Ziel der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Laborgeräte .....	21
2.2	Chemikalien .....	21
2.3	Puffer und Lösungen.....	21
2.4	Antikörper .....	22
2.5	Einwegartikel und Plastikwaren.....	22
2.6	Patientenkohorte.....	22
2.7	Tissue Microarrays.....	23
2.8	Immunohistochemie .....	23
2.8.1	Testfärbungen .....	23
2.8.2	Durchführung der HRP-Immunhistochemie.....	23
2.8.3	Auswertung der Färbungen.....	24
2.9	Statistische Datenanalyse .....	25
3	Ergebnisse .....	27
3.1	Patientenselektion und klinisch-pathologische Parameter .....	27

3.2	Survivinexpression im duktalem Adenokarzinom des Pankreas .....	29
3.2.1	Histologische Untersuchung der Survivinexpression .....	29
3.2.2	Quantitative Expressionsanalyse .....	29
3.3	Korrelation der Survivinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern.	31
3.4	Korrelation der Survivinexpression mit den Überlebensdaten .....	35
4	Diskussion.....	42
4.1	Survivin als Marker für die Progression des duktalem Adenokarzinoms des Pankreas .....	42
4.2	Survivin als prognostischer Prädiktor für Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas .....	44
4.3	Bedeutung in der Perineuralscheideninvasion .....	47
4.4	Inhibition von Survivin als Therapie des duktalem Pankreasadenokarzinoms.	48
5	Schlussfolgerung.....	50
	Literaturverzeichnis .....	52

# **1 Einleitung**

## **1.1 Pankreaskarzinom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Das Pankreaskarzinom gilt als eines der aggressivsten Malignome des Menschen mit einer der schlechtesten Prognosen (5-Jahres-Überlebensrate von etwa 8 %) [1]. Auf der Liste der krebsbedingten Todesursachen steht das Pankreaskarzinom weltweit an vierter Stelle [2]. Im Jahr 2014 lag die Inzidenz in Deutschland bei 10,4 bis 13,9 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen und wird auf etwa 17.000 Patienten pro Jahr geschätzt [3]. Die Mehrheit der Patienten weist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein höheres Alter auf, mit einem mittleren Erkrankungsalter von 70 Jahren für Männer und 76 Jahren für Frauen [4], bei etwa gleicher Verteilung von betroffenen Männern und Frauen. Eine Diagnose im Alter von unter 40 Jahren ist selten und betrifft nur 5 bis 10 % aller Fälle [5, 6]. Gerade in den frühen Stadien ist ein Pankreaskarzinom häufig asymptomatisch und wird daher erst spät diagnostiziert, was wiederum die hohe Sterblichkeitsrate bedingt. Frühe Metastasierungen werden zu spät erkannt und onkologische Resektionen können daher nicht mehr zu einem kurativen Therapieerfolg führen [2]. Das kumulative Lebenszeitrisiko, einen Pankreastumor zu entwickeln, liegt bei 1 %.

### **1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren**

Neben demografischen Faktoren gelten Nikotinabusus, Adipositas und ein sedentärer Lebensstil als gesicherte Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom [5, 7] sowie eine chronische Pankreatitis [8] und ein bereits lange bestehender Diabetes mellitus [9]. Eine genetische Komponente wird in etwa 5 bis 10 % aller Fälle vermutet, und Studien belegen ein vermehrtes Auftreten von Pankreaskarzinomen in bestimmten Familien, sodass die Ätiologie eine Einteilung in eine sporadische und eine familiäre Form erlauben sollte [10]. Man spricht von der familiären Form, wenn für zwei Verwandte ersten Grades eine histologisch gesicherte Diagnose vorliegt. Die zugrunde liegenden Gene, die zu einer erhöhten Suszeptibilität führen, sind in den meisten Fällen nicht bekannt [11]. Das Chancenverhältnis (Odds Ratio) liegt bei einem diagnostizierten Verwandten ersten Grades bei 2,1 bis 5,3 und einem relativen Risiko von 1,5 bis 1,7 [12, 13]. Das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, steigt mit zunehmender Anzahl der bereits

erkrankten nahen Verwandten, mit einem geschätzten 4,5-fachen Risiko bei einem diagnostizierten Verwandten ersten Grades, einem 6,4-fachen Risiko bei zwei Verwandten ersten Grades und einem 32-fachen Risiko bei drei oder mehr Verwandten ersten Grades [11].

Es ist bekannt, dass bestimmte Erbkrankheiten für ein Pankreaskarzinom prädestinieren, beispielsweise die hereditäre Pankreatitis (*PRSSI*-Gen, 50-fach erhöhtes Risiko) [14], das Peutz-Jeghers-Syndrom (*STK11*-Gen, 30- bis 40-fach erhöhtes Risiko) [15], das familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanomsyndrom (FAMMM; *CDKN2A*-Gen, 10- bis 20-fach erhöhtes Risiko) [16], das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC; *MLH1*-, *MSH2*-, *MSH6*- und *PMS 2*-Gene, 4-fach erhöhtes Risiko) [17] sowie vererbare Mamma- und Ovarialkarzinome (*BRCA1*- und *BRCA2*-Gene, 1- bis 2-fach erhöhtes Risiko) [18, 19].

Im Jahr 1994 wurden erstmalig Keimbahnmutationen bzw. eine homozygote Deletion des Tumorsuppressorgens p16, welche maßgeblich zu der Entstehung des FAMMM beitragen, in Patienten mit familiärem Pankreaskarzinom nachgewiesen [20]. Es konnte gezeigt werden, dass das p16-Gen und die durch dieses Gen regulierten Signalwege in 82 % bzw. 98 % der untersuchten Pankreaskarzinompatienten inaktiv sind [21]. Weiterhin wurden Keimbahnmutationen in den *BRCA1*- und *BRCA2*-Genen, die insbesondere mit Mammakarzinomen in Verbindung gebracht werden, in Pankreaskarzinompatienten entdeckt. Träger dieser Mutationen unterliegen einem moderaten, 2- bis 8-fach erhöhten Risiko, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln [13], jedoch liegt ein deutlich höheres Risiko bei bestimmten Mutationen in diesen Genen vor [22, 23].

Aktuell wird der prozentuale Anteil der Patienten mit der familiären Ätiologie auf 3,5 % geschätzt.

### 1.1.3 Pathologie und Pathogenese

Die Mehrheit der Pankreaskarzinome (60 bis 70 %) ist im Pankreaskopf lokalisiert, und hier am häufigsten zwischen Pankreas- und Gallengang. Etwa 25 % der übrigen Tumoren entstehen im Korpus- oder Kaudabereich des Pankreas [24]. Sonderformen des Adenokarzinoms sind das Siegelringkarzinom, das muzinöse Adenokarzinom, das adenosquamöse Adenokarzinom und das pleomorph-riesenzellige Karzinom [24].

Makroskopisch zeichnet sich das duktales Adenokarzinom durch eine grau-gelbliche Färbung und eine unscharfe Begrenzung aus. Die Histopathologie zeigt überwiegend in

ein desmoplastisches Stroma eingebettete gangartige, atypische und adenoide Strukturen. Dieses Karzinom ist durch ein besonders aggressives Wachstum und eine frühe Metastasierung gekennzeichnet, das sich in der Infiltration des peripankreatischen Fettgewebes sowie einer perineuralen Invasion zeigt [24].

Die Klassifizierung von Pankreaskarzinomen in Tumorstadien erfolgt basierend auf ihrer Lokalisation und Histologie anhand der TNM-(Tumor-Nodus-Metastasen-) Klassifikation der *Union Internationale Contre Cancer* (UICC, Tabelle 1) [25]. Weitaus am häufigsten sind die malignen duktaalen Adenokarzinome. In diese Kategorie fallen 95 % aller Neoplasien. Seltener treten Zystadenokarzinome und azinäre Tumore sowie Tumore des endokrinen Pankreasgewebes auf [24]. Adenokarzinome sind hierbei mit der schlechtesten Prognose verbunden, da Tumore in dieser Kategorie typischerweise schnell wachsen und früh metastasieren, während solche in anderen Kategorien durch ein vergleichsweise langsames und lokales Wachstum charakterisiert sind.

Entsprechend des morphologischen Progressionsmodells von Hruban et al. beginnt die Entwicklung epithelialer Malignome mit mehreren Vorläuferstadien, sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) [26, 27]. Diese Progression konnte bereits für das kolorektale Karzinom [28], das Zervixkarzinom [29], das Prostatakarzinom [30] und das duktaale Mammakarzinom [31] demonstriert werden. Maligne Transformationen des duktaalen Pankreasepithels beinhalten hyperplastische muzinöse bis papillär muzinöse Veränderungen, mit für Karzinome typischen Hyperchromasien und nukleären Pleomorphismen aufgrund von genetischen Defekten [32].

PanIN Läsionen werden anhand ihres Progressionsstadiums und ihres Dysplasiegrades als benigne Neoplasie (PanIN IA), papilläre, flache Epithelläsionen mit geringgradigen (PanIN IB) oder mittelgradigen (PanIN II) Dysplasien (letztere mit Zellkernatypien) oder nichtinvasives Karzinom (PanIN III) klassifiziert [33].

<b>T – Primärtumor</b>			
T0	Kein Primärtumor nachweisbar		
Tis	Carcinoma in situ/PanIN3		
T1	Tumor $\leq 2$ cm in größter Ausdehnung		
T1a	Tumor $\leq 0,5$ cm in größter Ausdehnung		
T1b	Tumor $> 0,5$ cm, $\leq 1$ cm in größter Ausdehnung		
T1c	Tumor $> 1$ cm, $\leq 2$ cm in größter Ausdehnung		
T2	Tumor $> 2$ cm, $\leq 4$ cm in größter Ausdehnung		
T3	Tumor $> 4$ cm in größter Ausdehnung		
T4	Tumor infiltriert <i>Truncus coeliacus</i> , <i>A. hepatica communis</i> oder <i>A. mesenterica superior</i>		
<b>N – Regionale Lymphknotenmetastasen</b>			
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen		
N1	1 -3 regionäre Lymphknotenmetastasen		
N2	$\geq 4$ regionäre Lymphknotenmetastasen		
<b>M – Fernmetastasen</b>			
M0	Keine Fernmetastasen		
M1	Metastasen		
<b>Stadieneinteilung</b>			
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1, T2, T3	N1	M0
III	T1, T2, T3	N2	M0
	T4	Jedes N	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation und UICC-Stadien der Tumoren des exokrinen Pankreas.**

(Quelle: adaptiert von [34, 35])

Die aus einer Anhäufung genetischer Alterationen resultierende chromosomale Instabilität führt zur Tumorprogression. Die Gene mit häufig auftretenden Mutationen sind für das Pankreaskarzinom bereits gut untersucht. Das Onkogen *KRAS* ist das Gen mit den im Vergleich zu anderen Karzinomen häufigsten Mutationen ( $> 90$  %). Eine

Mutation im Codon 12 dieses Gens resultiert in einem Austausch der Aminosäure Glycin durch Valin oder Arginin in der durch *KRAS*-kodierte GTPase, was zu einer unkontrollierten Aktivierung dieses G-Proteins führt. Diese aktivierende Mutation wird als Auslöser der Pankreaskarzinogenese betrachtet.

Es ist weiterhin bekannt, dass mehrere Tumorsuppressorgene im Pankreaskarzinom inaktiviert sind. Ein Beispiel ist das Tumorsuppressorgen *CDKN2* (auch p16, p16 INK4 oder *MTS1* genannt), welches in der Pankreaskarzinogenese durch biallelische Deletion, Hypermethylierung des Promoters oder Verlust der Heterozygotie inaktiviert ist [36]. *CDKN2* codiert für das INK-Protein p16 und gehört zu sogenannten Zellzyklus-Kontrollgenen. Es reguliert im Zellzyklus die Aktivität der Kinasen 4 und 6 und somit die frühe G1-Phase, in der DNA-Replikation und Mitose alternieren.

Weitere beim Adenokarzinom des Pankreas inaktivierte Tumorsuppressorgene sind p53, *Smad4/DPC4*, TGF- $\beta$ -Rezeptor-II, *BRCA-2* und *LKB1/STK11* [24]. p53 leitet die Apoptose von Zellen mit irreparablen DNA-Schäden ein. Eine chromosomale Instabilität resultiert aufgrund von akkumulierenden DNA-Schäden aus der Inaktivierung dieses Gens. *Smad4/DPC4* vermittelt TGF- $\beta$ -abhängige Signalwege, durch die epitheliales Wachstum reguliert wird; die Deletion oder Mutation des *Smad4*-Gens ist mit der Malignität des Pankreaskarzinoms assoziiert. Die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Rezeptors-II ist der Auslöser für Signalwege, die sowohl das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung als auch die Apoptose initiieren. *BRCA-2* ist in die Reparatur von Doppelstrangbrüchen involviert und Mutationen in diesem Gen sind mit einem höheren Pankreaskarzinom-Risiko assoziiert. Die Serine/Threonine-Proteinkinase *LKB1/STK11* vermittelt apoptotische Signalwege und unterdrückt ein unkontrolliertes Zellwachstum.

Diese Genmutationen werden entsprechend dem Zeitpunkt ihres Auftretens in frühe (z. B. *KRAS*), intermediäre (z. B. p16, *CDKN2A*) und späte (z. B. *BRCA2*) Mutationen unterteilt.

#### **1.1.4 Klinik und Therapie**

Ein Pankreaskarzinom wird häufig in einem fortgeschrittenen lokalen oder bereits metastasierenden Stadium diagnostiziert, da selten Frühsymptome auftreten. Klinische Symptome manifestieren sich typischerweise unspezifisch und begründen sich durch die Lokalisation eines Pankreastumors. Sie beinhalten Bauchschmerzen, Rückenschmerzen, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust, Ikterus, Übelkeit sowie Asthenie [37]. Bei

Tumoren im Pankreaskopf kommt es zu einem Ikterus, der zu Pruritus, dunkel verfärbtem Urin und acholischem Stuhl führt. Entsteht der Tumor aber im Pankreaskorpus oder der Pankreascauda, treten oft unspezifischere Symptome wie Schmerzen und Verlust des Körpergewichts auf. Etwa die Hälfte der Pankreaskarzinompatienten wurde mit einem Diabetes mellitus diagnostiziert [9]. Ein Adenokarzinom des Pankreas metastasiert am häufigsten in den Bauchraum, die Leber und die Lunge.

Eine günstige Prognose ist nur mit einer frühen Diagnose verbunden, jedoch liegen bisher keine klinisch relevanten Screeningverfahren zur Früherkennung vor [38]. Entsprechend der aktuellen Leitlinie sollten neu aufgetretene Oberbauchschmerzen und ein schmerzloser Ikterus sofort durch eine weiterführende Diagnostik anhand von bildgebenden Verfahren abgeklärt werden [4]. Zunächst wird eine Sonografie des Oberbauchs durchgeführt, die allerdings nur begrenzt eine Beurteilung der Tumorausbreitung und Ausdehnung in umliegende Organe zulässt [39]. Für eine differenzierte Therapieentscheidung müssen daher komplexere Verfahren wie eine Multidetector-Computertomografie (MD-CT) mit biphasischem Kontrastmittelprotokoll oder eine Magnetresonanztomografie (MRT) mit Magnetresonanztomografie-Cholangiopankreatikografie (MRCP) herangezogen werden, um die Beeinträchtigung umliegender Organe und mögliche Fernmetastasen zu erkennen und die Optionen für eine Resektion des Tumors bewerten zu können [4, 37]. Vor Beginn einer palliativen Therapie kann die Diagnose durch eine endosonografisch gesteuerte Biopsieentnahme abgesichert werden [4].

Trotz intensiver Bemühungen auf dem Gebiet der Pankreaskarzinomforschung und trotz aller Verbesserungen der Pankreaschirurgie, mit einem deutlichem Anstieg der R0-Resektionen, ist die Prognose für Patienten über alle Krankheitsstadien hinweg mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5 % und einer mittleren Überlebensdauer von 4 bis 6 Monaten nach wie vor sehr schlecht [40].

Obwohl die diagnostischen Möglichkeiten in den letzten Jahren deutlich verbessert wurden, werden die meisten Pankreaskarzinome in einem späten Stadium diagnostiziert, sodass häufig zum Diagnosezeitpunkt lokal fortgeschrittene und nicht resektable oder bereits metastasierte Tumorstadien vorliegen, die einer operativen Therapie nicht mehr zugänglich sind, sodass in nur 10 bis 25 % der Fälle der Tumor noch operativ entfernt werden kann [41]. Aufgrund dieser häufig eingeschränkten Resektabilität haben sich in den letzten Jahren zunehmend multimodale Therapiekonzepte herauskristallisiert [4].

Eine Unterstützung der chirurgischen Resektion durch eine begleitende Chemotherapie verbessert die 5-Jahres-Überlebensrate nach Entfernung eines Tumors ohne Lymphknotenmetastasen auf etwa 15 bis 25 %, mit einer Überlebensdauer bei einem Median von 15 bis 20 Monaten [42-44]. Auch eine neoadjuvante Chemotherapie, auch in Kombination mit einer Bestrahlung, kann möglicherweise zu einem sogenannten Down-Staging in ein vorteilhafteres Stadium und in Folge zu einer Resektabilität führen [45]. Die Effektivität einer solchen Therapie ist allerdings zurzeit noch fraglich; in mehreren Studien konnte ihr kein signifikanter Nutzen nachgewiesen werden [43, 46, 47]. In den USA läuft derzeit eine randomisierte Studie, um die Wirksamkeit der adjuvanten Strahlentherapie zu analysieren (ClinicalTrials.gov Identifier NCT01013649).

Für Pankreaskarzinompatienten wurden chemotherapeutische Standardtherapien etabliert, die entweder aus einer alleinigen Anwendung von beispielsweise Gemcitabin bestehen, oder aber aus einer Kombinationstherapie von Gemcitabin mit nab-Paclitaxel oder einer FOLFIRINOX-Therapie [48-50]. Gemcitabin ist gut etabliert, mit einer 1-Jahres-Überlebensrate von 18 bis 20 Prozent [51]. Vor Kurzem wurde für Patienten mit einer Progression trotz bestehender Gemcitabin-Therapie eine Kombinationstherapie aus nanoliposomalem Irinotecan mit Fluoruracil und Leucovorin zugelassen [52].

Alternative, neuartige Therapieoptionen für Pankreaskarzinompatienten werden kontinuierlich entwickelt. Die *Targeted Therapy* ist ein solcher Ansatz und könnte eine Alternative zur Chemotherapie und Radiotherapie darstellen [53, 54]. Hierbei handelt es sich um eine pharmakologische Therapie, die gezielt einen Eingriff in definierte, molekulare Signalwege zum Ziel hat, insbesondere solche, die an der Zellproliferation, der Apoptose und der Angiogenese beteiligt sind. Zahlreiche derartige Substanzklassen sind bereits für die Klinik zugelassen. Hierzu zählen Cetuximab (Erbix®), ein Anti-EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Antikörper, Bevacizumab (Avastin®), ein Anti-VEGF (*vascular endothelial growth factor*)-Antikörper, und Sorafenib (Nexavar®), ein kombinierter VEGFR/Raf-Kinase-Inhibitor [53, 54]. Die Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase wird durch Erlotinib erreicht. Dieser Inhibitor ist seit 2007 in Kombination mit Gemcitabin bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom zugelassen [55].

