

Aus dem Institut für Pathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Institutsleiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Irene Esposito

**Prognostische Relevanz der Hvgl-1 Expression  
beim Pankreaskarzinom**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Carmen Kost  
2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

„Vor einem Geist, der still ist, kapituliert das ganze Universum.“  
(Lao Tzu)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Biesterfeld S, Kauhausen A, Kost C, Gockel I, Schimanski CC, Galle PR, (2012): *Preservation of Hsp1-1 expression as favourable prognostic factor in pancreatic carcinoma. Anticancer Research August 2012; 32 (8) 3153-3159*

## Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom gehört zu den menschlichen Tumoren mit der insgesamt schlechtesten Prognose aller gastrointestinalen Karzinome. Aufgrund der begrenzten Möglichkeiten frühzeitig kurativ operable Patienten im Sinne eines *Screenings* zu erfassen und dem Fehlen charakteristischer Frühsymptome, liegt die mediane Überlebenszeit zum Zeitpunkt der Diagnose in den meisten Fällen bei weniger als 6 Monaten. Bisherige Versuche, eine adäquate Therapie mit kurativem Ansatz zu erzeugen, haben zu keiner deutlichen Verbesserung der Prognose geführt. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit neue Prognosefaktoren zu identifizieren. In der vorliegenden Studie wurde das humane Homolog des *Drosophila lethal giant larvae* (lgl) Tumorsuppressorgens Hugl-1 erstmalig auf seine Fähigkeit als Prognosefaktor beim Pankreaskarzinom untersucht, nachdem es bereits mit klinischen Verläufen anderer Tumoren korreliert wurde. Hierzu wurden retrospektiv Resektionspräparate von 97 Patienten mit chirurgisch behandeltem Pankreaskarzinom immunhistochemisch nach einem Standardprotokoll aufbereitet und hinsichtlich der Hugl-1 Expression im Vergleich mit Normalgewebe untersucht. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte semiquantitativ anhand von 4 Expressionsgraden: negativ (0), schwach (1), medium (2) und stark (3). Die Ergebnisse wurden mit den klinisch pathologischen Parametern und mit dem Überleben der Patienten korreliert. Der Beobachtungszeitraum betrug im Mittel 17 +/- 16 Monate. Im Ergebnis zeigte sich in normalem und entzündlichen Pankreasgewebe eine gleichmäßige mittlere bis starke Färbung aller epithelialen Gangstrukturen inklusive benachbarter Ganglionzellen und angrenzendem Drüsengewebe (Azinuszellen). Die endokrinen Inselzellen zeigten sich hingegen in ihrer Färbeeigenschaft schwach positiv. Aus den uns vorliegenden Tumorproben, gingen 69 als Hugl-1 negativ und 28 als Hugl-1 positiv hervor. Alle erhobenen klinischen und experimentellen Daten wurden univariat mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven im Hinblick auf das Überleben analysiert. Eine Korrelation der Hugl-1 Expression mit klinischen Variablen wie Alter, Geschlecht, T, N, UICC *Staging* und *Grading* konnte nicht festgestellt werden. Es zeigte sich hingegen ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Hugl-1 Expression und dem Überleben der Patienten, insbesondere jener, welche bereits mehr als 12 Monate überlebt hatten ( $p=0.0241$ ). Auch für die Anwesenheit von Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnose konnte ein schwacher Einfluss auf das Überleben bewiesen werden ( $p=0.0474$ ). Andere Parameter wie T, N, UICC *Staging*, *Grading*, Geschlecht und Alter, blieben in ihrer Korrelation mit dem Überleben unauffällig. In einem multivariaten Cox-Modell erreichte nur die Hugl-1 Expression die Eingangsgrenzen. Schlussfolgernd beweisen die Ergebnisse dieser Studie, dass sich eine fortbestehende Hugl-1 Expression im Verlauf der Genese des Pankreaskarzinoms signifikant positiv auf das Langzeitüberleben der Patienten auswirkt. Somit konnte Hugl-1 als prognostisch relevanter Marker für das Pankreaskarzinom identifiziert werden.

## Abstract

Pancreatic cancer is one of the human tumors with the worst prognosis of all gastrointestinal carcinomas. Due to the limited possibilities to detect early curative operable patients in the sense of screenings and the lack of characteristic early symptoms, the median survival time at the time of diagnosis is in most cases less than 6 months. Previous attempts to generate an adequate therapy with a curative approach have not led to a significant improvement in the prognosis. Hence the need to identify new prognostic factors. In the present study, the human homologue of the *Drosophila* lethal giant larvae (lgl) tumor suppressor gene Hugel-1 was examined for the first time for its ability as a prognostic factor in pancreatic cancer, after it was already correlated with clinical course of other tumors. For this purpose, retrospective resection preparations of 97 patients with surgically treated pancreatic carcinoma were immunohistochemically processed according to a standard protocol and examined with regard to Hugel-1 expression in comparison with normal tissue. Immunohistochemical staining was evaluated semiquantitatively using 4 expression levels: negative (0), weak (1), medium (2) and strong (3). Results were correlated with clinical pathological parameters and patient survival. The average observation period was 17 +/- 16 months. As a result, normal and inflammatory pancreatic tissue showed a uniform medium to strong staining of all epithelial gait structures including adjacent ganglion cells and adjacent glandular tissue (acinar cells). Endocrine islet cells, on the other hand, showed weak positive staining properties. From the available tumor samples, 69 were Hugel-1 negative and 28 Hugel-1 positive. All collected clinical and experimental data were univariate analyzed with the help of Kaplan-Meier curves with regard to survival. A correlation of Hugel-1 expression with clinical variables such as age, gender, T, N, UICC staging and grading could not be determined. In contrast, there was a significant correlation between the Hugel-1 expression and the survival of patients, especially those who had already survived for more than 12 months ( $p=0.0241$ ). Also for the presence of distant metastases at the time of diagnosis a weak influence on survival could be proven ( $p=0.0474$ ). Other parameters such as T, N, UICC staging, grading, sex and age, remained unremarkable in their correlation with survival. In a multivariate Cox model, only Hugel-1 expression reached the entry limits. In conclusion, the results of this study prove that continued Hugel-1 expression during the genesis of pancreatic cancer has a significant positive effect on long-term survival. Thus, Hugel-1 could be identified as a prognostically relevant marker for pancreatic cancer.

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>TABELLEN</b> .....	<b>I</b>
<b>III.</b>	<b>ABBILDUNGEN</b> .....	<b>I</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	EPIDEMIOLOGIE DES PANKREASKARZINOMS .....	1
1.2	RISIKOFAKTOREN .....	2
1.3	PATHOGENESE.....	4
1.4	KLINISCHE SYMPTOMATIK .....	7
1.5	DIAGNOSE UND STAGING .....	7
1.6	MORPHOLOGISCHE DIAGNOSTIK.....	8
1.7	THERAPIE.....	10
1.8	PROGNOSE.....	12
1.8.1	<i>Klassische Prognosefaktoren</i> .....	12
1.8.2	<i>Morphologische und molekulare Prognosefaktoren</i> .....	13
1.9	HUGL-1 ALS POTENTIELLER PROGNOSEFAKTOR BEIM PANKREASKARZINOM .....	15
1.9.1	<i>Das Tumorsuppressorgen Drosophila lethal giant larvae</i> .....	15
1.9.2	<i>Das Tumorsuppressorgen Hugl-1</i> .....	16
1.10	PROBLEMSTELLUNG.....	17
1.11	ETHIKVOTUM .....	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>19</b>
2.1	PATIENTENGUT.....	19
2.2	METHODIK.....	19
2.2.1	<i>TNM-Klassifikation und Stadiengruppierung der Tumoren des exokrinen Pankreas</i> .....	19
2.2.2	<i>Malignitätsgradierung</i> .....	21
2.3	IMMUNHISTOCHEMIE .....	22
2.3.1	<i>Immunhistochemische Darstellung von Hugl-1 mittels LSAB-Methode</i> .....	22
2.3.2	<i>Aufarbeitung und Vorbehandlung der Gewebeprobe</i> .....	23
2.3.3	<i>Immunhistochemischer Färbevorgang</i> .....	25
2.4	HISTOLOGISCHE EXPRESSIONSBEURTEILUNG VON HUGL-1.....	27
2.5	STATISTISCHE AUSWERTUNGEN .....	27
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>29</b>
3.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DER HUGL-1 EXPRESSION AM PANKREAS.....	29
3.1.1	<i>Hugl-1 Expression in gesundem Pankreasgewebe</i> .....	30
3.1.2	<i>Hugl-1 Expression in peripankreatischen parasymphatischen Ganglienzellen</i> .....	32
3.2	HUGL-1 EXPRESSION IN ADENOKARZINOMEN DES PANKREAS .....	33
3.3	ÜBERLEBENSANALYSE .....	35
3.3.1	<i>Allgemeine Daten zum Überleben</i> .....	35
3.3.2	<i>Univariate Überlebensanalyse</i> .....	36
3.3.3	<i>Korrelation der Hugl-1 Expression mit klinischen Parametern, Staging und Grading</i> ....	45
3.3.4	<i>Multivariate Überlebensanalyse</i> .....	46
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>48</b>
4.1	PANKREASKARZINOME - TUMOREN MIT SEHR SCHLECHTER PROGNOSE .....	48
4.2	HUGL-1 ALS MÖGLICHER IMMUNHISTOCHEMISCHER PROGNOSEFAKTOR.....	49
4.2.1	<i>Hugl-1 Expression beim kolorektalen Karzinom</i> .....	50
4.2.2	<i>Hugl-1 Expression beim malignen Melanom</i> .....	50
4.2.3	<i>Hugl-1 Expression beim Endometriumkarzinom</i> .....	52