Die klinische Studien-Datenbank *clinicaltrials.gov* listet derzeit 55 registrierte, aktive Phase-3-Interventionsstudien weltweit an erwachsenen Patienten mit Pankreaskarzinom [Suchkriterien: „*pancreatic cancer*“, „*adults*“, „*stage 3*“, „*actively recruiting/active/not yet recruiting/enrolling by invitation*“]. Hiervon befassen sich 38 Studien mit neuen



In der G1-Phase (auch postmitotische Phase oder Präsynthesephase genannt) werden Zellorganellen und das Zytosol synthetisiert, wodurch das Volumen der Zelle zunimmt. Außerdem findet hier die Synthese der Enzyme statt, die die DNA-Replikation katalysieren, sowie die der Histonproteine und mRNA.

In der S-Phase findet die Replikation der gesamten zellulären DNA statt. Sie resultiert in zwei identischen Chromatiden eines jeden Chromosoms.

In der G2-Phase (auch Prämitosephase oder Postsynthesephase genannt) findet die Proteinbiosynthese statt, die für die bevorstehende Zellteilung nötig ist.

Die Mitosephase beinhaltet die Teilung des Zellkerns (Karyogenese) sowie die anschließende Teilung der verbleibenden Zellbestandteile (Zytokinese). Die Karyogenese wird weiterhin in die Prophase, die Metaphase, die Anaphase und die Telophase gegliedert.

Die Prophase beginnt mit der Trennung der Zentrosome zur Vorbereitung auf die Separierung der DNA-Stränge durch Kondensation. Es folgt der Abbau der Zellkernhülle und die Ansammlung der Chromosomen in der Mitte der Zelle. Diese richten sich in der Metaphase in der Äquatorialebene zwischen den Zentrosomen aus. Die Kinetochoren der Chromosomen werden nun an beiden Seiten an den Spindelapparat gebunden und die Chromatiden in der Anaphase voneinander getrennt [57]. Die Spindelfasern verkürzen sich und befördern die Chromatiden jeweils zu einem der beiden Zentrosomen, sodass sich die Schwesterchromatiden nun an entgegengesetzten Polen der Zelle befinden. Mit der Telophase wird die Mitose abgeschlossen. Hier werden die neuen Kernhüllen der beiden Tochterfasern gebildet und die DNA-Stränge durch Kondensation getrennt [56, 57].

Der Erfolg des Zellzyklus hängt entscheidend von der vollständigen und fehlerfreien Synthese der DNA aus dem Genom der Mutterzelle ab. Der Zyklus wird daher durch verschiedene Restriktions- und Kontrollpunkte in jeder Phase überprüft und eventuell unterbrochen, wenn die Stabilität oder Integrität der DNA nicht gegeben ist [58].

Im G1/S-Kontrollpunkt werden die Integrität der zu replizierenden DNA sowie die intra- und extrazellulären Gegebenheiten überprüft. Diese Kontrolle trägt daher entscheidend zur Regulation der Zellproliferation und -differenzierung bei. Der Zellzyklus geht nur dann in die S-Phase über, wenn dieser Kontrollpunkt passiert werden kann. Ist das nicht der Fall, gehen die Zellen in die reversible G0-Phase über. Der Zellzyklus kann bei

entsprechender Stimulation (z. B. Wachstumsfaktoren) die G<sub>0</sub>-Phase verlassen und fortgesetzt werden [59]. Ohne eine derartige Stimulation wird der Zellzyklus abgebrochen und die Zellen unterlaufen die terminale Differenzierungsphase, die G<sub>T</sub>-Phase [56].

Der Übergang von der G<sub>2</sub>-Phase in die M-Phase unterliegt einer weiteren Kontrolle, bei der die vollständige DNA-Replikation überprüft wird. Ist die DNA geschädigt oder die Mitose nicht vollendet, wird der Zellzyklus entweder unterbrochen und die Schäden behoben oder abgebrochen und die Apoptose eingeleitet.

Die Komplettierung eines fehlerfreien Zellzyklus wird durch eine Reihe von spezialisierten Proteinen gewährleistet. Diese gehören insbesondere zwei Klassen von Proteinen an, den Cyclinen und den cyclinabhängigen Kinasen (CDKs) [60]. Acht verschiedene Cycline (A bis H) und neun CDKs (1 bis 9) wurden bereits beschrieben. Eine Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus wurde bereits für die Cycline A bis D und die CDKs 1, 2, 4 und 6 beschrieben. Die Cycline und CDKs koordinieren in eng miteinander verknüpften Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen jede Phase des Zellzyklus. Die Cycline bilden hierbei die regulatorischen, die CDKs die katalytischen Untereinheiten [57]. Die CDKs werden durch die Transkription und Lokalisation der Cycline reguliert sowie durch *CDK-activating kinases* (CAKs), die die CDKs in ihrem sogenannten „*activation loop*“ phosphorylieren und somit aktivieren. Für eine Inaktivierung der CDKs hingegen sorgen die Kinasen Myt1 und Wee1 durch entsprechende Phosphorylierungsmuster und die Proteine der CIP- oder der INK-Familie durch N-terminale Bindung an die CDKs [61, 62]. Derartige inaktivierende Phosphorylierungen können durch die Phosphatase der CDC25-Familie entfernt werden. Die Phosphorylierung der CDKs reguliert somit ihre Aktivität und ihre intrazelluläre Lokalisation und erlaubt den Einsatz von unterschiedlichen Cyclin-CDK-Komplexen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus.

Als Beispiel sei hier die Regulation des G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunktes genannt. In der G-Phase kommt es zu einer Interaktion zwischen Cyclin D und CDK4 oder CDK6, wodurch zelltypabhängig Cyclin E hochreguliert wird. Die Phosphorylierung von CDK2 führt wiederum zur Bildung des Cyclin E/CDK2-Komplexes, der den Übergang in die S-Phase reguliert [63, 64].

Ein weiteres Beispiel liefert die Regulation der Mitose-Einleitung. In der S-Phase kommt es zu einer Hochregulierung von Cyclin A und einer anschließenden Komplexbildung mit der replikationsregulierenden CDK2. Gegen Ende der S-Phase wird außerdem zunehmend Cyclin B synthetisiert. Sowohl Cyclin A als auch Cyclin B binden in der G2-Phase an CDK1 und initiieren hierdurch die Mitose [65, 66].

Kommt es im Zellzyklus zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen der DNA, läuft die Replikation in der S-Phase nicht mehr fehlerfrei ab und der Einbau geschädigter Basen kann zu Punktmutationen führen, oder die Replikation wird ganz unterbrochen. Ein gleichzeitiger Doppelstrangbruch im Schwesterchromatid hat einen Chromosomenbruch und eine unvollständige Weitergabe des genetischen Materials während der Mitose und letztendlich eine Entartung der Zelle oder den Zelltod zur Folge [67, 68]. Aus einem derartigen fehlerhaften Zellzyklus können eine genetische Instabilität und Krebs resultieren [69].

### 1.3 Apoptose

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein zellulärer Kontrollmechanismus, dessen Aufgabe darin besteht fehlerhafte Zellen zu beseitigen und dadurch die zelluläre Homöostase sicherzustellen [70]. In einer Zelle akkumulierte DNA-Schäden führen zur Vererbung von fehlerhaftem genetischem Material an die Tochterzelle und gefährden möglicherweise den gesamten Organismus, ebenso wie eine unkontrollierte Zellproliferation. Derartige Zellen werden durch die Apoptose beseitigt, um eine Tumorentstehung zu verhindern [71-73]. Die Apoptose ist somit ein präziser gesteuerter Vorgang, der fehlerhafte Zellen aktiv entfernt, ohne umliegende Zellen oder den Organismus als Ganzen zu beeinträchtigen. Sowohl interne Signale (z. B. oxidativer Stress, DNA-Schädigung, Entzug von Wachstumsfaktoren) als auch externe Signale (z. B. Zytostatika, Glucocorticoide, Gamma-Strahlung) können die Apoptose auslösen [74]. Prinzipiell sind drei verschiedene Wege beschrieben, die zur Induktion der Apoptose führen können: 1. der extrinsische, rezeptorabhängige Weg, 2. der intrinsische, mitochondriale Weg und 3. der GranzymB/PerforinA-Signalweg über zytotoxische T-Lymphozyten. Die ersten beiden Signalwege werden von den Caspasen, einer Gruppe von Cysteinproteasen, vermittelt, die durch ein katalytisch aktives Cystein die Spaltung ihrer Substrate auf der C-terminalen Seite von Aspartat bewirken. Sie liegen als inaktive Proenzyme vor und agieren entweder als Initiatorcaspasen (z. B. Caspasen 8, 9, und 10)

oder Effektorcaspasen (z. B. Caspasen 3, 6 und 7), die in hierarchischen Sequenzen durch ihre proteolytische Spaltung aktiviert werden [75].

Die Initiatorcaspasen werden nach ihrer Bindung an einen Adaptorproteinkomplex und anschließende Oligomerisierung aktiviert, welche eine Autoproteolyse und die Abspaltung ihrer Prodomäne bzw. die Prozessierung interner Linkersequenzen zur Folge hat. Die aktivierten Initiatorcaspasen können nun wiederum die Effektorcaspasen durch eine proteolytische Spaltung ihrer Linkerregion aktivieren.

Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor in der Plasmamembran initiiert. Daraufhin oligomerisieren die Rezeptoren und bilden einen Komplex, der über sogenannte Death Effector Domains die Initiatorcaspase 8 aktiviert [76].

Im Gegensatz dazu wird der intrinsische Signalweg durch intrazelluläre Signale, z. B. DNA-Schäden, reaktive Sauerstoffspezies oder onkogenen Stress, ausgelöst. Es kommt zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials, was wiederum zur Freisetzung mitochondrialer Proteine und dem Verlust der Atmungskette führt.

Proteine der Bcl-2-Familie vermitteln diese Prozesse; sie können entweder eine pro- oder antiapoptotische Wirkung haben. Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine setzen sich aus allen vier sogenannten BH-Domänen zusammen und lokalisieren an der äußeren Mitochondrienmembran. Im Gegensatz dazu besteht die proapoptotische Gruppe aus den Effektorproteinen Bax und Bak, die alle vier BH-Domänen besitzen, sowie aus den BH3-only-Proteinen (z. B. Bim/Bod, Bid und Bad), die nur die BH3-Domäne aufweisen. Die Effektorproteine werden abhängig von dem Gleichgewicht aus pro- und antiapoptotischen Proteinen aktiviert.

Zwei Modelle, die direkte und die indirekte Aktivierung, existieren derzeit für die Initiierung der intrinsisch ausgelösten Apoptose.

Bei der indirekten Aktivierung werden Bak und Bax von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen gebunden und somit inaktiviert, damit keine ungewollte Apoptose ausgelöst werden kann. Ein entsprechender Stimulus führt dann zur Aktivierung der proapoptotischen BH3-only-Proteine, die an die antiapoptotischen Regulatoren binden und somit die Freisetzung von Bak und Bax bewirken, was zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führt [75].

Beim Modell der direkten Aktivierung hingegen werden Bak und Bax direkt von BH3-only-Proteinen gebunden, welche auch an antiapoptotische Proteine binden, sodass diese Bak und Bax nicht inaktivieren können. Daraufhin wird Bax durch Bid aktiviert und bildet einen Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch Cytochrom C, der Mediator der Apoptose, aus dem mitochondrialen Intramembranraum freigesetzt werden kann [74]. Dieser „point of no return“ resultiert in der Unterbrechung der Atmungskette und als direkte Konsequenz in einem Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies im Zellinneren.

Die Apoptose schreitet von hier wie folgt fort: Cytochrom C interagiert mit dem zytoplasmatischen apoptotischer Protease-aktivierenden Faktor (Apaf1), einem Multidomänenprotein mit einer Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD), einer Nukleotid-Bindungs- und Oligomerisierungsdomäne mit ATPase-Aktivität (NOD) und einer WD-40-Domäne. Die Bindung von Cytochrom C an die WD-40-Domäne resultiert in der Hydrolysierung eines 2-desoxy-ATPs (dATP) in der NOD zu dADP. Dies bewirkt eine Änderung der Apaf1-Konformation und eine Oligomerisierung von sieben Apaf1/Cyt-C-Komplexen zum sogenannten Apoptosom [77]. Die CARD-Domänen dieser Komplexe binden nun an die Caspase 9, wodurch diese dimerisiert und aktiviert wird und die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 zur Folge hat [77].

Cytochrom C ist nicht der einzige aus den Mitochondrien freigesetzte Faktor: Der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) kann unabhängig von den Caspasen die Apoptose auslösen, und die Proteine Diablo/Smac binden zytosolische Caspase-Inhibitoren und unterstützen hierdurch die Apoptose [78, 79].

Die Aktivierung der Apoptose bewirkt eine deutliche morphologische Veränderung der betroffenen Zelle: Sie wird kompakt und weist eine Blasenbildung der Plasmamembran auf. Außerdem lösen sich interzelluläre Verbindungen zu benachbarten Zellen auf. Weiterhin steigt der Phosphatidylseringehalt der äußeren Schicht der Plasmamembran an, wodurch phagozytierende Zellen chemotaktisch angezogen werden [80]. Eine apoptotische Zelle weist einen kleinen, fragmentierten Zellkern auf. Die Veränderungen kulminieren in einer Kondensation des Chromatins und der DNA-Degeneration und letztendlich im Zerfall der gesamten Zelle in membranumhüllte Vesikel, die von Makrophagen und umliegenden Zellen phagozytiert werden [81].

Tumore haben Gegenmechanismen entwickelt, um diesem apoptotischen Zelltod zu entkommen. Hierzu zählen die Expression von Inhibitoren der Caspasen und anderer proapoptotischer Regulatoren und die Dysregulation der Proteine der Apoptose-Inhibitoren-Familie IAP [71, 82].

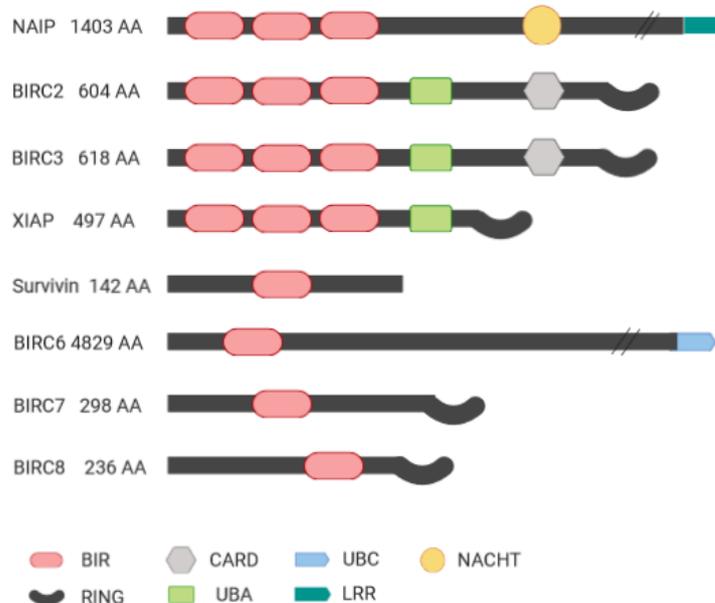
Diverse Malignome werden mit einer zytostatischen Therapie und/oder einer Strahlentherapie behandelt, welche beide gezielt DNA-Schäden und die Aktivierung der Apoptose bewirken [71]. Die tumoreigene Dysregulierung der Apoptose stellt jedoch für den Erfolg einer Chemotherapie ein entscheidendes Problem dar [74].

Die Charakterisierung der Apoptose und ihrer Inhibition in malignen Tumoren könnte den Weg für neue Therapiekonzepte ebnen und den Erfolg chemotherapeutischer Ansätze womöglich maßgeblich verbessern.

#### 1.4 Die Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-Familie

Die Proliferation, Migration und Metastasierung von Krebszellen sind eng mit der dysregulierten Apoptose in diesen Zellen verknüpft. Die Proteine der *Inhibitor of Apoptosis Protein* (IAP)-Familie tragen maßgeblich zu dieser Dysregulation bei [83].

Die Familie besteht derzeit aus acht beschriebenen Mitgliedern: XIAP, Survivin, NAIP/BIRC1, BIRC2, BIRC3, BIRC6/Apollon, BIRC7/ML-IAP und BIRC8/ILP-2 [84]. Abb. 2 zeigt die acht humanen IAP-Proteine im Vergleich.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteinsequenzen der acht humanen IAP.**

(Quelle: adaptiert von [84], Abbildung erstellt mit BioRender Software; <https://biorender.com/about>)

Die IAP-Proteine haben alle ein strukturelles Merkmal gemeinsam: die Baclovirus-IAP-Repeat (BIR)-Domäne. Sie besteht aus 70 Aminosäuren und kommt in jedem IAP ein- bis dreimal vor. Diese Domänen können direkt an Initiator- und Effektorcaspasen oder aber Inhibitoren der Caspasen (z. B. den Diablo/Smac-Komplex), die ein IAP-Binding-Motiv (IBM) haben, binden und somit die Apoptose inhibieren. Einige IAPs enthalten eine RING-Domäne, die E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität aufweist, sowie eine Caspase-activation-and-recruitment-Domäne (CARD) [85].

Als erstes Mitglied der IAP-Familie wurde das *neuronal apoptosis inhibitory protein* (NAIP), auch BIRC1 genannt, bei Untersuchungen der spinalen Muskelatrophie entdeckt [86]. NAIP enthält außerdem drei BIR-Domänen und eine NACHT-Domäne (*neuronal apoptosis inhibitory protein, CIITA [MHC class II transcription activator], HET-E [incompatibility locus protein from Podospora anserina], TP1 [telomerase-associated protein]*), die für die Familie der NOD-like-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems charakteristisch ist und diese als intrazelluläre Sensoren fungieren lässt [87]. Außerdem befindet sich am C-terminalen Ende eine Leucin-reiche Domäne, die die Komplexbildung mit anderen Proteinen wie NLRC4 erlaubt und zur Aktivierung der Caspase-1 führen kann [88].

BIRC2/cIAP1 und BIRC3/cIAP2 sind von ähnlicher Größe und weisen neben den BIR-Domänen auch eine CARD-Domäne, eine RING-Domäne und eine *ubiquitin-associated* (UBA)-Domäne auf. Diese IAPs wirken durch eine Hemmung des Tumor-necrosis-factor-receptor (TNFR)-Signalwegs und eine Bindung von *nuclear factor kappa beta* (NF- $\kappa$ B) an dessen BIR-Domäne antiapoptotisch [81, 89].

Das größte humane IAP ist mit 528 kDa BIRC6, auch Bruce oder Apollon genannt. Es besitzt eine BIR-Domäne und eine *ubiquitin-conjugating* (UBC)-Domäne, welche eine Interaktion mit konsekutiver Inhibition der Caspase 9 und von Diablo/Smac erlaubt [89, 90].

BIRC7/ML-IAP weist eine BIR-Domäne und eine RING-Domäne auf, die durch die Ubiquitynylierung von Smac dessen Abbau zur Folge hat [91].

BIRC8, auch als IAP-like Protein 2 (ILP-2) bezeichnet, wird im gesunden Organismus ausschließlich im Hoden exprimiert. Es enthält eine BIR-Domäne und blockiert durch seine Interaktion mit der Caspase 9 den intrinsischen Apoptose-Weg [92].