4.2.4	<i>Hugl-1 Expression beim hepatozellulären Karzinom</i> .....	53
4.2.5	<i>Hugl-1 Expression beim Ösophaguskarzinom</i> .....	53
4.2.6	<i>Hugl-1 Expression beim Lungenkarzinom</i> .....	54
4.2.7	<i>Hugl-1 Expression beim Pankreaskarzinom</i> .....	55
4.3	EINORDNUNG EIGENER ERGEBNISSE IN DEN PROGNOTISCHEN GESAMTZUSAMMENHANG DES PANKREASKARZINOMS .....	56
4.3.1	<i>Prognostische Bedeutung immunhistochemischer Biomarker an den Tumorzellen</i> .....	57
4.3.2	<i>Prognostische Bedeutung der immunhistochemisch analysierten peritumoralen Immunabwehr</i> .....	58
4.3.3	<i>Prognostische Bedeutung molekularpathologischer Ansätze</i> .....	59
4.4	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK .....	60
<b>IV.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>62</b>
<b>V.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>76</b>



---

## II. Tabellen

Tabelle 1:	WHO-Klassifikation der primären malignen epithelialen Neoplasien des exokrinen Pankreas (51) .....	9
Tabelle 2:	Verteilung der Hvgl-1-Expressionsstufen in 97 Pankreaskarzinomen .....	34
Tabelle 3:	Überleben in Bezug zur Altersverteilung ( $p > 0.05$ ) .....	36
Tabelle 4:	Überleben in Bezug zum Geschlecht ( $p > 0.05$ ).....	37
Tabelle 5:	Überleben in Bezug zur Tumorausdehnung (pT) ( $p > 0.05$ ) .....	38
Tabelle 6:	Überleben in Bezug zum Lymphknotenstatus (pN) ( $p > 0.05$ ).....	39
Tabelle 7:	Überleben in Bezug zur Fernmetastasierung (pM) ( $p = 0.0474$ ) .....	40
Tabelle 8:	Überleben in Bezug zur pTNM-Klassifikation der UICC ( $p > 0.05$ )....	41
Tabelle 9:	Überleben in Bezug zur Tumorgradierung (Grading) ( $p > 0.05$ ) .....	42
Tabelle 10:	Überleben in Bezug zur Hvgl-1-Expression, neg. (-) vs. pos. (+) ( $p > 0,05$ ) .....	43
Tabelle 11:	Überleben in Bezug zur Hvgl-1-Expression, zwei Gruppen ( $p = 0.0241$ ) .....	44
Tabelle 12:	Korrelation der Hvgl-1 Expression mit klinischen Parametern, Staging und Grading.....	45
Tabelle 13:	Cox-Modell vor Schritt 1.....	46
Tabelle 14:	Cox-Modell nach Schritt 1 (Endergebnis).....	47