Das X-linked IAP (XIAP) weist drei BIR-Domänen und eine RING-Domäne auf und bindet als einziges IAP die Caspasen direkt [93, 94]. Durch die BIR2-Domäne wird eine Bindung an die Effektorcaspasen 3 und 7, durch die BIR3-Domäne an die Initiatorcaspase 9 ermöglicht und die Apoptose blockiert [93, 95, 96]. Ähnlich wie BIRC1 und 2 kann XIAP die Aktivität von NF- $\kappa$ B beeinflussen. Dieser Transkriptionsfaktor wiederum vermittelt die Expression von Inhibitoren der Apoptose und wirkt somit antiapoptotisch. XIAP bindet das TAK1-binding protein (TAB1) an seiner BIR1-Domäne, woraufhin TAB1 die TGF- $\beta$ -activating kinase (TAK1) aktiviert. Durch diese wird die *Inhibitor of NF- $\kappa$ B*-Kinase abgebaut und NF- $\kappa$ B aktiviert [97, 98].

Inhibitoren der IAPs konkurrieren mit den Caspasen um die Bindungsstellen in der BIR-Domäne. So kann z. B. Diablo/Smac an die BIR2- und BIR3-Domänen der IAPs binden, wodurch bereits gebundene Caspasen freigegeben werden und apoptotisch wirken können [83]. Diese Eigenschaften von Smac liegen den sogenannten „*Smac Mimetics*“ zugrunde, die dessen proapoptotische Wirkung imitieren und daher potenziell als Krebs-Therapeutika eingesetzt werden können.

Survivin ist gemeinsam mit XIAP das bekannteste IAP. Es bildet den Fokus der vorliegenden Arbeit und wird daher im Folgenden detaillierter beschrieben.

## 1.5 Survivin

Survivin ist mit 142 Aminosäuren und 16,5 kDa Molekulargewicht das kleinste Mitglied der IAP-Familie. Es enthält eine einzelne BIR-Domäne und anstelle der RING-Domäne anderer IAPs eine carboxyterminale  $\alpha$ -Helix [82, 99]. Survivin erfährt posttranslational erhebliche Modifikationen wie Phosphorylierungen, Ubiquitylierung und Acetylierung [99]. Die Phosphorylierung dieses Proteins trägt maßgeblich zu seiner Funktion bei [100].

Das Survivingen *BIRC5* ist auf Chromosom 17 lokalisiert (17q25) und erstreckt sich mit insgesamt 14.796 Nukleotiden über vier Exons und drei Introns [100]. Es codiert für zehn verschiedene Splicevarianten [101] mit unterschiedlichen, von der Tumorart abhängigen, Expressionsmustern [102-104]. In gesunden, adulten Geweben ist die Expression von Survivin niedrig und wurde vor allem in proliferierenden, hämatopoetischen Zellen nachgewiesen [105, 106]. Eine hohe Survivinexpression ist dagegen für fetales Gewebe [107] und verschiedene Tumorarten charakteristisch [108]. Hierdurch unterscheidet sich Survivin von seinen IAP-Familienmitgliedern, die ähnlichere Expressionsmuster in gesunden und neoplastischen Geweben aufweisen. Die Überexpression von Survivin in

malignen Geweben ist mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schlechteren Prognose vergesellschaftet [109-111]. Survivin gilt aus diesem Grund als hoffnungsvolle therapeutische Zielstruktur. Dies ist nicht zuletzt auf die beiden am besten beschriebenen Funktionen von Survivin zurückzuführen, die Förderung der Zellproliferation und die Inhibition der Apoptose [112].

Die Survivinexpression nimmt im Laufe des Zellzyklus kontinuierlich zu [113] und ist die Voraussetzung für den Übergang von der G2-Phase in die Mitose [114]. Während der Mitose bildet Survivin mit der Aurora B-Kinase, Borealin und dem inneren Centromer-Protein (INCENP) den sogenannten *chromosomal passenger complex* (CPC), der unabdingbar für die lineare Anordnung der Chromosomen am Äquator der Spindel ist [115, 116]. Hierbei bindet zytoplasmatisches Survivin direkt an die Mikrotubuli der Mitosespindel und stabilisiert den Spindelapparat [117]. Survivin ist subzellulär im Zellkern [118] und in den Mitochondrien [119] lokalisiert, wobei weder die Relevanz hiervon noch die genaue Relation zytoplasmatisch/nuklear/mitochondrial geklärt sind und anscheinend zelltypabhängig variieren [112, 120]. Es wird vermutet, dass nukleäres Survivin eine Rolle bei der Zellteilung spielt und zur Regulierung der Kontrollpunkte des Zellzyklus und dem Übergang von der G1 in die S-Phase beiträgt [121-123] Durch direkte Bindung an nichtmuskuläres Myosin II reguliert Survivin außerdem die Cytokinese [124].

Die Funktionen von Survivin sind in Abb. 3 dargestellt. Survivin vermittelt seine apoptoseinhibierende Wirkung nicht durch direkte Bindung an Caspasen, sondern durch die Komplexbildung mit XIAP und *hepatitis B virus X-interacting protein* (HBXIP) [125]. XIAP wird hierdurch stabilisiert und kann direkt an die Initiatorcaspase 9 binden und die Apoptose blockieren [95, 126]. Durch die Bindung an XIAP kann Survivin außerdem die Aktivierung von NFκB aktivieren und hierdurch die Tumordinvasion und Metastasierung induzieren [127]. Die Rolle der Interaktion zwischen XIAP und Survivin in der Regulierung der Tumorzellinvasion und Metastasierung wurde von Mehrotra et al in Adenokarzinomzellen der Brust (MDA-MB-231 und MCF-7) und Prostata (PC-3) untersucht [127]. Ein siRNA-vermittelter Knockdown von XIAP oder Survivin führte zu einer verminderten Zellinvasion durch Matrigel, während MCF-7-Zellen mit einer stabilen Überexpression von Survivin ein deutlich erhöhtes Migrations- und Invasionsverhalten zeigten. Die erhöhte Invasion dieser Zellen wurde wiederum durch siRNA-vermittelten Knockdown von XIAP und Survivin verringert. Weiterhin kann

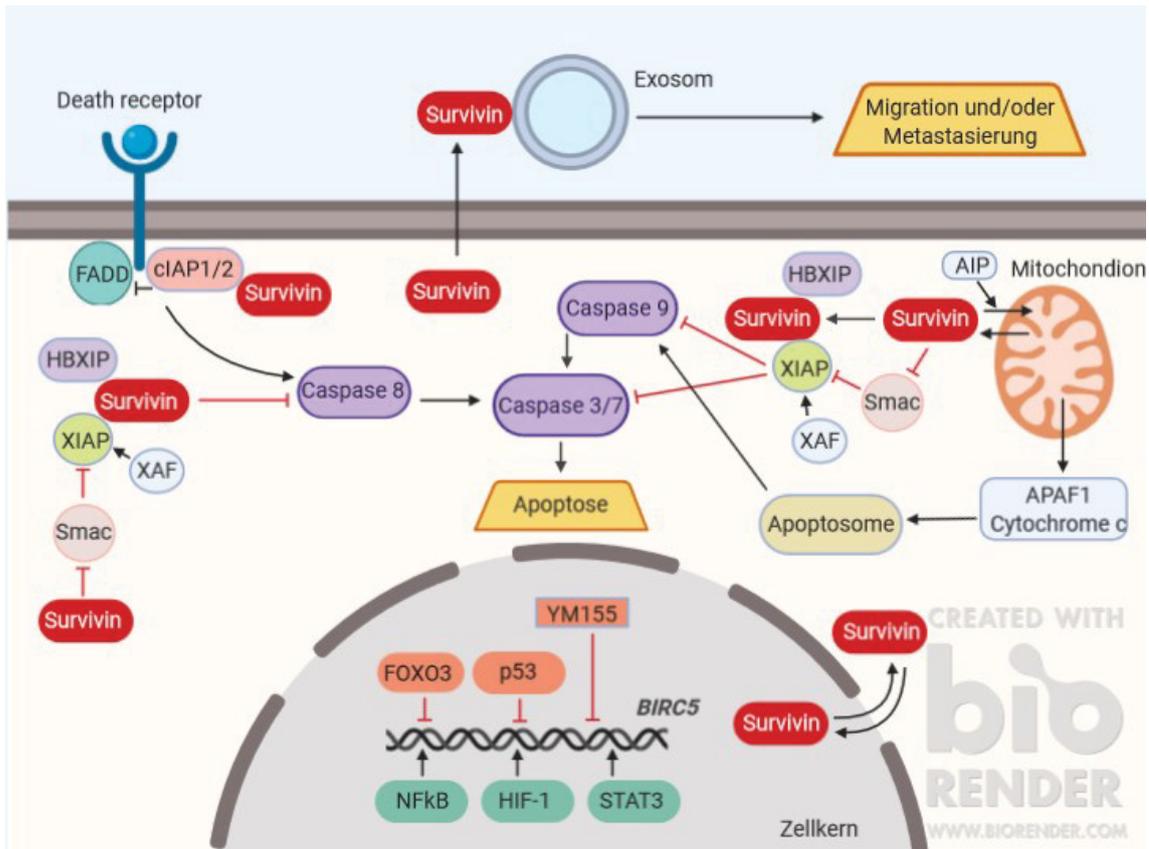
Survivin die Abgabe des *apoptotic protease-activating factor* (Apaf1) aus den Mitochondrien inhibieren und Diablo/Smac sequestrieren [128, 129]. Durch seine Interaktion mit den Hitzeschockproteinen Hsp90, AIP und Hsp60 kann Survivin deren proteosomalen Abbau verhindern und den intrinsischen Apoptoseweg inhibieren [130-132].

Eine unkontrollierte Zellproliferation und eine Inhibition des programmierten Zelltods zählen zu den Hauptmerkmalen der Karzinogenese. Es ist also nicht verwunderlich, dass die Tauglichkeit eines Proteins wie Survivin, das nicht nur in nahezu allen Tumorarten überexprimiert ist, sondern auch noch wichtige Rollen im Zellwachstum und der Apoptose übernimmt, als potenzieller Biomarker und therapeutische Zielstruktur derzeit in zahlreichen Studien untersucht wird.

Zahlreiche Studien berichten über die Überexpression von Survivin in verschiedenen Tumorarten. Wissenschaftliche Studien der letzten Jahre haben sich mit einer differenzierteren Betrachtung dieses Phänomens befasst, insbesondere mit Bezug auf die prognostischen Möglichkeiten der IAP-Proteine als Marker für verschiedene Krebsarten [133-137].

Daher ist die Entwicklung von Survivin-Antagonisten von großem Interesse. Diese beinhalten antisense Oligonukleotide, dominant-negative Mutanten, Ribozyme, *small interfering* RNAs, Antikörper und die sogenannten *small-molecule*-Inhibitoren [138-141]. Diese *small-molecule*-Inhibitoren interferieren mit dem Survivin-Promoter (z. B. YM155), der Survivin-Phosphorylierung (z. B. Flavopiridol) oder der Interaktion mit Hsp90 (z. B. Shepherdin) und zeigen vielversprechende Ergebnisse im Mammakarzinom [142], im follikulären Schilddrüsenkarzinom [136], in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien [135], dem Ösophaguskarzinom [137], dem Kolonkarzinom [143] und dem Osteosarkom [144].

Die detaillierte Charakterisierung der Survivinexpression in der Krebsforschung könnte letztendlich zur Entwicklung von Survivin-Inhibitoren und neuartigen Therapieansätzen beitragen.



**Abb. 3: Mechanismen der Apoptose-Inhibition durch Survivin.**

(Quelle: adaptiert von [112], Abbildung erstellt mit BioRender Software; <https://biorender.com/about>)

## 1.6 Ziel der Arbeit

Das duktales Pankreasadenokarzinom gilt als eines der aggressivsten Malignome des Menschen, welches trotz extensiver chirurgischer und konservativer Therapie eine der schlechtesten Prognosen besitzt. Für die Entwicklung wirksamer Therapien sind die Proteine von Interesse, die in der Antagonisierung des Zelltods und Zellteilung involviert sind. Die Mitglieder der IAP-Familie Survivin und XIAP sind an beiden Prozessen und somit auch an der Entstehung und Progression von Neoplasien beteiligt. Eine zielgerichtete Therapie gegen diese Proteine, insbesondere gegen Survivin, welches in vermutlich allen Tumorarten überexprimiert ist, könnte potenziell zu einer verbesserten Prognose für Krebspatienten beitragen.

Es ist bereits bekannt, dass Survivin im Pankreaskarzinom überexprimiert ist [145], jedoch wird kontrovers diskutiert, inwiefern sich Survivin als prognostischer Marker eignet, ob die Expression mit dem Tumorstadium korreliert und ob ein Zusammenhang

mit der Überlebensrate besteht [145-153]. Außerdem wurde die Expression von Survivin in den unterschiedlichen Tumorkompartimenten bisher noch nicht untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es daher, die Expression von Survivin in Gewebeproben von Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas immunhistochemisch in den unterschiedlichen Tumorkompartimenten und subzellulären Lokalisationen zu quantifizieren und mit klinisch-pathologischen Variablen und Überlebensdaten zu korrelieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Laborgeräte

Pipetboy	Integra Biosciences
Pipetten	Eppendorf

### 2.2 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Antibody Diluent	Zytomed Systems
Aqua dest.	Gibco
Corbit	Merck
DAB Substrate Kit High Contrast	Zytomed Systems
DPBS	Gibco
Entellan	Merck
Ethanol	VWR Chemicals
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck
Liquid Blocker Super Pap Pen	MBT Brand
Mayers Hämalaun	Merck
PBS-Tabletten	MBT Brand
Tween 20	Gibco
Xylol reinst	Merck
ZytoChem-Plus HRP Kit, Broad Spectrum	Zytomed Systems

### 2.3 Puffer und Lösungen

DAB-Substrat	Fünf Tropfen DAB Chromogen in eine Flasche DAB-Substrat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -PBS	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 1× PBS
Retrieval Solution	10 mM Natrium-Citrat-Puffer (3 mg Tri-Natriumcitrat-Dihydrat auf 1 L Aqua dest.)
Waschpuffer HRP	PBS + 0,1 % Tween 20

## 2.4 Antikörper

Der für die Immunhistochemie verwendete Survivin-Antikörper war ein monoklonaler Rabbit-IgG-Antikörper von Novus Biologicals (NB500-201). Als Sekundärantikörper für die Färbung wurde ein HRP-gekoppelter Anti-Rabbit-IgG-Sekundärantikörper eingesetzt. Für initiale Testfärbungen wurde außerdem der Rabbit-Isotyp-Antikörper Dako X0903 von DakoCytomation verwendet.

## 2.5 Einwegartikel und Plastikwaren

Die verwendeten Einwegartikel und Plastikwaren stammten von den Firmen Costar, Eppendorf, Falcon und StarLab.

## 2.6 Patientenkohorte

Es wurde ein Kollektiv aus 466 Patienten erstellt, welche eine radikale partielle oder totale Pankreatikoduodenektomie bei einem Pankreaskopf-Karzinom oder eine onkologische Pankreasschwanzresektion mit oder ohne Splenektomie unter kurativer Intention zwischen 2003 und 2018 im Universitätsklinikum Düsseldorf erhielten. Ausschlusskriterien waren eine präoperative neoadjuvante Therapie, eine makroskopisch unvollständige Resektion (R2), eine postoperative 30-Tage-Mortalität im Krankenhaus, pankreatische Tumoren anderen histologischen Ursprungs als das duktales Adenokarzinom des Pankreaskopfes oder Pankreasschwanzes, sowie Patienten mit unzureichendem Probenmaterial. Demzufolge konnten die Gewebeproben von 236 Patienten aus dem Archiv des pathologischen Instituts der Universitätsklinik Düsseldorf akquiriert werden. Informationen bezüglich der TNM-Klassifikation (Größe des Tumors, Invasion der umliegenden Arterien, Lymphknoten und Fernmetastasen), der Perineuralscheideninvasion, sowie lymphatischer und venöser Invasion wurden retrospektiv den originalen pathologischen Berichten entnommen, so dass die Tumorklassifikation analog der 8. Ausgabe der UICC TNM-Klassifikation erfolgte [35]. Klinisch-pathologische Parameter wie das Gesamtüberleben, krankheitsfreies Überleben, Alter zur Zeit des Eingriffs, Geschlecht und die Ergebnisse der Follow-Up-Untersuchung, einschließlich Metastasen und Diagnosezeitpunkt, wurden ebenfalls überprüft. Die Studie wurde im Einklang mit der Declaration of Helsinki und einem positiven Ethikvotum zur Verwendung der Gewebeproben des Ethikkomitees der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studennummer 3821) ausgeführt.

## **2.7 Tissue Microarrays**

Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben wurden vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf für die Studie zur Verfügung gestellt. Tumorkompartimente, Lymphknotenmetastasen und Normalgewebe wurden zuvor mikroskopisch markiert, um aus dem jeweiligen Bereich gezielt eine Stanze zur Herstellung der Tissue Microarrays zu entnehmen. Jeder Microarray enthielt für jeden Patient, falls verfügbar, drei repräsentative Gewebestanden des Primärtumors (zwei aus dem Tumorzentrum, eine aus der Invasionsfront), zwei Stanzen aus einer Lymphknotenmetastase und eine Stanze aus normalem Pankreasparenchym. Dementsprechend wurden von jedem Patienten bis zu sechs Zylinder von 1,0 mm Durchmesser entnommen und mit 0,5 mm Abstand in neue Paraffinblöcke überführt. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden aus dem Tissue Microarray Schnitte von 2 µm Dicke entnommen.

## **2.8 Immunohistochemie**

### **2.8.1 Testfärbungen**

Um eine optimale und spezifische Färbung der Tumorzellen zu erreichen, wurden Testfärbungen mit dem Primärantikörper Survivin (Firma Novus Biologicals; NB500-201 1 mg/ml) in drei verschiedenen Verdünnungen an Gewebe aus der Tonsille, das bekanntermaßen Survivin exprimiert und somit als Positiv-Kontrolle diente, durchgeführt. Die jeweilige Antikörper-Konzentration wurde mittel Hilfe eines Lösungsmittels (Antibody Diluent ZUC025-500, Firma Zytomed Systems) hergestellt. Es wurden drei verschiedene Verdünnungen getestet (1:1000, 1:750 und 1:500). Die optimale Färbung zeigte sich mit der Verdünnung von 1:750. Als Negativ-Kontrolle diente die Färbung mit einem Isotyp-Antikörper (Dako X0903, Verdünnung 1:1000).

### **2.8.2 Durchführung der HRP-Immunhistochemie**

Die Gewebeschnitte wurden zweimal für je zehn Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (99,5%-, 96%-, 80%- und 70%-Ethanollösung) für zweimal zwei Minuten pro Lösung rehydriert. Es folgte eine abschließende Inkubation der Proben in Aqua dest. für mindestens 5 Minuten. Zur Demaskierung wurden die Schnitte in Retrieval Solution für 30 Minuten bei maximaler Wattzahl in der Mikrowelle erhitzt und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Nach einem Waschvorgang mit PBS + 0,1 % Tween 20 für fünf Minuten wurden die Objektträger abgetrocknet und die Schnitte mit einem Super Pap Pen Mini umrandet. Die endogene Peroxidase wurde durch Inkubation der Schnitte mit 3,0 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS für 10 Minuten inhibiert, um eine unspezifische Reaktion zu vermeiden. Die Schnitte wurden dreimal für je zwei Minuten mit PBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen und danach 10 Minuten in der Blockierlösung des ZytoChem-Plus HRP-Kits inkubiert. Es wurde nochmals für 2 Minuten mit PBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen und die Schnitte für 60 Minuten bei Zimmertemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert. Die 1:750 Verdünnung des Primärantikörpers wurde mit 1,4 µl des Antikörpers und 1048,6 µl des Antibody Diluent erreicht. Nach dreimaligem Waschen für je zwei Minuten folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (biotinylierter Antikörper) für 15 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal gewaschen und dann für 30 Minuten bei Zimmertemperatur mit dem Enzymkonjugat inkubiert. Nach einem fünfminütigen Waschschrift mit destilliertem Wasser wurden zur Visualisierung zwei Tropfen DAB-Substrat auf den Schnitt aufgetragen und bis zur gewünschten Farbintensität (5 bis 10 Minuten) im Dunkeln bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Kernfärbung mit Mayers Hämalaun erfolgte nach einem weiteren fünfminütigen Waschschrift für 15 Sekunden und anschließendem Waschen für fünf Minuten. Die Schnitte wurden danach für je eine Minute in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-, 80%- und 90%-Ethanol) inkubiert, für mindestens zwei Minuten in Xylol getaucht und in schließlich mit Entellan eingedeckelt.

### **2.8.3 Auswertung der Färbungen**

Mikroskopische Bilder wurden bei 400-facher Vergrößerung mithilfe der Mikroskopsoftware Leica Application Suite (Version, Leica, Deutschland) aufgenommen. Die HRP-Immunhistochemie wurde mit einer leicht modifizierten Version des immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner ausgewertet [154], bei der die Farbintensität relativ zu dem prozentualen Anteil an positiver Zytoplasma- und Kernfärbung analysiert wird (Tabelle 2).

Farbintensität	Keine positive Färbung	< 10 % positive Färbung	10–50 % positive Färbung	51–80 % positive Färbung	> 80 % positive Färbung
Keine Farbreaktion (0+)	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
Schwache Farbreaktion (1+)	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3	IRS = 4
Mäßige Farbreaktion (2+)	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6	IRS = 8
Starke Farbreaktion (3+)	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9	IRS = 12

**Tabelle 2: Schema zur Auswertung der HRP-Immunhistochemie anhand des IRS.**

(Quelle: [154])

## 2.9 Statistische Datenanalyse

Unterschiede in den IR-Scores der Survivinexpression in den Tumorkompartimenten, Lymphknotenmetastasen und Normalgeweben wurden anhand des Wilcoxon-Tests für abhängige Stichproben untersucht. Mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben wurde der Vergleich zwischen den IR-Scores und den klinisch-pathologischen Parametern durchgeführt. Der exakte Chi-Quadrat-Test (Exakter Fisher-Test) wurde für kategorische Variablen angewendet. Hierbei wurden für weitergehende Analysen die IR-Scores in niedrige ( $\leq 4$ ) und hohe ( $> 4$ ) Werte unterteilt. Der Cut-off-Wert orientierte sich dabei an dem Median IRS für Survivin aller erhobenen Daten in den untersuchten Geweben. Kategoriale Variablen wurden mit dem exakten Chi-Quadrat-Test analysiert.

Die Bewertung des Überlebens beinhaltete das Gesamtüberleben, definiert als  $\geq$  der Zeitraum zwischen der Operation und dem letzten Follow-Up oder Tod (unabhängig der Ursache), sowie – wenn zutreffend – krankheitsfreies Überleben, definiert als der Zeitraum zwischen der Operation und der Diagnose von Metastasen oder lokalem Rezidiv. Patienten mit unvollständiger Tumorsektion und solche mit einem Überleben geringer als 30 Tage postoperativ wurden von der Überlebensanalyse ausgeschlossen. Kaplan-Meier-Kurven wurden erstellt und mit dem Log-Rank (Mantel Cox)-Test bewertet und die Hazard Ratio (HR) mit 95% Konfidenzintervall (CI) errechnet. Die

multivariate Überlebensanalyse schloss alle untersuchten Variablen ein und wurde mittels logistischer Regression erstellt. Hierbei wurde die schrittweise Methode-Vorwärtsauswahl (vorwärts Likelihood-Ratio LR) gewählt, wobei eine Variable in die Berechnung aufgenommen wurde, wenn  $p \leq 0,05$  und eine Variable aus der Berechnung ausgeschlossen wurde, wenn  $p \geq 0,1$  war. Alle Analysen wurden mit der Software SPSS Statistics for Windows (Version 25.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde für  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientenselektion und klinisch-pathologische Parameter

Aus der Gesamtkohorte von 466 Patienten schlossen wir 136 Patienten, die eine palliative Bypassoperation (Gastroenterostomie, biliodigestive Anastomose) erhielten sowie 51 Patienten, die infolge des Eingriffs verstarben, aus. Von den verbliebenen 279 Patienten fehlten von 22 Patienten die Paraffinblöcke im Institut für Pathologie und 21 Patienten mussten nach der pathologischen Reevaluation ausgeschlossen werden, da kein ausreichend auswertbares Tumorgewebe für die Immunhistochemie verfügbar war, so dass final 236 Patienten, die zwischen 2003 und 2018 aufgrund eines Adenokarzinoms des Pankreas onkologische Eingriffe erhalten hatten, anhand der Ein- und Ausschlusskriterien für die vorliegende Studie ausgewählt wurden. Insgesamt wurden 12 TMA Paraffinblöcke erstellt, die jeweils aus maximal 23 verschiedenen Patientenproben bestanden. Die klinisch-pathologischen Parameter der final 236 untersuchten Patienten sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die untersuchten Patienten hatten im Median ein Alter von 68 Jahren (Spannweite: 41-95 Jahre) zum Zeitpunkt der Operation. Die für die Überlebensanalyse definierten Einschlusskriterien trafen auf alle Patienten zu. Bei 217 Patienten war das Adenokarzinom im Pankreaskopf lokalisiert, 19 Patienten wiesen ein Pankreasschwanzkarzinom auf. Die durchschnittliche Dauer der Follow-Up-Periode lag bei 8 Jahren (Spannweite: 17 Monate – 15 Jahre). In diesem Zeitraum verstarben 199 Patienten. Die durchschnittliche Gesamtüberlebensdauer lag bei 1,85 Jahren (Spannweite: 1 Monat – 14 Jahre). Für 94 Patienten war eine detaillierte Follow-Up-Untersuchung des krankheitsfreien Überlebens möglich, mit einer durchschnittlichen Dauer von 1,4 Jahren (Spannweite: 3 Monate – 12,8 Jahre).

<b>Alter</b>		
Median (range)		68 (41–95)
	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Geschlecht</b>		
männlich	126	53,4
weiblich	110	46,6
<b>Tumorlokalisation</b>		
Pankreaskopf	217	91,9
Pankreasschwanz	19	8,1
<b>Tumorstadium/UICC</b>		
T1	1	0,4
T2	11	4,7
T3	214	90,7
T4	10	4,2
UICC Ib	2	0,8
UICC II a	31	13,1
UICC II b	165	69,9
UICC III	7	3
UICC IV	31	13,1
<b>Lymphknoten</b>		
N0	42	17,8
N1	194	82,2
<b>Metastasen</b>		
M0	203	86
M1	33	14
<b>Grading</b>		
G1/G2	125	52,9
G3	110	46,6
fehlend	1	0,5
<b>Pn</b>		
Pn0	23	9,7
Pn1	96	40,7
fehlend	117	49,6
<b>L</b>		
L0	75	31,8
L1	91	38,6
fehlend	70	29,7
<b>V</b>		
V0	116	49,2
V1	49	20,8
fehlend	71	30,1
<b>Resektionsstatus</b>		
R0	184	78
R1	52	22

**Tabelle 3: Klinisch-pathologische Parameter der untersuchten Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas.**

## 3.2 Survivinexpression im duktalem Adenokarzinom des Pankreas

### 3.2.1 Histologische Untersuchung der Survivinexpression

Sowohl zytoplasmatisches als auch nukleäres Survivin konnten anhand der Immunhistochemie deutlich im Tumorgewebe und in Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden (Abb. 4). Im Gegensatz dazu wurde das angrenzende Pankreasnormalgewebe vergleichsweise schwächer angefärbt.

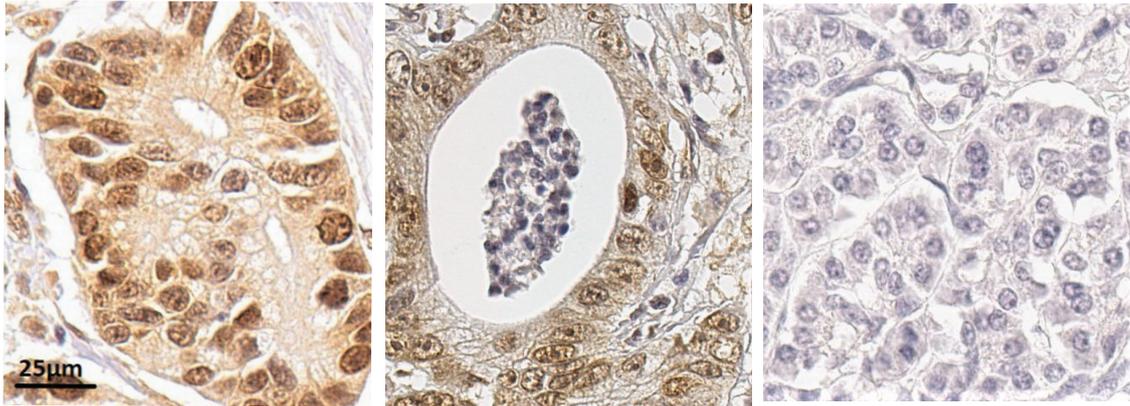


Abb. 4: Repräsentative Bilder der Survivin-Färbungen im Tumorzentrum (links), in Lymphknotenmetastasen (Mitte) und im Pankreasnormalgewebe (rechts), 400× Vergrößerung.

### 3.2.2 Quantitative Expressionsanalyse

Die IRS-Analyse zur Quantifizierung der Immunhistochemie zeigte eine im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe signifikant höhere Expression sowohl von nukleärem als auch von zytoplasmatischem Survivin im Tumorzentrum, in der Tumorinvasionsfront und in Lymphknotenmetastasen ( $p < 0,001$  für alle Vergleiche mit dem Normalgewebe) (Abb. 5 und 6). Die Survivinexpression im Tumorzentrum war in 220 Patientenproben (93%) auswertbar, in der Tumorinvasionsfront in 189 Patienten (81%). Nicht-neoplastisches Pankreasnormalgewebe war von 175 Patienten (74%) auswertbar. Für 148 der 193 Patienten mit Lymphknotenmetastasen (77%) standen Gewebeproben zur Verfügung. In Proben von 166 Patienten (70%) war jeweils der Primärtumor sowie korrespondierendes nicht neoplastisches Normalgewebe zur Auswertung verfügbar. Der IRS-Wert für die nukleäre Survivinexpression lag im Median bei 3,375 im Tumorzentrum, bei 4,0 in der Tumorinvasionsfront, bei 4,5 in Lymphknotenmetastasen und 1,0 für Pankreasnormalgewebe.

Der IRS-Wert für die zytoplasmatische Survivinexpression lag im Median bei 3,5 im Tumorzentrum, der Tumorinvasionsfront und den Lymphknotenmetastasen, und bei 3,0 im Pankreasnormalgewebe. Die Cut-Off-Werte zur Kategorisierung in eine hohe ( $IRS > 4$ ) oder niedrige ( $IRS \leq 4$ ) Survivinexpression wurden als Durchschnitt aus den IRS-Medianen der nukleären und zytoplasmatischen Survivinexpression im Tumorzentrum, der Tumorinvasionsfront und den Lymphknotenmetastasen berechnet.

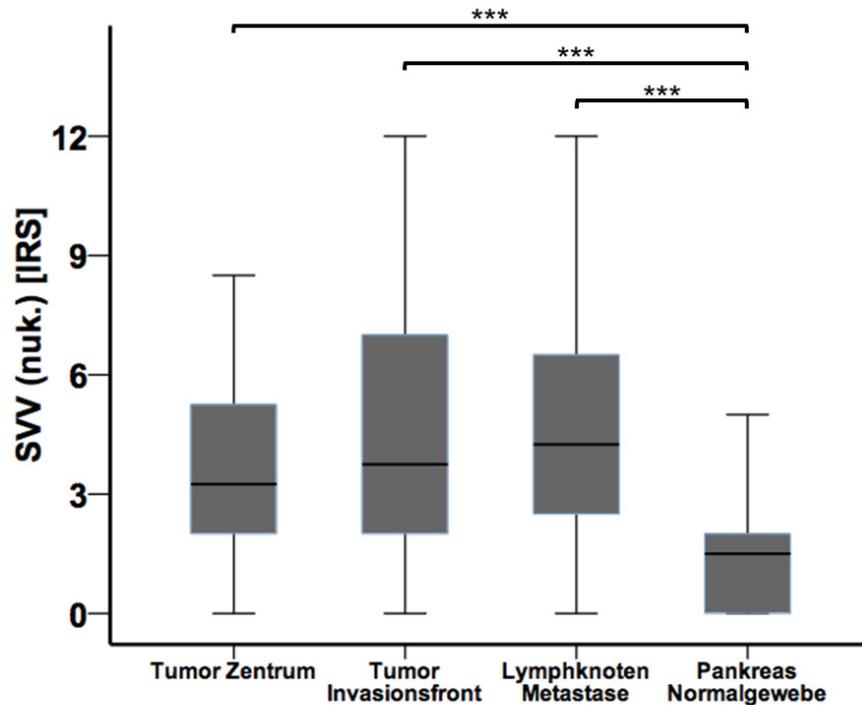
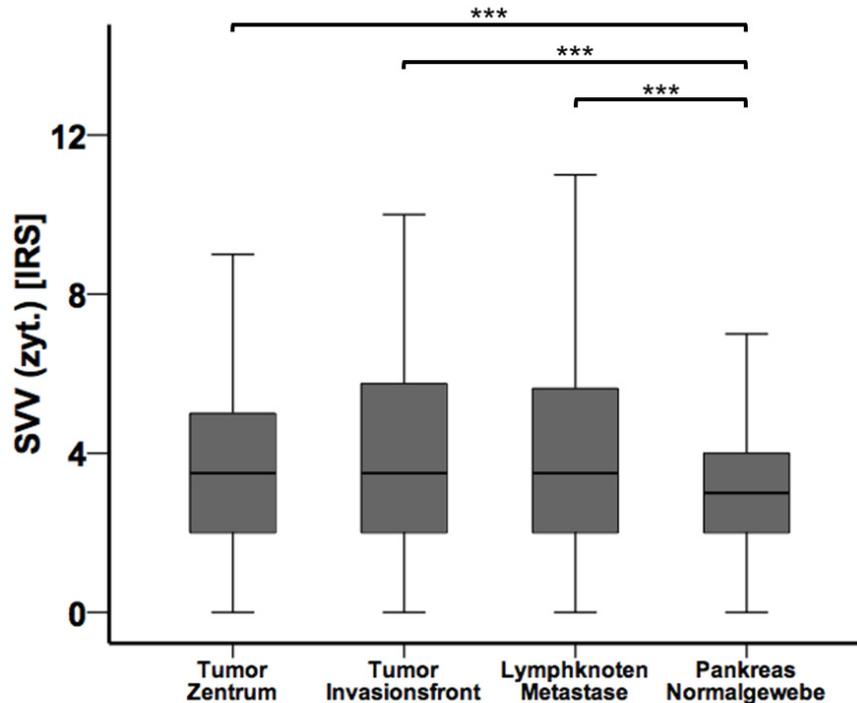


Abb. 5: Nukleäre Survivinexpression [IRS] im Tumorzentrum, der Tumorinvasionsfront, in Lymphknotenmetastasen und im Normalgewebe. Die Survivinexpression ist sowohl im Tumor als auch in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Normalgewebe hochsignifikant erhöht (Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben; \*\*\* $p < 0,001$ ).



**Abb. 6: Zytoplasmatische Survivinexpression [IRS] im Tumorzentrum, der Tumorinvasionsfront, in Lymphknotenmetastasen und im Normalgewebe.** Die Survivinexpression ist sowohl im Tumor als auch in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Normalgewebe hochsignifikant erhöht (Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben; \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 3.3 Korrelation der Survivinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern

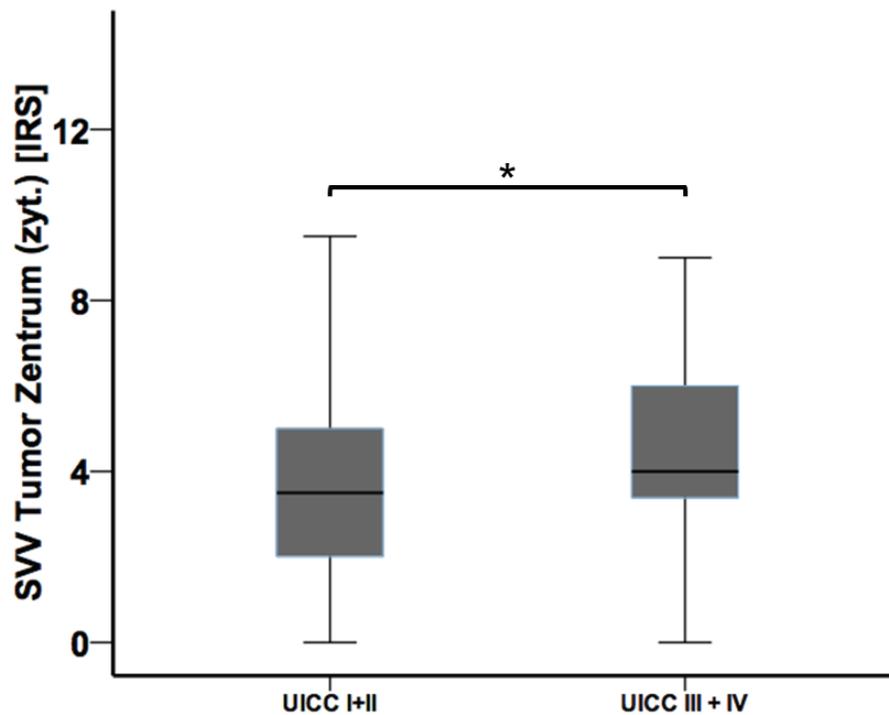
Zur Korrelation der Survivinexpression mit den klinisch-pathologischen Parametern wurden zunächst die IR-Scores mit dem jeweiligen Parameter verglichen. Es zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen der zytoplasmatischen Survivinexpression im Tumorzentrum und dem UICC-Stadium (Abb. 7,  $p < 0,05$ ; Stadien I und II sowie III und IV zusammengefasst). Die erhöhte Expression von zytoplasmatischen Survivin sowohl im Tumorzentrum als auch in der Tumorinvasionsfront korrelierte positiv mit dem Auftreten einer Perineuralscheideninvasion (Abb. 8, Pn0 vs. Pn1).