### III. Abbildungen

Abb. 1:	Normales Pankreas. Positiv in großen und kleinen Ausführungsgängen, Objektivvergrößerung 10-fach .....	30
Abb. 2:	Normales Pankreas. Positiv in großen und kleinen Ausführungsgängen, Objektivvergrößerung 10-fach .....	31
Abb. 3:	Hugl-1-Expression in einem parasymphatischen Ganglion, Objektivvergrößerung 20-fach.....	32
Abb. 4:	Pankreaskarzinom mit komplettem Verlust der Hugl-1-Expression, Objektivvergrößerung 4-fach.....	33
Abb. 5:	Pankreaskarzinom mit mäßig ausgeprägter Expression von Hugl-1, Objektivvergrößerung 10-fach.....	34
Abb. 6:	Kaplan-Meier-Überlebenskurve für alle 97 Patienten (Gesamtüberleben).....	35
Abb. 7:	Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Altersverteilung der Patienten .....	36
Abb. 8:	Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Geschlecht der Patienten.....	37
Abb. 9:	Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Tumorausdehnung pT .....	38
Abb. 10:	Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Lymphknotenstatus (pN) .....	39
Abb. 11:	Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Fernmetastasierung (pM) .....	40
Abb. 12:	Kaplan-Meier Überlebenskurven zur pTNM-Klassifikation der UICC .....	41
Abb. 13:	Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Tumorgradierung .....	42
Abb. 14:	Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Hugl-1-Expression neg. vs. pos. ....	43
Abb. 15:	Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Hugl-1-Expression in zwei Gruppen (0-1 vs. 2-3).....	44

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms

Eine Krebserkrankung der Bauchspeicheldrüse macht, gemessen an allen Krebsarten in Deutschland 2018, bei Frauen 3.9 % und bei Männern 3.7 % aus. Im Vergleich zu anderen Krebsarten liegt die Erkrankungshäufigkeit für beide Geschlechter im oberen Drittel aller Tumorarten (1). Männer haben ein geringfügig höheres Risiko, im Leben an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, als Frauen. Das Lebenszeitrisiko für eine Erkrankung liegt bei ihnen bei 1.8 %, für Frauen bei 1.7 % (1).

Hierbei gilt das duktales Adenokarzinom als eine der bösartigsten und aggressivsten Neoplasien der Bauchspeicheldrüse. Es ist, einschließlich seiner Varianten, mit etwa 90 % der häufigste maligne Tumor des Pankreas und repräsentiert den Großteil der 95 % aller Pankreaskarzinome, die vom exokrinen Anteil der Bauchspeicheldrüse ausgehen (1, 2, 4). Mit über 19685 Neuerkrankungen im Jahr 2019 zählt es zu den zehn häufigsten Tumorarten in Deutschland und macht mit 8.7 % aller Krebstodesfälle bei Frauen sowie 7.4 % bei Männern inzwischen die vierthäufigste Krebstodesursache aus (1). Weltweit wurden im Jahr 2020 für beide Geschlechter 499.773 Neuerkrankungen und 466.003 Todesfälle im Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom registriert; diese machen 2.7 % aller evaluierten Krebstodesfälle aus (3).

Zwischen 1999 und 2018/2019 stieg die Zahl der Neuerkrankungen und der Sterbefälle im Gesamten stetig an (+ 2-3 % pro Jahr), wobei sich erstaunlicherweise bei den Frauen zwischen 2016/2017 im Bereich der Neuerkrankungen eine schwach abfallende Inzidenz zeigte, wohingegen die Sterbehäufigkeit für beide Geschlechter gleichgeblieben ist. Prospektiv soll sich der Verlauf der Neuerkrankungsrate für Männer bis zum Jahr 2022 fortsetzen, für Frauen hingegen wieder ansteigen (1).