Im nächsten Schritt wurden die IRS-Werte in zwei Gruppen geteilt: Alle Patienten mit einem zugehörigen IRS-Wert  $\leq 4$  fallen dabei in die Gruppe mit niedriger Survivinexpression, alle Patienten mit einem zugehörigen IRS-Wert  $> 4$  in die Gruppe mit hoher Survivinexpression. Die Cut-Off-Werte zur Kategorisierung in eine hohe ( $IRS > 4$ ) oder niedrige ( $IRS \leq 4$ ) Survivinexpression wurden als Durchschnitt aus den IRS-

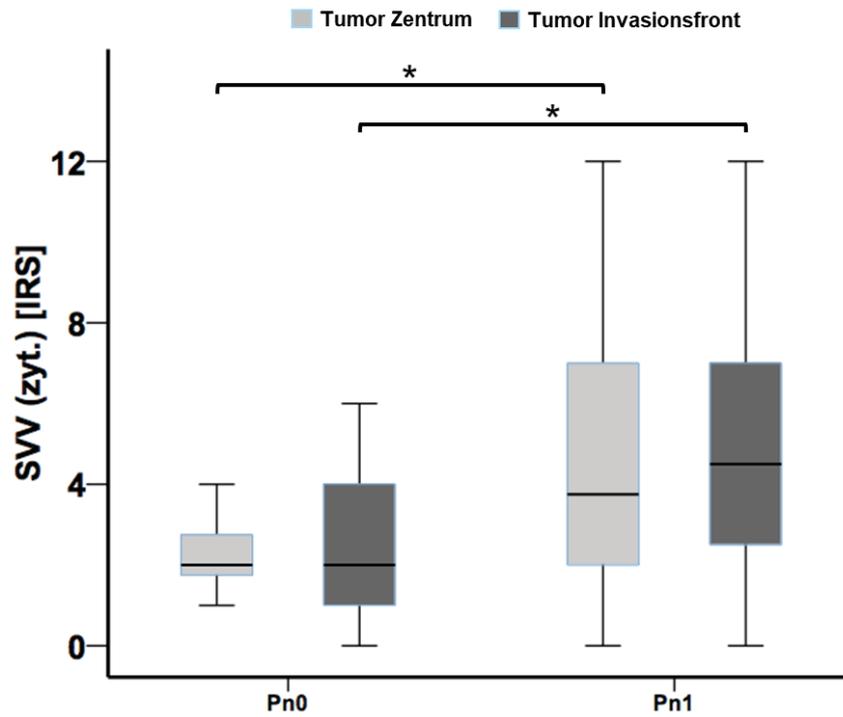
Medianen der nukleären und zytoplasmatischen Survivinexpression im Tumorzentrum, der Tumorinvasionsfront und den Lymphknotenmetastasen berechnet.

Die Korrelation der nukleären Survivinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern mittels exakter Fisher-Test (Tabelle 4) ergab eine signifikante Korrelation zwischen hoher nukleärer Survivinexpression in der Tumor Invasionsfront und dem Auftreten einer Perineuralscheideninvasion (Pn1) ( $p = 0,035$ ).

In der Auswertung der zytoplasmatischen Survivinexpression mit klinisch pathologischen Parametern (Tabelle 5) zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen hoher zytoplasmatischer Survivinexpression im Tumorzentrum sowohl mit der Fernmetastasierung (M1) ( $p=0,016$ ) als auch mit einem fortgeschrittenen UICC-Stadium (UICCCIII/IV) ( $p=0,009$ ). Eine hohe zytoplasmatische Survivinexpression in der Tumor Invasionsfront ist zudem signifikant mit der venösen Invasion korreliert (V1) ( $p=0,022$ ).



**Abb. 7: Korrelation der Survivinexpression [IRS] mit klinisch-pathologischen Parametern (UICC-Stadien).** Eine erhöhte zytoplasmatische Survivinexpression korrelierte signifikant mit dem UICC-Tumorstadium (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test,  $*p < 0,05$ ).



**Abb. 8: Korrelation der Survivinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern (Perineuralscheideninvasion Pn).** Die zytoplasmatische Survivinexpression im Tumorzentrum und in der Tumorinvasionsfront war in Tumoren mit Perineuralscheideninvasion (Pn1) signifikant gegenüber solchen ohne Perineuralscheideninvasion (Pn0) erhöht (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test, \* $p < 0,05$ ).

	Tumorzentrum			Tumorinvasionsfront			Lymphknotenmetastase		
	Niedrig n=125	Hoch n=95	p- Wert	Niedrig n=92	Hoch n=97	p- Wert	Niedrig n=51	Hoch n=97	p- Wert
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
<b>Alter</b>									
≤Median	72(58,5)	51(41,5)		50(46,3)	58(53,7)		29(32,2)	61(67,8)	
>Median	53(54,6)	44(45,4)	0,586	42(51,9)	39(48,1)	0,466	22(37,9)	36(62,1)	0,484
<b>Geschlecht</b>									
Männlich	57(55,3)	46(44,7)		45(45,5)	54(44,5)		30(38,0)	49(62,0)	
Weiblich	68(58,1)	49(41,9)	0,685	47(52,2)	43(47,8)	0,834	21(30,4)	48(69,6)	0,388
<b>T-Stadium</b>									
T1/T2	5(50)	5(50)		3(30,0)	7(70,0)		3(37,5)	5(62,5)	
T3/T4	118(56,7)	90(43,3)	0,750	87(49,2)	90(50,8)	0,334	47(33,8)	92(66,2)	1,000
<b>Lymphknoten</b>									
N0	23(53,5)	20(46,5)		18(51,4)	17(48,6)		3 (50)	3 (50)	
N1	102(57,6)	75(42,4)	0,732	74(48,1)	80(51,9)	0,852	48(33,8)	94(66,2)	0,415
<b>Metastasen</b>									
M0	111(58,4)	79(41,6)		83(51,6)	78(48,4)		44(35,5)	80(64,5)	
M1	14(46,7)	16(53,3)	0,240	9(32,1)	19(67,9)	0,067	7 (29,2)	17(70,8)	0,643
<b>UICC</b>									
I/II	107(57,8)	78(42,2)		79(50,6)	77(49,4)		44(35,2)	81(64,8)	
III/IV	18(51,4)	17(48,6)	0,577	13(39,4)	20(60,6)	0,257	7 (30,4)	16(69,6)	0,812
<b>Grading</b>									
G2	58(51,3)	55(48,7)		44(44,0)	56(56,0)		27(35,1)	50(64,9)	
G3	66(63,5)	38(36,5)	0,076	47(53,4)	41(46,6)	0,242	24(34,8)	45(65,2)	1,000
<b>Venöse Invasion</b>									
V0	62(57,9)	45(42,1)		43(45,7)	51(54,3)		25(34,7)	47(65,3)	
V1	24(51,1)	23(48,9)	0,483	17(43,6)	22(56,4)	0,850	15(38,5)	24(61,5)	0,836
<b>Lymphatische Invasion</b>									
L0	36(52,9)	32(57,1)		28(47,5)	31(52,5)		17(40,5)	25(59,2)	
L1	53(60,2)	35(39,8)	0,416	32(42,7)	43(57,3)	0,604	23(33,8)	45(66,2)	0,543
<b>Perineuralscheideninvasion</b>									
Pn0	16(72,7)	6 (27,3)		12(66,7)	6 (33,3)		8 (61,5)	5 (38,5)	
Pn1	46(52,9)	41(47,1)	0,147	29(37,7)	48(62,3)	<b>0,035</b>	23(32,9)	47(67,1)	0,064
<b>Resektionsgrenze</b>									
R0	95(55,2)	77(44,8)		76(50,7)	74(39,3)		38(33,3)	76(66,7)	
R1	30(62,5)	18(37,5)	0,412	16(41,0)	23(59,0)	0,369	13(38,2)	21(61,8)	0,682

**Tabelle 4: Korrelation zwischen nukleärer Survivinexpression und klinisch pathologischen Parametern von Adenokarzinomen des Pankreas.** Berechnung der p-Werte erfolgte mittels Fisher's exact Test.

	Tumorzentrum			Tumorinvasionsfront			Lymphknotenmetastase		
	Niedrig n=125	Hoch n=95	p- Wert	Niedrig n=92	Hoch n=97	p- Wert	Niedrig n=51	Hoch n=97	p- Wert
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
<b>Alter</b>									
≤Median	67(54,5)	56(45,5)		49(45,4)	59(54,6)		40(44,4)	50(55,6)	
>Median	60(61,9)	37(38,1)	0,336	48(59,3)	33(40,7)	0,077	23(39,7)	35(60,3)	0,612
<b>Geschlecht</b>									
Männlich	68(58,1)	49(41,9)		47(47,5)	52(52,5)		33(41,8)	46(58,2)	
Weiblich	59(57,3)	44(42,7)	1,000	50(55,6)	40(44,4)	0,309	30(43,5)	39(56,5)	0,869
<b>T-Stadium</b>									
T1/T2	8(80,0)	2(20,0)		6(60,0)	4(40,0)		3(37,5)	5(62,5)	
T3/T4	118(56,7)	90(43,3)	0,197	91(51,4)	86(48,6)	0,749	60(43,2)	79(56,8)	1,000
<b>Lymphknoten</b>									
N0	23(53,5)	20(46,5)		14(40,0)	21(60,0)		(50)	3(50)	
N1	104(58,8)	73(41,2)	0,606	83(53,9)	71(46,1)	0,189	60(42,3)	82(57,7)	0,700
<b>Metastasen</b>									
M0	116(61,1)	74(38,9)		86(53,4)	75(46,6)		52(41,9)	72(58,1)	
M1	11(36,7)	19(63,3)	<b>0,016</b>	11(39,3)	17(60,7)	0,219	11(45,8)	3(54,2)	0,822
<b>UICC</b>									
I/II	114(61,6)	71(38,4)		85(54,5)	71(45,5)		52(41,6)	73(58,4)	
III/IV	13(37,1)	22(62,9)	<b>0,009</b>	12(36,4)	21(63,6)	0,084	11(47,8)	12(52,2)	0,649
<b>Grading</b>									
G2	65(57,5)	48(42,5)		50(50,0)	50(50,0)		32(41,6)	45(58,4)	
G3	60(57,7)	44(42,3)	1,000	46(52,3)	42(47,7)	0,772	31(44,9)	38(55,1)	0,739
<b>Venöse Invasion</b>									
V0	60(56,1)	47(43,9)		41(43,6)	53(56,4)		26(36,1)	46(63,9)	
V1	27(57,4)	20(42,6)	1,000	26(66,7)	13(33,3)	<b>0,002</b>	16(41,0)	23(59,0)	0,683
<b>Lymphatische Invasion</b>									
L0	39(57,4)	29(42,6)		28(47,5)	31(52,5)		18(42,9)	24(57,1)	
L1	50(56,8)	38(43,2)	1,000	38(50,7)	37(49,3)	0,731	25(36,8)	43(63,2)	0,552
<b>Perineuralscheideninvasion</b>									
Pn0	15(68,2)	7(31,8)		11(61,1)	7(38,9)		6(46,2)	7(53,8)	
Pn1	48(55,2)	39(44,8)	0,337	36(46,8)	41(53,2)	0,306	30(42,9)	40(57,1)	1,000
<b>Resektionsgrenze</b>									
R0	100(58,1)	72(41,9)		76(50,7)	74(49,3)		45(39,5)	69(60,5)	
R1	27(56,3)	21(43,8)	0,869	21(53,8)	18(46,2)	0,858	18(52,9)	16(47,1)	0,173

**Tabelle 5: Korrelation zwischen zytoplasmatischer Survivinexpression und klinisch pathologischen Parametern von Adenokarzinomen des Pankreas.** Berechnung der p-Werte erfolgte mittels Fisher's exact Test.

### 3.4 Korrelation der Survivinexpression mit den Überlebensdaten

Es wurden sowohl eine univariate als auch eine multivariate Überlebensanalyse durchgeführt, um Faktoren zu identifizieren, die für das Outcome von Patienten mit einem Adenokarzinom des Pankreas prädiktiv sein könnten. Zunächst wurden alle klinisch-pathologischen Variablen einer univariaten Analyse unterzogen. Das Kaplan-Meier-Verfahren und der Log-Rank-Test zeigten auf, dass ein höheres Alter zum Operationszeitpunkt, das Auftreten von Fernmetastasen, eine Resektion mit tumorpositiven Schnitträndern (R1) und die mikroskopische Veneninvasion (V1)

signifikant negativ mit dem Gesamtüberleben korrelierten (Tabelle 6). In der multivariaten Analyse konnten das Alter ( $p = 0,013$ ) und der Resektionsstatus ( $p = 0,002$ ) sowie die Veneninvasion ( $p = 0,039$ ) als negative Prädiktoren für das Überleben bestätigt werden (Tabelle 6). Survivin war in der Gesamtkohorte weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse ein negativ prädiktiver Wert.

Univariate Analyse		Multivariate Analyse		
Variable	p-Wert	HR	95 % CI	p-Wert
<b>Alter</b>	<b>0,009</b>	<b>1,737</b>	<b>1,121-2,692</b>	<b>0,013</b>
Geschlecht	0,490	-	-	-
T1/2 vs. T3/4	0,432	-	-	-
N0 vs. N1	0,384	-	-	-
<b>M0 vs. M+</b>	<b>0,000</b>	-	-	-
G1/2 vs. G3	0,071	-	-	-
Pn0 vs. Pn1	0,427	-	-	-
L0 vs. L1	0,794	-	-	-
<b>V0 vs. V1</b>	<b>0,021</b>	<b>1,615</b>	<b>1,024-2,546</b>	<b>0,039</b>
<b>R0 vs. R1</b>	<b>0,011</b>	<b>2,421</b>	<b>1,391-4,216</b>	<b>0,002</b>
SVV (nuk.) Tumorzentrum	0,769	-	-	-
SVV (nuk.) Tumorinvasionsfront	0,793	-	-	-
SVV (zyt.) Tumorzentrum	0,782	-	-	-
SVV (zyt.) Tumorinvasionsfront	0,072	-	-	-

**Tabelle 6: Univariate und multivariate Analyse des Gesamtüberlebens zur Identifikation prädiktiver Faktoren für das Outcome von Patienten mit einem Adenokarzinom des Pankreas.**

Die Expression von zytoplasmatischem und nukleärem Survivin in allen Gewebeproben wurde in die Überlebensanalyse der Subgruppen mit einbezogen. Die Subgruppen „nur R0“, „R0 + M0“, „nur M0“ sowie die Subgruppe „nur Pankreaskopfkarzinome“ und „nur Pankreasschwanzkarzinome“ wurden einer univariaten und multivariaten Analyse unterzogen.

Das höhere Alter der Patienten stellte sich in der univariaten Analyse in den Subgruppen „nur R0“ ( $p = 0,024$ ), „R0+M0“ ( $p = 0,005$ ), „ nur M0“ ( $p = 0,002$ ) und in der Subgruppe der „Pankreaskopfkarzinome“ ( $p = 0,024$ ) als negativ prädiktiver Wert für das Gesamtüberleben dar. Die Veneninvasion stellte sich in der Subgruppe der „Pankreaskopfkarzinome“ ( $P = 0,041$ ) ebenfalls als negativ prädiktiver Faktor für das Gesamtüberleben heraus. In der Subgruppe der Pankreaskopfkarzinome korrelierte

zudem die Fernmetastasierung (M1) ( $p=0,001$ ) mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten. In der Subgruppe der Pankreasschwanzkarzinome stellten sich die Lymphgefäßinvasion ( $p=0,046$ ) sowie der positive Resektionsrand ( $p=0,047$ ) als relevante Prädiktoren für ein kürzeres Überleben heraus.

In der univariaten Analyse korrelierte eine hohe zytoplasmatische Survivinexpression ( $IRS>4$ ) in der Tumordinvasionsfront in der Subgruppe „nur R0“ ( $p=0,025$ ), in der Subgruppe „R0+M0“ ( $p=0,029$ ), in der Subgruppe „nur M0“ ( $p=0,037$ ) sowie in der Subgruppe „nur Pankreasschwanzkarzinome“ ( $p=0,022$ ) signifikant negativ mit dem Gesamtüberleben (Tabelle 7).

In der multivariaten Analyse des Gesamtüberlebens zeigten sich in der Subgruppe „nur R0“ keine signifikanten Ergebnisse. In den Subgruppen „R0+M0“ ( $p=0,034$ ) und „nur M0“ ( $p=0,023$ ) war das höhere Alter der Patienten ein signifikanter negativ prädiktiver Wert für das Gesamtüberleben. In der Subgruppe der „nur Pankreaskopfkarzinome“ korrelierte die Fernmetastasierung (M1) signifikant mit einem kürzerem Gesamtüberleben ( $p=0,002$ ). In der Subgruppe der „nur Pankreasschwanzkarzinome“ war eine hohe nukleäre Survivinexpression im Tumorzentrum ein signifikanter, negativ prädiktiver Wert für das Gesamtüberleben ( $p=0,024$ ) (Tabelle 8).

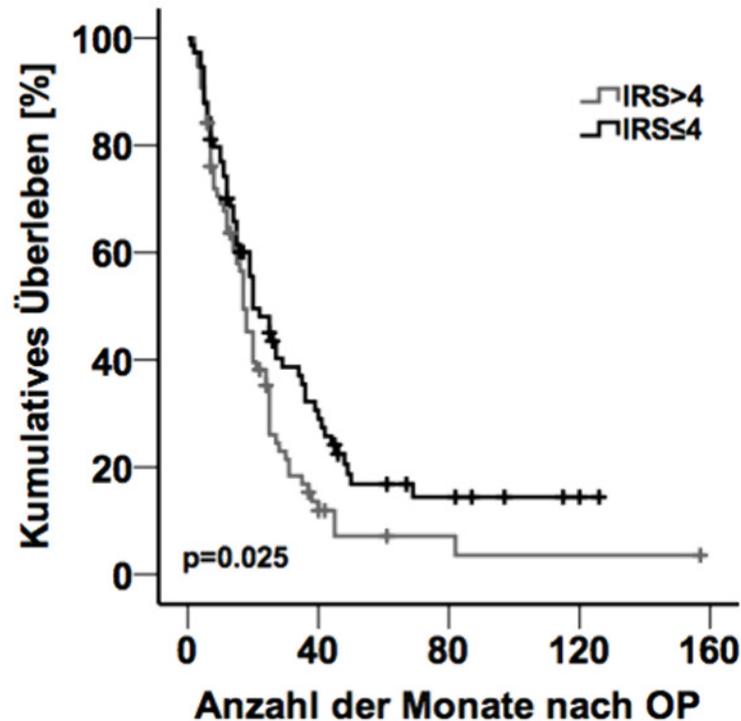
Variablen	Subgruppen (p-Werte)				
	nur R0 (n=184)	R0+M0 (n=168)	nur M0 (n=203)	nur Pankreas- kopf (n=217)	nur Pankreas- schwanz (n=19)
Geschlecht	0,944	0,996	0,677	0,457	0,83
Alter	<b>0,024</b>	<b>0,005</b>	<b>0,002</b>	<b>0,024</b>	0,48
T1/2 vs. T3/4	0,561	0,511	0,647	0,682	/
UICC I+II vs. UICC III+IV	0,657	0,499	0,113	0,095	0,397
N0 vs. N1	0,95	0,601	0,651	0,203	0,074
M0 vs. M+	0,308	/	/	<b>0,001</b>	0,074
G1/2 vs. G3	0,939	0,775	0,183	0,052	0,818
Pn0 vs. Pn1	0,657	0,691	0,557	0,814	0,522
L0 vs. L1	0,374	0,207	0,462	0,819	0,046
V0 vs. V1	0,605	0,713	0,093	<b>0,041</b>	0,37
R0 vs. R1	/	/	0,347	0,056	0,047
SVV (nuk.) Tumorzentrum	0,645	0,501	0,782	0,747	0,317
SVV (nuk.) Tumorinvasionsfront	0,819	0,863	0,943	0,992	0,363
SVV (zyt.) Tumorzentrum	0,573	0,652	0,398	0,745	0,841
SVV (zyt.) Tumorinvasionsfront	<b>0,025</b>	<b>0,029</b>	<b>0,037</b>	0,481	<b>0,022</b>

Tabelle 7: Univariate Subgruppenanalyse der Survivinexpression zur Bewertung von Survivin als prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben.

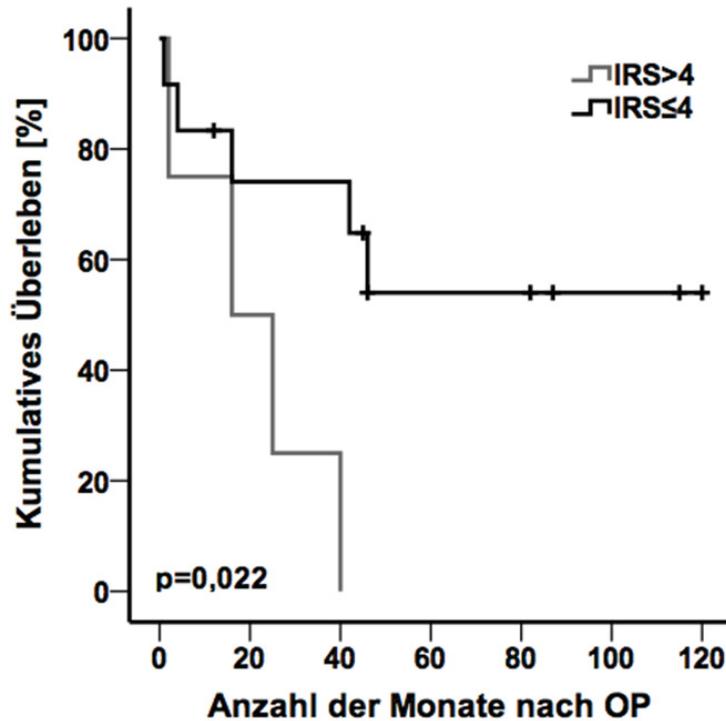
Signifikante Ergebnisse der multivariaten Subgruppenanalyse			
Subgruppe	HR	95% CI	p-Wert
R0+M0			
Alter ≤Median vs. >Median	1,581	1,032-2,231	<b>0,034</b>
Nur M0			
Alter ≤Median vs. >Median	1,5	1,1-2,1	<b>0,023</b>
Nur Pankreasschwanzkarzinome			
SVV (nuk.) Tumorzentrum	13,5	1,4-129,8	<b>0,024</b>
Nur Pankreaskopfkarzinome			
M0 vs. M1	2,057	1,3-3,3	<b>0,002</b>

Tabelle 8: Multivariate Subgruppenanalyse der Survivinexpression zur Bewertung von Survivin als prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben.

Die Abb. 9 und 10 zeigen die grafische Darstellung der Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens relativ zu den IR-Scores der zytoplasmatischen Survivinexpression für alle R0-resezierten Patienten (Abb. 9) und Patienten mit einem Pankreasschwanzkarzinom (Abb. 10).



**Abb. 9:** Kaplan-Meier-Kurve der kumulativen Überlebensrate der Patienten in der Subgruppe „Alle Patienten, R0 reseziert“ relativ zu der zytoplasmatischen Survivinexpression [IRS]. Eine hohe zytoplasmatische Survivinexpression (IRS>4) korrelierte in der univariaten Überlebensanalyse der Subgruppen signifikant ( $p<0.05$ ) mit einem kürzeren postoperativen Überleben.



**Abb. 10:** Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der kumulativen Überlebensrate der Patienten in der Subgruppe Pankreasschwanzkarzinom relativ zu der zytoplasmatischen Survivinexpression [IRS]. Eine hohe zytoplasmatische Survivinexpression (IRS>4) korrelierte in der univariaten Überlebensanalyse der Subgruppen signifikant ( $p < 0,05$ ) mit einem kürzeren postoperativen Überleben.

Für 94 Patienten konnte eine Überlebensanalyse des krankheitsfreien Überlebens durchgeführt werden. In der univariaten Analyse korrelierte eine R0-Resektion und eine hohe nukleäre Survivinexpression im Tumorzentrum und der Tumorinvasionsfront mit dem krankheitsfreien Überleben (Tabelle 9). In der multivariaten Analyse stellten sich die R0-Resektion ( $p = 0,029$ ) und hohe nukleäre Survivinexpression im Tumorzentrum ( $p = 0,012$ ) als unabhängige prognostische Faktoren für das krankheitsfreie Überleben heraus (Tabelle 9). Abb. 11 zeigt die grafische Darstellung des krankheitsfreien Überlebens im Kaplan-Meier-Verfahren relativ zu den IR-Scores der nukleären Expression von Survivin.

Univariate Analyse		Multivariate Analyse		
Variable	p-Wert	HR	95 % CI	p-Wert
Alter	0,481	-	-	-
Geschlecht	0,498	-	-	-
T1/2 vs. T3/4	0,551	-	-	-
N0 vs. N1	0,621	-	-	-
M0 vs. M+	0,552	-	-	-
G1/2 vs. G3	0,481	-	-	-
Pn0 vs. Pn1	0,219	-	-	-
L0 vs. L1	0,634	-	-	-
V0 vs. V1	0,207	-	-	-
<b>R0 vs. R1</b>	<b>0,043</b>	<b>1,885</b>	<b>1,065-3,161</b>	<b>0,029</b>
<b>SVV (nuk.) Tumorzentrum</b>	<b>0,024</b>	<b>1,798</b>	<b>1,037-3,118</b>	<b>0,012</b>
<b>SVV (nuk.) Tumorinvasionsfront</b>	<b>0,050</b>	-	-	-
SVV (zyt.) Tumorzentrum	0,362	-	-	-
SVV (zyt.) Tumorinvasionsfront	0,416	-	-	-

Tabelle 9: Analyse des krankheitsfreien Überlebens von Pankreaskarzinom-patienten (n = 94).

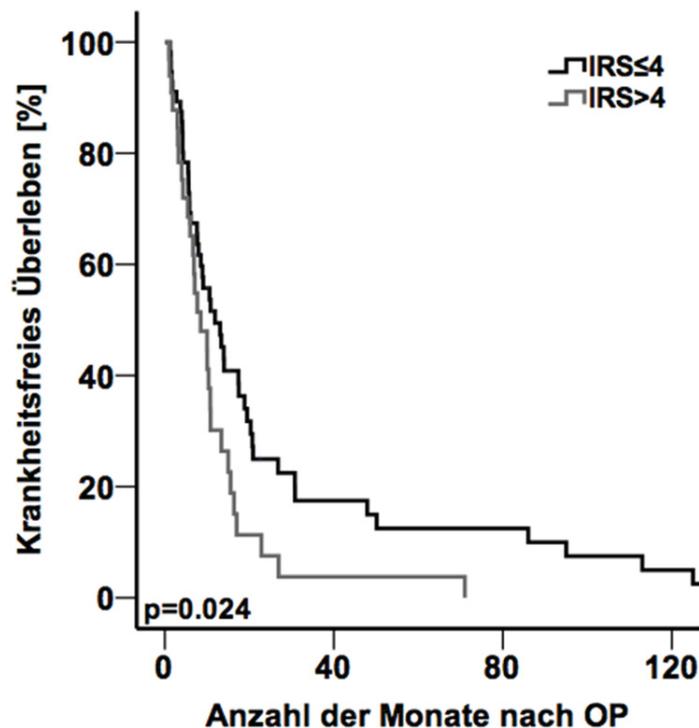


Abb. 11: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des krankheitsfreien Überlebens von Pankreaskarzinompatienten relativ zu der nukleären Expression von Survivin [IRS]. Eine hohe nukleäre Survivinexpression (IRS>4) korrelierte in der univariaten Überlebensanalyse signifikant mit einer kürzeren krankheitsfreien Überlebensdauer ( $p < 0,05$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Survivin als Marker für die Progression des duktales Adenokarzinoms des Pankreas

Das bekannteste Mitglied der IAP-Familie ist Survivin. Die Tatsache, dass dieses Protein in vielen verschiedenen Karzinomen überexprimiert ist, unterstreicht die Wichtigkeit eines genauen Verständnisses seiner Expression im Tumorgewebe und seiner Korrelation mit der Prognose [85].

Trotz immenser Fortschritte in der Krebsforschung während der letzten Jahrzehnte ist die Prognose für das duktales Adenokarzinom des Pankreas in der Regel schlecht und mit einer niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate vergesellschaftet [155]. Umso dringender erscheint die Identifizierung prädiktiver Tumormarker für diese Tumorentität, die zudem therapeutisch genutzt werden können.

Bisherige Arbeiten zur Expression von Survivin im duktales Adenokarzinom des Pankreas konnten die in anderen Karzinomarten beobachtete erhöhte Expression von Survivin bestätigen [145, 146, 156]. Analysen der Survivinlevel im Blut von Patienten mit einem Pankreaskarzinom konnten hohe Survivinkonzentrationen im Vergleich zu Blutproben von gesunden Probanden demonstrieren [46, 157].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Survivin in Gewebeproben von Patienten mit einem duktales Adenokarzinom des Pankreas immunohistochemisch untersucht, quantifiziert und mit klinisch-pathologischen Faktoren sowie der Überlebensdaten der Patienten korreliert.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie zeigen eine hoch signifikant erhöhte Expression sowohl von nukleärem als auch zytoplasmatischem Survivin im Tumorzentrum, in der Tumordinvasionsfront und in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu dem angrenzenden Normalgewebe. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Dong et al. überein, die in 65 von 80 (81 %) untersuchten Patienten mit duktales Adenokarzinom des Pankreas immunhistochemisch eine erhöhte Gewebeexpression von Survivin feststellen konnten [145]. Die Mehrheit dieser Patienten (61,5 %) wies gleichzeitig erhöhte Serumspiegel von Survivin auf, und es konnte eine signifikante Assoziation zwischen beiden Parametern gezeigt werden. Allerdings wurde in der Studie nicht zwischen zytoplasmatischem und nukleärem Survivin differenziert.

Eine positive Expressionsrate für Survivin von 76,9 % konnten Satoh et al. in duktalem Pankreasadenokarzinomen und intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien des Pankreas zeigen. In dieser Studie war Survivin überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert [156]. Eine hohe Survivinexpression wurde durch Immunoblotting häufiger in malignen als benignen Tumoren beobachtet und korrelierte in Pankreasadenokarzinomen mit einem reduzierten apoptotischen Index. Sarela et al. berichteten ähnlich hohe Expressionsraten von Survivin in 88 % der untersuchten Gewebe. Die Färbung war auch hier überwiegend zytoplasmatisch, während nukleäres Survivin nur in einigen wenigen Zellen detektiert wurde [146]. Die gewichteten Scores der Survivinexpression zeigten einen höheren Proliferationsindex bei hoher Survivinexpression, aber auch einen signifikant höheren apoptotischen Index. Lee et al. konnten Survivin in 93,9 % der untersuchten Gewebeproben immunhistochemisch nachweisen, ohne eine Differenzierung zwischen nukleärem und zytoplasmatischem Survivin vorzunehmen [148]. Ein Nachteil dieser drei initialen immunhistochemischen Untersuchungen war die geringe Patientenzahl (Satoh et al.: 26 Patienten, Sarela et al.: 52 Patienten, Lee et al.: 49 Patienten) im Vergleich zu unseren 236 Patienten.

Eine vergleichbar große Kohorte von 306 Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas wurde im Jahr 2018 in China auf die Survivinexpression im Tumorgewebe untersucht [158]. Die Expression von nukleärem Survivin konnte hier sowohl in Tumorgewebe als auch in Normalgewebe demonstriert werden, mit einer signifikant höheren Expression in Karzinomen, basierend auf dem H-Score der immunhistochemischen Färbung. Es sollte in diesem Zusammenhang allerdings erwähnt werden, dass diese Studie entscheidende Variablen wie den Resektionsstatus, die Perineuralscheideninvasion, die Neuaufgabe der UICC-Stadieneinteilung und die neoadjuvante Therapie nicht in der multivariaten Analyse berücksichtigten.

Die Unterschiede zwischen der vorliegenden Studie und den vorhergehenden Untersuchungen bezüglich der beobachteten Lokalisation von Survivin im Tumorgewebe könnten möglicherweise auf die Sensitivität der verwendeten Antikörper zurückzuführen sein, die sich in allen Studien unterschieden (diese Studie: Novus Biologicals; Dong et al.: keine Angabe; Lee et al.: NeoMarkers; Satoh et al.: Alpha Diagnostic International; Sarela et al.: Autogen Bioclear; Zhou et al.: CellSignaling Technology). Die differenzierte Lokalisation von Survivin spielt allerdings eine entscheidende Rolle bei der Bewertung

der Eignung dieses Proteins als Tumormarker, da zytoplasmatisches und nukleäres Survivin möglicherweise von unterschiedlicher biologischer Relevanz sind [118].

Allen Studien von Survivin im duktalem Adenokarzinom des Pankreas ist aber gemein, dass sie eine im Vergleich zum Normalgewebe höhere Expression von Survivin im Tumorgewebe demonstrieren konnten. In der vorliegenden Studie wurde aufgrund dieser Beobachtung eine Korrelationsanalyse der Survivinexpression mit den klinisch-pathologischen Parametern der Patienten durchgeführt. Hier zeigte sich eine signifikante Korrelation von zytoplasmatischem Survivin mit einem fortgeschrittenen UICC-Stadium (Abb. 7). Eine derartige Korrelation konnte in unserer Arbeitsgruppe u.a. bereits für das Ösophaguskarzinom [137] sowie für das follikuläre [136] und medulläre [134] Schilddrüsenkarzinom nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse finden sich auch für das Magenkarzinom [159], Mammakarzinom [111] und das Nierenzellkarzinom [160]. Eine Studie an Gewebeproben von Patienten mit Pankreaskarzinom konnte allerdings keinen derartigen Zusammenhang finden, allerdings schreiben die Autoren dieser Studie dies der vergleichsweise kleinen Studienkohorte von 80 Patienten zu [145].

Ein solcher Zusammenhang ließe sich so interpretieren, dass die Expression von Survivin mit der Tumorprogression assoziiert ist. Im Umkehrschluß bedeutet dies: Ist die Survivinexpression sehr hoch, liegt wahrscheinlich bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium vor. Hierfür sprechen auch die signifikant erhöhte Survivinexpression in Lymphknotenmetastasen und die signifikanten Korrelationen zwischen der Survivinexpression mit der synchronen Fernmetastasierung und der Perineuralscheideninvasion (Abb. 5 und 6, Tabelle 4).

#### **4.2 Survivin als prognostischer Prädiktor für Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas**

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war es, die Wertigkeit von Survivin als prognostischen Faktor für das Überleben von Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu beurteilen. Die Intention für diese Analyse ist ein trotz intensiver Forschungen bestehender Mangel an zuverlässigen prognostischen Markern, die eine prädiktive Aussage zum Überleben der Patienten mit diesem Karzinom zulassen. Zahlreiche Studien haben sich bis heute mit der Analyse von potenziellen Tumormarkern, insbesondere dem *carcinoembryonic antigen* und *carbohydrate antigen 19.9* [161, 162] befasst, jedoch gibt es immer noch keinen eindeutigen Konsens zu der Zuverlässigkeit solcher Marker.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst in einer Analyse des Gesamtüberlebens solche Faktoren untersucht, die möglicherweise als Indikator für das Überleben der hier betrachteten Patientenkohorte gesehen werden können. In der univariaten Analyse korrelierten ein hohes Alter zum Zeitpunkt der Operation, das Vorhandensein von tumorpositiven Schnitträndern nach der Resektion, das Auftreten von Fernmetastasen sowie die Veneninvasion mit dem Gesamtüberleben. In der multivariaten Analyse hielt diese Korrelation für das Alter, den Resektionsstatus und die Veneninvasion stand (Tabelle 6). Die hier beobachtete positive Korrelation zwischen R0-Resektionen und dem Gesamtüberleben ist im Einklang mit vorherigen Analysen von Einflussfaktoren auf das 5-Jahres-Überleben nach kurativer Operation eines Pankreaskarzinoms [163-165]. Auch die Korrelation zwischen einem kürzeren Gesamtüberleben und dem höheren Lebensalter zum Zeitpunkt des kurativen Eingriffs wurde bereits beschrieben [166].

Um die mögliche Rolle von Survivin als prognostischen Faktor näher zu beleuchten, wurden in einer Subgruppenanalyse eventuell bestehende Korrelationen zwischen dem Gesamtüberleben und einer erhöhten Survivinexpression untersucht. Hierbei wurde zwischen der nukleären und zytoplasmatischen Expression von Survivin differenziert. Eine erhöhte zytoplasmatische Survivinexpression in der Tumordinvasionsfront korrelierte in der univariaten Analyse signifikant mit dem Gesamtüberleben, und zwar in allen R0 resezidierten Patienten, in der Subgruppe der R0+M0-Patienten, in der Subgruppe der M0-Patienten und in Patienten mit einem Pankreasschwanzkarzinom (Tabelle 7, Abb. 9 und 10). In der multivariaten Überlebensanalyse konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Interessanterweise zeigte sich jedoch in der Subgruppe der Pankreasschwanzkarzinome eine höhere nukleäre Survivinexpression im Tumorzentrum als zusätzlicher negativ prädiktiver Wert für das Gesamtüberleben (Tabelle 8).

Die Assoziation einer erhöhten Survivinexpression mit einer verringerten Gesamtüberlebensrate konnte bereits für andere Karzinomarten gezeigt werden, z. B. für das Magenkarzinom [109], das medulläre Schilddrüsenkarzinom [134] und das kolorektale Karzinom [133]. Untersuchungen am Pankreaskarzinom konnten bisher nicht immer eine solche Korrelation nachweisen. Lee et al. fanden keine signifikante Korrelation zwischen der Überlebensrate und der Survivinexpression, allerdings waren in dieser Studie nahezu alle Gewebeproben positiv für Survivin, sodass Patienten mit einer Survivinexpression mit nur drei Patienten ohne detektierbare Survivinexpression verglichen wurden [148]. Im Gegensatz dazu fanden Dong et al. eine längere kumulative

Überlebensdauer von Patienten mit niedrigen Serum-Survivin im Vergleich zu solchen mit erhöhtem Survivin im Blut, sowie Patienten mit einer niedrigen Gewebeexpression von Survivin im Vergleich zu solchen mit einer hohen Expression des Proteins [145].