Bauchspeicheldrüsenkrebs gilt als eine Erkrankung des höheren Lebensalters, er tritt selten vor dem 45. Lebensjahr auf. Von da an nimmt das Erkrankungsrisiko stetig zu. Das mittlere Erkrankungsalter bei Frauen liegt bei 76 Jahren und das der Männer bei 72 Jahren (1). Betrachtet man die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten, stellt man fest, dass sie seit Ende der 1990er Jahre bei beiden Geschlechtern weitgehend konstant

und etwa gleich hoch sind, wobei man sehen kann, dass die Inzidenz von 1999 – 2019 stetig gestiegen ist (1).

Aufgrund spät auftretender Symptome wird das Pankreaskarzinom größtenteils erst in weit fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert. Ein aggressives Wachstum, eine frühzeitige Metastasierung, insbesondere in die Lymphspalten und ein nur geringes Ansprechen gegenüber fast allen adjuvanten Therapieformen kommen erschwerend hinzu (4). Entsprechend liegt die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung bei < 6 Monaten; als absolute (bzw. relative) 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland werden für Frauen 8 % (10 %) und für Männer 9 % (10 %) angegeben, für die 10-Jahres-Überlebensrate 6 % (7 %) für Frauen und 6 % (8 %) für Männer (1). Damit liegt das Pankreaskarzinom in einer synoptischen Darstellung der Prognose der gängigsten gut 30 Tumorarten auf dem vorletzten Platz; nur das maligne Mesotheliom schneidet noch schlechter ab (1).

## 1.2 Risikofaktoren

Zu den gesicherten Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom zählen neben dem Lebensalter vor allem das Rauchen, Alkoholabusus und Adipositas (BMI > 30) (4). Als begünstigend für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms werden zudem noch chronische Pankreatitiden, Diabetes mellitus und hereditäre Faktoren angenommen. In kontroverser Diskussion stehen Faktoren wie berufsbedingte Expositionen gegenüber bestimmten Stoffen, Ernährung und Umwelteinflüsse, hierzu ist die aktuelle Datenlage jedoch nicht ausreichend (4, 5).

Das Rauchen wurde schon frühzeitig mit der Entstehung des Pankreaskarzinoms in Verbindung gebracht. Im Rahmen einer Tierstudie mit Ratten fand man 1988 heraus, dass tabakspezifische Nitrosamine (TSNA), welche den Tieren über das Trinkwasser verabreicht wurden, Bauchspeicheldrüsenkrebs verursachen können (6). TSNA finden sich neben Nikotin und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen im Tabak handelsüblicher Rauchwaren. Über die Blutbahn gelangen sie in die Bauchspeicheldrüse und führen dort zu gentoxischen Reaktionen (7). In verschiedenen Kohorten- und Fall-Kontroll-Studien konnte gezeigt werden, dass jeglicher Tabakkonsum in Form von Zigaretten- oder Zigarrenrauchen das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken,

verdoppelt. Sogar bei Passivrauchern konnte ein Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinomrisiko festgestellt werden (4).

Auch die familiäre Form des Pankreaskarzinoms erhöht das Risiko einer Erkrankung je nach Anzahl der betroffenen Familienmitglieder. Dies trifft vorwiegend auf Familienangehörige ersten Grades zu. Bei einem erkrankten Angehörigen ersten Grades ist das Risiko, selber zu erkranken, 2-fach erhöht. Hat der Verwandte zum Zeitpunkt seiner Erkrankung das 60 Lebensalter noch nicht überschritten, erhöht sich das eigene Erkrankungsrisiko um das 3-fache im Vergleich zur Normalbevölkerung. Erkranken zwei Verwandte ersten Grades, beträgt das Lebenszeitrisko für eine Erkrankung sogar 8 % (4, 8).

Weiterhin gilt die chronische Pankreatitis, unabhängig ihrer Ätiologie, ebenfalls als Risikofaktor für das Pankreaskarzinom. Je länger die Pankreatitis besteht, steigt das Risiko in der Zukunft an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (4, 9, 10, 11). Im Vergleich mit anderen Pankreatitiden konnte festgestellt werden, dass besonders die hereditäre Pankreatitis ein erhöhtes Pankreaskrebsrisiko birgt. Das Erkrankungsrisiko liegt hier sogar bei 40 – 44 % (12, 13). Von den Patienten mit hereditärer Pankreatitis neigen insbesondere Raucher dazu, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (14). Trotz verschiedener wissenschaftlicher Betrachtungsweisen konnte eine Häufung bei Diabetes mellitus in vielen Studien belegt werden. Hierbei war das Erkrankungsrisiko beim Typ I und Typ II Diabetes im Vergleich zur Normalbevölkerung jeweils 2-fach erhöht. (15, 16, 17).