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der Survivinexpression mit dem Gesamtüberleben waren nur in der univariaten Analyse signifikant, und in der multivariaten Analyse stellte sich Survivin nicht als unabhängiger prognostischer Faktor heraus. Die an die Analyse des Gesamtüberlebens anschließende differenzierte Betrachtung des krankheitsfreien Überlebens konnte hingegen demonstrieren, dass eine hohe nukleäre Survivinexpression ein geeigneter prognostischer Faktor ist (Tabelle 9, Abb. 11). In der univariaten Analyse korrelierte die nukleäre Survivinexpression sowohl im Tumorzentrum als auch der Tumordinvasionsfront signifikant mit dem krankheitsfreien Überleben, ebenso wie die Resektion mit tumorfreien Schnitträndern (R0) (Tabelle 6). Die multivariate Analyse bestätigte nukleäres Survivin im Tumorzentrum sowie das Vorhandensein tumorpositiver Resektionsränder (R1) als ungünstige prognostische Faktoren für das krankheitsfreie Überleben. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass je höher die nukleäre Survivinexpression im Tumorzentrum ist, desto wahrscheinlicher entwickelt ein Patient mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas Metastasen oder Rezidive nach der Operation. Eine derartige negative Korrelation zwischen einer hohen nukleären Survivinexpression und dem krankheitsfreien Überleben wurde bereits für andere Karzinomarten berichtet.

Marioni et al. konnten anhand immunhistochemischer Untersuchungen der nukleären Survivinexpression in Gewebeproben von Patienten mit einem Larynxkarzinom demonstrieren, dass eine hohe Expression von Survivin im Zellkern mit einer kürzeren krankheitsfreien Überlebensdauer assoziiert war [167].

Hu et al. analysierten die nukleäre Survivinexpression in nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und beobachteten in der univariaten und multivariaten Überlebensanalyse einen signifikanten negativen Zusammenhang zwischen einer hohen Survivinexpression und dem krankheitsfreien Überleben [168].

Skagias et al. quantifizierten sowohl nukleäres als auch zytoplasmatisches Survivin in Urothelkarzinomproben und fanden neben dem Tumorgrad und -stadium eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs bei hoher nukleärer Survivinexpression [169].

Im Gegensatz dazu konnte für andere Karzinomarten kein signifikanter Zusammenhang zwischen nukleärem Survivin und dem Gesamt- oder krankheitsfreien Überleben hergestellt werden. Cohen et al. zeigten anhand von Survivinfärbungen von Gewebeproben von Patienten mit einem Ovarialkarzinom zwar die Wertigkeit von Survivin als prognostischen Marker für verschiedenste Parameter wie Tumorstadium, Histologie, und einer vorliegenden p53-Mutation auf, fanden aber keinen signifikanten Zusammenhang mit der Überlebensrate [170]. Die prognostische Eignung von nukleärem Survivin als Tumormarker muss demzufolge differenziert bewertet werden und hängt möglicherweise von der Karzinomart ab.

Entsprechend unseren Ergebnissen besteht eine solche signifikante, negative Korrelation zwischen einer hohen Survivinexpression und dem krankheitsfreien Überleben anscheinend ausschließlich für nukleäres Survivin, nicht aber für zytoplasmatisches Survivin [169, 171]. Bei dieser Schlussfolgerung muss aber berücksichtigt werden, dass viele Studien nicht zwischen beiden Lokalisationen differenzieren und die Gesamtexpression darstellen [145].

Bei der Bewertung dieser Unterschiede zwischen den Analysen des krankheitsfreien und Gesamtüberlebens bleibt außerdem zu beachten, dass das krankheitsfreie Überleben nicht immer zuverlässig mit dem Gesamtüberleben korreliert. In einer Metaanalyse von 12 randomisierten klinischen Studien mit insgesamt 4,888 Pankreaskarzinompatienten konnte nur eine schwache Korrelation zwischen dem individuellen krankheitsfreien und Gesamtüberleben festgestellt werden, und eine nur moderate Korrelation zwischen beiden Überlebensanalysen bei einer Betrachtung der gesamten Studienpopulation [172].

### **4.3 Bedeutung in der Perineuralscheideninvasion**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hohe Survivinexpression im Tumorzentrum und in der Tumordinvasionsfront mit einer Perineuralscheideninvasion assoziiert waren (Abb. 8). Ein derartiger Zusammenhang zwischen der Survivinexpression im Pankreaskarzinom und der Präsenz von Perineuralscheideninvasionen ist im Einklang mit vorherigen Studien. Sowohl Dong et al. [145] als auch Ren et al. [157] berichteten von einer signifikanten Korrelation erhöhter Survivinlevel im Blut von Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas mit dem Auftreten einer perineuralen Invasion. Ebenso wurde eine höhere Gewebeexpression von Survivin in Patienten mit einer Perineuralscheideninvasion

beobachtet [145]. Lee et al. identifizierten ebenfalls ein signifikant häufigeres Auftreten einer Perineuralscheideninvasion in Patienten mit Survivin-positiven Gewebeproben [148].

Die neurale Invasion ist eine für das Pankreaskarzinom typische Metastasierung, und die perineurale Invasion wird zur Prognose des Rezidivrisikos von Patienten nach der Resektion herangezogen [173]. Die Korrelation einer erhöhten Survivinexpression mit dem Auftreten der Perineuralscheideninvasion unterstreicht die potenzielle Rolle dieses Proteins in der Onkogenese des duktales Adenokarzinoms des Pankreas und könnte Survivin zu einem geeigneten Marker für die Diagnose derartiger Metastasen machen.

#### **4.4 Inhibition von Survivin als Therapie des duktales Pankreasadenokarzinoms**

Der Fokus dieser Studie lag auf einer Expressionsanalyse von Survivin in Gewebeproben von Patienten mit einem duktales Adenokarzinom des Pankreas. Die beobachtete Überexpression dieses Proteins und Assoziation mit einem fortgeschrittenen, invasiven und metastasierten Tumorphänotyp stellen erste Hinweise für eine Rolle von Survivin in der Onkogenese des Pankreaskarzinoms dar. Mechanistische Studien der Auswirkungen einer Survivin-inhibition in dieser Karzinomart könnten in Zukunft interessante Anhaltspunkte zur Wirksamkeit einer Zieltherapie mit diesem Protein liefern.

Derartige Studien wurden bereits *in vitro* an Pankreaskarzinom-Zelllinien durchgeführt und scheinen erste Indizien für einen therapeutischen Ansatz liefern zu können. Der Knockdown von Survivin mittels siRNA in AsPC-1-Zellen führte zu einer gesteigerten Sensitivität dieser Zellen gegenüber einer Bestrahlung [174, 175]. Ein derartiger Knockdown von Survivin in PC-2-Zellen in Kombination mit einer Radiotherapie erhöhte den Anteil an apoptotischen Zellen [176]. Die Antagonisierung von Survivin durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden führte zu einer erhöhten TRAIL-induzierten Apoptose der MiaPaCa2-Tumorzellen [177]. Eine verminderte Expression von Survivin durch Transfektion der PANC-1- und BxPC3-Zellen mit einem Survivin-siRNA-Plasmid resultierte in spontaner Apoptose, Zellzyklusarrest, verringertem Zellwachstum und einer höheren Sensitivität gegenüber einer Chemotherapie mit Gemcitabin [178]. Ähnliche Beobachtungen einer erhöhten Apoptoserate und eines inhibierten Zellwachstums wurden in PANC-1-Zellen gemacht, die durch Transfektion mit einem Survivin-mRNA-spezifischen DNAzym eine verminderte Survivinexpression aufwiesen [179]. Shen et al. konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, dass Transfektion von

Pankreaskarzinomzellen mit einem gegen Survivin gerichteten Small-hairpin-RNA-Vektor zu einer verminderten Proliferation und einem verringerten Zell- bzw. Tumorwachstum in Patu8988-Zellen und BALB/c-Mäusen führt [180]. Ein derartiger Knockdown erscheint besonders vielversprechend bei gleichzeitiger Inhibition der Expression mehrerer IAPs, insbesondere Survivin und XIAP in Anbetracht ihrer synergistischen Regulation der Apoptose [181].

Ein anderer Ansatz, der in einem Pankreaskarzinompatienten eine vollständige, wenn auch vorübergehende, Remission erzielen konnte, ist die Impfung mit Survivin-basierten Peptiden, allerdings ist dies der einzige bisher beschriebene Erfolg einer solchen Therapie [182]. Nichtsdestotrotz führte ein vergleichbarer Einsatz einer Survivin-Vaccination in Kombination mit einer Gemcitabin-basierten Chemotherapie zu einer verringerten Tumor-Immuntoleranz in C57BL/6-Mäusen [183].

Zusammenfassend erscheint eine Inhibition der Survivinexpression im Pankreaskarzinom besonders zielführend für die Verbesserung der Sensitivität gegenüber konservativen Behandlungsmethoden wie der Radio- und Chemotherapie. Es wird deutlich, dass der Einsatz multimodaler Therapien sich als vielversprechender Ansatz für eine verbesserte Prognose für Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas herauskristallisiert, und Survivin könnte sich als wichtiges Zielprotein im Rahmen einer solchen Therapie anbieten.

## 5 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Survivin in Gewebeproben von 236 Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas immunhistochemisch untersucht. Weiterhin wurde die Expression quantitativ kategorisiert und mit klinisch-pathologischen Parametern und dem Überleben korreliert.

Eine Überexpression von Survivin konnte sowohl im Blut als auch im Tumorgewebe von Pankreaskarzinompatienten bereits demonstriert werden, jedoch wurden die meisten Studien an einer vergleichsweise kleinen Studienkohorte durchgeführt und es wurde meistens nicht zwischen der zytoplasmatischen und der nukleären Lokalisation von Survivin unterschieden. Außerdem widersprechen sich die bisherigen Korrelationsanalysen von Survivin mit dem Tumorstadium.

Es konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse gezeigt werden, dass Survivin sowohl auf nukleärer als auch auf zytoplasmatischer Ebene in Gewebeproben von Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas überexprimiert ist. Dies traf sowohl auf das Tumorzentrum als auch auf die Tumorinvasionsfront und Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Pankreasgewebe zu. Ebenso korrelierte eine hohe zytoplasmatische Survivinexpression signifikant mit einem fortgeschrittenen UICC-Tumorstadium und mit dem Auftreten einer Perineuralscheideninvasion.

Unabhängige prognostische Faktoren für die kumulative Überlebensrate waren in der univariaten Analyse das Patientenalter zum Operationszeitpunkt, der Resektionsstatus und die mikroskopische Veneninvasion sowie die Fernmetastasierung. In der multivariaten Überlebensanalyse konnte das Alter, die Veneninvasion sowie der Resektionsstatus als prognostische Faktoren bestätigt werden. Die Wertigkeit von zytoplasmatischem Survivin als prognostischer Faktor im duktalem Adenokarzinom des Pankreas konnte in der univariaten Analyse des Gesamtüberlebens in der Subgruppe der R0-Resektionen, in der Subgruppe der M0-Patienten, in der Subgruppe der R0+M0-Patienten sowie in Patienten mit Pankreasschwanzkarzinomen bestätigt werden. In der multivariaten Subgruppenanalyse zeigte sich eine hohe nukleäre Survivinexpression im Tumorzentrum als prognostisch relevanter Faktor.

In der multivariaten Analyse des Gesamtüberlebens war Survivin hingegen kein unabhängiger prognostischer Faktor. Im Gegensatz dazu zeigte eine Untersuchung des krankheitsfreien Überlebens sowohl in der univariaten als auch der multivariaten Analyse

einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen einer hohen nukleären Survivinexpression im Tumorzentrum und der krankheitsfreien Überlebensdauer.

Zudem unterstreichen die signifikanten Korrelationen zwischen der Survivinexpression mit dem Tumorstadium, der synchronen Fernmetastasierung und der Perineuralscheideninvasion eine potenzielle Rolle von Survivin in der Onkogenese dieses Karzinoms. Eine erhöhte Expression von Survivin könnte also auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium und invasivem Phänotyp hinweisen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Survivin in Kombination mit einer multimodalen Therapie als Zielstruktur in der Therapie des duktales Adenokarzinoms des Pankreas zukünftig eine zunehmende Rolle spielen könnte.

## Literaturverzeichnis

1. GeKiD. <https://www.gekid.de/>. 2019 [cited 2019 08.08.2019].
2. Seufferlein, T., et al., *Duktales Pankreaskarzinom*. Dtsch Arztebl International, 2014. **111**(22): p. 396-402.
3. Krebsregisterdaten, Z.f. *Bauchspeicheldrüsenkrebs*. 2014 [cited 2019; Available from: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html)].
4. Seufferlein, T., *S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom*. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und Deutsche Krebshilfe e.V., 2013.
5. Ryan, D.P., T.S. Hong, and N. Bardeesy, *Pancreatic adenocarcinoma*. N Engl J Med, 2014. **371**(11): p. 1039-49.
6. Luttges, J., et al., *Rare ductal adenocarcinoma of the pancreas in patients younger than age 40 years*. Cancer, 2004. **100**(1): p. 173-82.
7. Becker, A.E., et al., *Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(32): p. 11182-98.
8. Pinho, A.V., L. Chantrill, and I. Rooman, *Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2014. **345**(2): p. 203-9.
9. Andersen, D.K., et al., *Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer*. Diabetes, 2017. **66**(5): p. 1103-1110.
10. Wood, L.D., M.B. Yurgelun, and M.G. Goggins, *Genetics of Familial and Sporadic Pancreatic Cancer*. Gastroenterology, 2019. **156**(7): p. 2041-2055.
11. Klein, A.P., et al., *Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2634-8.
12. Matsubayashi, H., *Familial pancreatic cancer and hereditary syndromes: screening strategy for high-risk individuals*. J Gastroenterol, 2011. **46**(11): p. 1249-59.
13. Matsubayashi, H., et al., *Familial pancreatic cancer: Concept, management and issues*. World J Gastroenterol, 2017. **23**(6): p. 935-948.
14. Rebours, V., et al., *Risk of pancreatic adenocarcinoma in patients with hereditary pancreatitis: a national exhaustive series*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(1): p. 111-9.
15. Giardiello, F.M., et al., *Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome*. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1447-53.
16. Vasen, H.F., et al., *Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden)*. Int J Cancer, 2000. **87**(6): p. 809-11.
17. Kastrinos, F., et al., *Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome*. Jama, 2009. **302**(16): p. 1790-5.
18. Iqbal, J., et al., *The incidence of pancreatic cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. Br J Cancer, 2012. **107**(12): p. 2005-9.
19. Jones, S., et al., *Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene*. Science, 2009. **324**(5924): p. 217.
20. Caldas, C., et al., *Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma*. Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 27-32.
21. Schutte, M., et al., *Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas*. Cancer Res, 1997. **57**(15): p. 3126-30.

22. Martin, S.T., et al., *Increased prevalence of the BRCA2 polymorphic stop codon K3326X among individuals with familial pancreatic cancer*. *Oncogene*, 2005. **24**(22): p. 3652-6.
23. Figer, A., et al., *The rate of the 6174delT founder Jewish mutation in BRCA2 in patients with non-colonic gastrointestinal tract tumours in Israel*. *Br J Cancer*, 2001. **84**(4): p. 478-81.
24. Luttges, J. and G. Kloppel, *[Pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursors]*. *Pathologe*, 2005. **26**(1): p. 12-7.
25. Bertero, L., et al., *Eighth Edition of the UICC Classification of Malignant Tumours: an overview of the changes in the pathological TNM classification criteria-What has changed and why?* *Virchows Arch*, 2018. **472**(4): p. 519-531.
26. Hruban, R.H., et al., *Progression model for pancreatic cancer*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(8): p. 2969-72.
27. Dunne, R.F. and A.F. Hezel, *Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2015. **29**(4): p. 595-608.
28. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. *N Engl J Med*, 1988. **319**(9): p. 525-32.
29. Heinzl, S., *[Cervical intra-epithelial neoplasia]*. *Ther Umsch*, 1989. **46**(12): p. 839-46.
30. Bostwick, D.G. and M.K. Brawer, *Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer*. *Cancer*, 1987. **59**(4): p. 788-94.
31. Cowell, C.F., et al., *Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: revisited*. *Mol Oncol*, 2013. **7**(5): p. 859-69.
32. Yamaguchi, J., et al., *Cells of origin of pancreatic neoplasms*. *Surg Today*, 2018. **48**(1): p. 9-17.
33. Ott, C., et al., *[Intraepithelial neoplasms (PanIN) and intraductal papillary-mucinous neoplasms (IPMN) of the pancreas as precursor lesions of pancreatic carcinoma]*. *Med Klin (Munich)*, 2007. **102**(2): p. 127-35.
34. Ormanns, S.E., I.; Siveke, J.T.; Kirchner, T.; Neumann, J., *Pathologie und Molekularpathologie des Pankreaskarzinoms*. *Trillium Krebsmedizin*, 2014. **23**(3): p. 110-115.
35. Cong, L., et al., *Tumor size classification of the 8(th) edition of TNM staging system is superior to that of the 7(th) edition in predicting the survival outcome of pancreatic cancer patients after radical resection and adjuvant chemotherapy*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 10383.
36. Kleeff, J., et al., *Pancreatic cancer*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16022.
37. Wolfgang, C.L., et al., *Recent progress in pancreatic cancer*. *CA Cancer J Clin*, 2013. **63**(5): p. 318-48.
38. Lennon, A.M., et al., *The early detection of pancreatic cancer: what will it take to diagnose and treat curable pancreatic neoplasia?* *Cancer Res*, 2014. **74**(13): p. 3381-9.
39. Harinck, F., et al., *A multicentre comparative prospective blinded analysis of EUS and MRI for screening of pancreatic cancer in high-risk individuals*. *Gut*, 2016. **65**(9): p. 1505-13.
40. He, J., et al., *2564 resected periampullary adenocarcinomas at a single institution: trends over three decades*. *HPB (Oxford)*, 2014. **16**(1): p. 83-90.
41. Beger, H.G., et al., *Pancreatic cancer--low survival rates*. *Dtsch Arztebl Int*, 2008. **105**(14): p. 255-62.
42. Neoptolemos, J.P., et al., *Effect of adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid or gemcitabine vs observation on survival in patients with resected*

- periampullary adenocarcinoma: the ESPAC-3 periampullary cancer randomized trial.* *Jama*, 2012. **308**(2): p. 147-56.
43. Neoptolemos, J.P., et al., *A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer.* *N Engl J Med*, 2004. **350**(12): p. 1200-10.
  44. Oettle, H., et al., *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial.* *Jama*, 2013. **310**(14): p. 1473-81.
  45. Heinrich, S. and H. Lang, *Neoadjuvant Therapy of Pancreatic Cancer: Definitions and Benefits.* *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(8).
  46. Xu, C.P., et al., *Effect of chemoradiotherapy and neoadjuvant chemoradiotherapy in resectable pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis.* *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014. **140**(4): p. 549-59.
  47. Ambe, C., et al., *A Meta-analysis of Randomized Clinical Trials of Chemoradiation Therapy in Locally Advanced Pancreatic Cancer.* *J Gastrointest Cancer*, 2015. **46**(3): p. 284-90.
  48. Chan, K.K.W., et al., *Real-world outcomes of FOLFIRINOX vs gemcitabine and nab-paclitaxel in advanced pancreatic cancer: A population-based propensity score-weighted analysis.* *Cancer Med*, 2020. **9**(1): p. 160-169.
  49. Von Hoff, D.D., et al., *Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine.* *N Engl J Med*, 2013. **369**(18): p. 1691-703.
  50. Conroy, T., et al., *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer.* *N Engl J Med*, 2011. **364**(19): p. 1817-25.
  51. Burris, H.A., 3rd, et al., *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial.* *J Clin Oncol*, 1997. **15**(6): p. 2403-13.
  52. Wang-Gillam, A., et al., *Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial.* *Lancet*, 2016. **387**(10018): p. 545-557.
  53. Tanaka, S., *Molecular Pathogenesis and Targeted Therapy of Pancreatic Cancer.* *Ann Surg Oncol*, 2016. **23 Suppl 2**: p. S197-205.
  54. Ozmen, F., T.T. Sahin, and M.M. Ozmen, *Current adjuvant therapeutic approaches for pancreatic cancer.* *Adv Ther*, 2015. **32**(1): p. 42-56.
  55. Wang, Y., et al., *Efficacy and safety of gemcitabine plus erlotinib for locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis.* *Drug Des Devel Ther*, 2016. **10**: p. 1961-72.
  56. Behl, C.Z., C., *Der Zellzyklus: Lebenszyklus einer Zelle*, in *Molekulare Mechanismen der Zellalterung und ihre Bedeutung für Alterserkrankungen des Menschen*, C.Z. Behl, C., Editor. 2016, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
  57. Sullivan, M. and D.O. Morgan, *Finishing mitosis, one step at a time.* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(11): p. 894-903.
  58. Bertoli, C., J.M. Skotheim, and R.A. de Bruin, *Control of cell cycle transcription during G1 and S phases.* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(8): p. 518-28.
  59. Hofbauer, R. and D.T. Denhardt, *Cell cycle-regulated and proliferation stimulus-responsive genes.* *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1991. **1**(4): p. 247-300.
  60. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.* *Cell Prolif*, 2003. **36**(3): p. 131-49.

61. Lundgren, K., et al., *mkl1 and weel cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1111-22.
62. Parker, L.L., et al., *Identification of a 95-kDa WEE1-like tyrosine kinase in HeLa cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(21): p. 9638-42.
63. Koff, A., et al., *Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle*. Science, 1992. **257**(5077): p. 1689-94.
64. Jackman, M., et al., *Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(3): p. 1030-45.
65. Boonstra, J., *Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle*. J Cell Biochem, 2003. **90**(2): p. 244-52.
66. Sicinski, P., et al., *Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast*. Cell, 1995. **82**(4): p. 621-30.
67. Arnaudeau, C., C. Lundin, and T. Helleday, *DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells*. J Mol Biol, 2001. **307**(5): p. 1235-45.
68. Cahill, D.P., et al., *Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 300-3.
69. Santo, L., K.T. Siu, and N. Raje, *Targeting Cyclin-Dependent Kinases and Cell Cycle Progression in Human Cancers*. Semin Oncol, 2015. **42**(6): p. 788-800.
70. Barr, P.J. and L.D. Tomei, *Apoptosis and its role in human disease*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(5): p. 487-93.
71. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-88.
72. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
73. Koff, J.L., S. Ramachandiran, and L. Bernal-Mizrachi, *A time to kill: targeting apoptosis in cancer*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(2): p. 2942-55.
74. Pecorino, L., *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*. 2012: Oxford University Press.
75. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 231-41.
76. Nagata, S., *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997. **88**(3): p. 355-65.
77. Cecconi, F., *Apaf1 and the apoptotic machinery*. Cell Death Differ, 1999. **6**(11): p. 1087-98.
78. Daugas, E., et al., *Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis*. FEBS Lett, 2000. **476**(3): p. 118-23.
79. Ceballos-Cancino, G., et al., *Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin*. Oncogene, 2007. **26**(54): p. 7569-75.
80. Segawa, K. and S. Nagata, *An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(11): p. 639-650.
81. Green, D.R., *Apoptosis: physiology and pathology*. 2011: Cambridge University Press.
82. Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 917-21.
83. Silke, J. and D. Vucic, *IAP family of cell death and signaling regulators*. Methods Enzymol, 2014. **545**: p. 35-65.
84. Hrdinka, M. and M. Yabal, *Inhibitor of apoptosis proteins in human health and disease*. Genes Immun, 2019.

85. Altieri, D.C., *Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms*. *Biochem J*, 2010. **430**(2): p. 199-205.
86. Roy, N., et al., *The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy*. *Cell*, 1995. **80**(1): p. 167-78.
87. Koonin, E.V. and L. Aravind, *The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation*. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(5): p. 223-4.
88. Vance, R.E., *The NAIP/NLRC4 inflammasomes*. *Curr Opin Immunol*, 2015. **32**: p. 84-9.
89. Finlay, D., et al., *Inducing death in tumor cells: roles of the inhibitor of apoptosis proteins*. *F1000Res*, 2017. **6**: p. 587.
90. Qiu, X.B. and A.L. Goldberg, *The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(1): p. 174-82.
91. Ma, L., et al., *Survivin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(12): p. 2079-88.
92. Richter, B.W., et al., *Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(13): p. 4292-301.
93. Shiozaki, E.N., et al., *Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9*. *Mol Cell*, 2003. **11**(2): p. 519-27.
94. Scott, F.L., et al., *XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs*. *Embo j*, 2005. **24**(3): p. 645-55.
95. Eckelman, B.P., G.S. Salvesen, and F.L. Scott, *Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(10): p. 988-94.
96. Deveraux, Q.L., et al., *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. *Nature*, 1997. **388**(6639): p. 300-4.
97. Baud, V. and M. Karin, *Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls*. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. **8**(1): p. 33-40.
98. Lu, M., et al., *XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization*. *Mol Cell*, 2007. **26**(5): p. 689-702.
99. Altieri, D.C., *Survivin - The inconvenient IAP*. *Semin Cell Dev Biol*, 2015. **39**: p. 91-6.
100. Nogueira-Ferreira, R., et al., *Exploring the role of post-translational modifications on protein-protein interactions with survivin*. *Arch Biochem Biophys*, 2013. **538**(2): p. 64-70.
101. Sah, N.K. and C. Seniya, *Survivin splice variants and their diagnostic significance*. *Tumour Biol*, 2015. **36**(9): p. 6623-31.
102. Krieg, A., et al., *Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression*. *Br J Cancer*, 2002. **86**(5): p. 737-43.
103. Ryan, B., et al., *Expression of survivin and its splice variants survivin-2B and survivin-DeltaEx3 in breast cancer*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(1): p. 120-4.
104. Antonacopoulou, A.G., et al., *The survivin -31 snp in human colorectal cancer correlates with survivin splice variant expression and improved overall survival*. *Cell Oncol (Dordr)*, 2011. **34**(4): p. 381-91.
105. Fukuda, S., et al., *The antiapoptosis protein survivin is associated with cell cycle entry of normal cord blood CD34(+) cells and modulates cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells*. *Blood*, 2002. **100**(7): p. 2463-71.

106. Fukuda, S. and L.M. Pelus, *Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis*. *Blood*, 2001. **98**(7): p. 2091-100.
107. Uren, A.G., et al., *Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype*. *Curr Biol*, 2000. **10**(21): p. 1319-28.
108. Velculescu, V.E., et al., *Analysis of human transcriptomes*. *Nat Genet*, 1999. **23**(4): p. 387-8.
109. Krieg, A., et al., *Role of survivin as prognostic and clinicopathological marker in gastric cancer: a meta-analysis*. *Mol Biol Rep*, 2013. **40**(9): p. 5501-11.
110. Li, W., et al., *Clinicopathologic Significance of Survivin Expression in Relation to CD133 Expression in Surgically Resected Stage II or III Colorectal Cancer*. *J Pathol Transl Med*, 2017. **51**(1): p. 17-23.
111. Li, S., et al., *Increased levels of LAPTM4B, VEGF and survivin are correlated with tumor progression and poor prognosis in breast cancer patients*. *Oncotarget*, 2017. **8**(25): p. 41282-41293.
112. Wheatley, S.P. and D.C. Altieri, *Survivin at a glance*. *J Cell Sci*, 2019. **132**(7).
113. Li, F., et al., *Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin*. *Nature*, 1998. **396**(6711): p. 580-4.
114. Boidot, R., F. Vegrán, and S. Lizard-Nacol, *Transcriptional regulation of the survivin gene*. *Mol Biol Rep*, 2014. **41**(1): p. 233-40.
115. Jeyaprasanth, A.A., et al., *Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together*. *Cell*, 2007. **131**(2): p. 271-85.
116. Bolton, M.A., et al., *Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(9): p. 3064-77.
117. Giodini, A., et al., *Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin*. *Cancer Res*, 2002. **62**(9): p. 2462-7.
118. Li, F., et al., *Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance?* *Int J Cancer*, 2005. **114**(4): p. 509-12.
119. Dohi, T., et al., *Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(8): p. 1117-27.
120. Stauber, R.H., W. Mann, and S.K. Knauer, *Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential*. *Cancer Res*, 2007. **67**(13): p. 5999-6002.
121. Connell, C.M., S.P. Wheatley, and I.A. McNeish, *Nuclear survivin abrogates multiple cell cycle checkpoints and enhances viral oncolysis*. *Cancer Res*, 2008. **68**(19): p. 7923-31.
122. Labarrade, F., J.M. Botto, and N. Domloge, *CRM1 and chromosomal passenger complex component survivin are essential to normal mitosis progress and to preserve keratinocytes from mitotic abnormalities*. *Int J Cosmet Sci*, 2016. **38**(5): p. 452-61.
123. Suzuki, A., et al., *Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation*. *Oncogene*, 2000. **19**(29): p. 3225-34.
124. Babkoff, A., et al., *A direct interaction between survivin and myosin II is required for cytokinesis*. *J Cell Sci*, 2019. **132**(14).

125. Marusawa, H., et al., *HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression*. *Embo j*, 2003. **22**(11): p. 2729-40.
126. Srinivasula, S.M., et al., *A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis*. *Nature*, 2001. **410**(6824): p. 112-6.
127. Mehrotra, S., et al., *IAP regulation of metastasis*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(1): p. 53-64.
128. Song, Z., et al., *A single amino acid change (Asp 53 --> Ala53) converts Survivin from anti-apoptotic to pro-apoptotic*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(3): p. 1287-96.
129. Pavlyukov, M.S., et al., *Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(26): p. 23296-307.
130. Ghosh, J.C., et al., *Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(8): p. 5188-94.
131. Fortugno, P., et al., *Regulation of survivin function by Hsp90*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(24): p. 13791-6.
132. Kang, B.H. and D.C. Altieri, *Regulation of survivin stability by the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(34): p. 24721-7.
133. Krieg, A., et al., *Prognostic and clinicopathological significance of survivin in colorectal cancer: a meta-analysis*. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e65338.
134. Werner, T.A., et al., *Survivin and XIAP: two valuable biomarkers in medullary thyroid carcinoma*. *Br J Cancer*, 2016. **114**(4): p. 427-34.
135. Dizdar, L., et al., *Preclinical assesement of survivin and XIAP as prognostic biomarkers and therapeutic targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia*. *Oncotarget*, 2017. **8**(5): p. 8369-8382.
136. Werner, T.A., et al., *Survivin and XIAP - two potential biological targets in follicular thyroid carcinoma*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 11383.
137. Dizdar, L., et al., *Clinicopathological and functional implications of the inhibitor of apoptosis proteins survivin and XIAP in esophageal cancer*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(3): p. 3779-3789.
138. Coumar, M.S., et al., *Treat cancers by targeting survivin: just a dream or future reality?* *Cancer Treat Rev*, 2013. **39**(7): p. 802-11.
139. Pennati, M., M. Folini, and N. Zaffaroni, *Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(6): p. 1133-9.
140. Ryan, B.M., N. O'Donovan, and M.J. Duffy, *Survivin: a new target for anti-cancer therapy*. *Cancer Treat Rev*, 2009. **35**(7): p. 553-62.
141. Xiao, M. and W. Li, *Recent Advances on Small-Molecule Survivin Inhibitors*. *Curr Med Chem*, 2015. **22**(9): p. 1136 - 1146.
142. Wang, W., et al., *Survivin Inhibitors Mitigate Chemotherapeutic Resistance in Breast Cancer Cells by Suppressing Genotoxic Nuclear Factor-kappaB Activation*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2018. **366**(1): p. 184-193.
143. Li, W.L., M.R. Lee, and M.Y. Cho, *The small molecule survivin inhibitor YM155 may be an effective treatment modality for colon cancer through increasing apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. **471**(2): p. 309-14.
144. Zhang, S., et al., *Small Molecule Survivin Inhibitor YM155 Displays Potent Activity Against Human Osteosarcoma Cells*. *Cancer Invest*, 2016. **34**(8): p. 401-7.
145. Dong, H., et al., *Survivin expression and serum levels in pancreatic cancer*. *World J Surg Oncol*, 2015. **13**: p. 189.

146. Sarela, A.I., et al., *Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma*. Br J Cancer, 2002. **86**(6): p. 886-92.
147. Kami, K., et al., *Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients*. Surgery, 2004. **136**(2): p. 443-8.
148. Lee, M.A., et al., *Survivin expression and its clinical significance in pancreatic cancer*. BMC Cancer, 2005. **5**: p. 127.
149. Tonini, G., et al., *Nuclear and cytoplasmic expression of survivin in 67 surgically resected pancreatic cancer patients*. Br J Cancer, 2005. **92**(12): p. 2225-32.
150. Sun, H.C., et al., *Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and associated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma and their impact on prognosis*. Int J Oncol, 2007. **30**(6): p. 1359-67.
151. Xie, H., et al., *High expression of survivin is prognostic of shorter survival but not predictive of adjuvant gemcitabine benefit in patients with resected pancreatic adenocarcinoma*. J Histochem Cytochem, 2013. **61**(2): p. 148-55.
152. Argon, A., et al., *The prognostic significance of clinicopathological features and apoptosis inhibitor proteins in pancreas ductal adenocarcinoma*. Acta Gastroenterol Belg, 2014. **77**(2): p. 229-34.
153. Kimura, T., et al., *The combination of strong immunohistochemical mtTFA expression and a high survivin index predicts a shorter disease-specific survival in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Histol Histopathol, 2015. **30**(2): p. 193-204.
154. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
155. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer Statistics, 2017*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(1): p. 7-30.
156. Satoh, K., et al., *Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors*. Cancer, 2001. **92**(2): p. 271-8.
157. Ren, Y.Q., et al., *Clinical significance of serum survivin in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014. **18**(20): p. 3063-8.
158. Zhou, L., et al., *High nuclear Survivin expression as a poor prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma*. J Surg Oncol, 2018. **118**(7): p. 1115-1121.
159. Deng, H., et al., *Significance of Survivin and PTEN expression in full lymph node-examined gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(7): p. 1013-7.
160. Pu, Z., et al., *Clinicalpathological and prognostic significance of survivin expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis*. Oncotarget, 2017. **8**(12): p. 19825-19833.
161. Meng, Q., et al., *Diagnostic and prognostic value of carcinoembryonic antigen in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 4591-4598.
162. Humphris, J.L., et al., *The prognostic and predictive value of serum CA19.9 in pancreatic cancer*. Ann Oncol, 2012. **23**(7): p. 1713-22.
163. Conlon, K.C., D.S. Klimstra, and M.F. Brennan, *Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors*. Ann Surg, 1996. **223**(3): p. 273-9.

164. Kimura, K., et al., *Clinical and pathological features of five-year survivors after pancreatectomy for pancreatic adenocarcinoma*. World J Surg Oncol, 2014. **12**: p. 360.
165. Katz, M.H., et al., *Long-term survival after multidisciplinary management of resected pancreatic adenocarcinoma*. Ann Surg Oncol, 2009. **16**(4): p. 836-47.
166. Tas, F., et al., *Prognostic factors in metastatic pancreatic cancer: Older patients are associated with reduced overall survival*. Mol Clin Oncol, 2013. **1**(4): p. 788-792.
167. Marioni, G., et al., *Nuclear survivin expression correlates with endoglin-assessed microvascularisation in laryngeal carcinoma*. J Clin Pathol, 2017. **70**(12): p. 1033-1037.
168. Hu, S., et al., *Nuclear survivin and its relationship to DNA damage repair genes in non-small cell lung cancer investigated using tissue array*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74161.
169. Skagias, L., et al., *Survivin expression as a strong indicator of recurrence in urothelial bladder cancer. Predictive value of nuclear versus cytoplasmic staining*. Anticancer Res, 2009. **29**(10): p. 4163-7.
170. Cohen, C., et al., *Survivin expression in ovarian carcinoma: correlation with apoptotic markers and prognosis*. Mod Pathol, 2003. **16**(6): p. 574-83.
171. Bria, E., et al., *Nuclear and cytoplasmic cellular distribution of survivin as survival predictor in resected non-small-cell lung cancer*. Eur J Surg Oncol, 2008. **34**(5): p. 593-8.
172. Petrelli, F., et al., *Disease-free survival is not a surrogate endpoint for overall survival in adjuvant trials of pancreatic cancer: a systematic review of randomized trials*. HPB (Oxford), 2017. **19**(11): p. 944-950.
173. Liu, B. and K.Y. Lu, *Neural invasion in pancreatic carcinoma*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2002. **1**(3): p. 469-76.
174. Asanuma, K., et al., *Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer*. Jpn J Cancer Res, 2000. **91**(11): p. 1204-9.
175. Kami, K., et al., *Downregulation of survivin by siRNA diminishes radioresistance of pancreatic cancer cells*. Surgery, 2005. **138**(2): p. 299-305.
176. Guan, H.T., et al., *Down-regulation of survivin expression by small interfering RNA induces pancreatic cancer cell apoptosis and enhances its radiosensitivity*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(18): p. 2901-7.
177. Fulda, S. and K.M. Debatin, *Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol*. Cancer Res, 2004. **64**(1): p. 337-46.
178. Liu, W.S., et al., *siRNA directed against survivin enhances pancreatic cancer cell gemcitabine chemosensitivity*. Dig Dis Sci, 2009. **54**(1): p. 89-96.
179. Liang, Z., et al., *DNAzyme-mediated cleavage of survivin mRNA and inhibition of the growth of PANC-1 cells*. J Gastroenterol Hepatol, 2005. **20**(10): p. 1595-602.
180. Shen, Y.M., et al., *Growth inhibition induced by short hairpin RNA to silence survivin gene in human pancreatic cancer cells*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2010. **9**(1): p. 69-77.
181. Yang, J., et al., *Inhibition of cell proliferation and increase of chemosensitivity by simultaneous knockdown of XIAP and survivin in pancreatic carcinoma cells*. Oncol Res, 2013. **21**(1): p. 43-50.
182. Wobser, M., et al., *Complete remission of liver metastasis of pancreatic cancer under vaccination with a HLA-A2 restricted peptide derived from the universal tumor antigen survivin*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(10): p. 1294-8.

- 
183. Ishizaki, H., et al., *Modified vaccinia Ankara expressing survivin combined with gemcitabine generates specific antitumor effects in a murine pancreatic carcinoma model*. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. **60**(1): p. 99-109.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Speziell möchte ich mich beim Herrn Prof. Dr. Andreas Krieg bedanken. Die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit und sein Engagement trugen im Wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ganz besonders danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel für die Kooperation und die Möglichkeit der Arbeit in der chirurgischen Abteilung des Universitätsklinikum Düsseldorf.

Nicht zuletzt möchte ich Frau Univ.-Prof. Dr. Irene Esposito für Ihre Unterstützung und den Zugang zu den pathologischen Präparaten meinen Dank ausdrücken.