Nur ein geringer Anteil der Pankreaskarzinome lassen sich auf hereditäre Faktoren zurückführen (18, 19). Hierzu zählen das Peutz-Jeghers Syndrom, das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), das familiäre Syndrom mit multiplen dysplastischen Nävi und Melanomen (FAMMM) und das hereditäre Brust- und Ovarialkarzinom; sie alle gelten als Hochrisikofaktoren (20). Führend ist hier das Peutz-Jeghers Syndrom, welches mit einer Morbidität an Pankreaskarzinomen von annähernd der Hälfte der Fälle einhergeht (21).

### 1.3 Pathogenese

Als Ausgangspunkt der Karzinogenese der duktaalen Adenokarzinome werden die Zellen angesehen, die die Ausführungsgänge des exokrinen Pankreas auskleiden. Hierbei gibt es große Ähnlichkeit zur molekularen Pathogenese des kolorektalen Karzinoms, welches sich wie das duktaale Adenokarzinom des Pankreas schrittweise über einen längeren Zeitraum, ausgehend von Normalgewebe über Hyperplasie und Dysplasie, zum invasiven Karzinom entwickelt (22, 23). Histopathologisch lassen sich folgende Krebsvorläuferläsionen unterscheiden. Muzinös-zystische Neoplasien (MCN), intraduktaale papilläre muzinöse Neoplasien (IPMN) und pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN), welche am häufigsten vorkommen (23, 24). Basierend auf Genmutationen, welche im Verlauf der neoplastischen Gewebeveränderungen auftreten, wurde ein Tumorprogressionsmodell für das Pankreaskarzinom aufgestellt. Dieses zeigt die dreistufige Entwicklung von normalem Gangepithel zum *Carcinoma in situ* (PanIN-1 -PanIN-3), sowie in diesem Verlauf die zunehmende genomische Instabilität durch die Aktivierung von Onkogenen (KRAS, HER2/neu) und das Abschalten von Tumorsuppressorgenen (p16, p53, DPC4, BRCA2) (25).

Als Veränderungen der Gangepithelien werden hyper- und metaplastische Zellveränderungen, insbesondere die papillären epithelialen Hyperplasien, beschrieben, welche häufig mit einem infiltrierenden Pankreaskarzinom assoziiert sind. Epithelveränderungen dieser Art können seit 2000 histologisch als intraepitheliale Neoplasien klassifiziert werden. Hierbei unterscheidet man anhand morphologischer und zellulärer Änderungen drei Kategorien: die flache duktaale hyperplastische Läsion PanIN-1A, die papilläre duktaale Hyperplasie ohne Atypien PanIN-1B, die papilläre hyperplastische Läsion mit Zellatypien und low-grade Dysplasien PanIN-2 bzw. mit schweren Dysplasien PanIN-3, welche bereits als Hoch-Risiko-Läsion anzusehen ist und als *Carcinoma in situ* bezeichnet werden kann, da sie neben dem Grad der Dysplasie ein ähnliches Muster genetischer Mutationen aufweist wie bereits manifeste invasive Karzinome (25, 26).

Auf dem Weg zum Karzinom finden schon in der frühen Entstehungsphase verschiedene genetische Mutationen statt. Neben chromosomalen Veränderungen, Genamplifikationen und Telomerverkürzungen steht die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen im Mittelpunkt der Karzinogenese. Zusammengefasst und um Aspekte zur Epithel-Stroma-Beziehung ergänzt wurde der Sachstand dazu aktuell

2022 von Wood et al. (23). Insgesamt sind bereits recht viele Onkogene identifiziert worden, deren Aktivierung in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms vorliegen kann (KRAS, TP53, CDKNA2A [p16], SMAD4, MLL3, TGFBR2, ARID1A, SF3B1, EPC1, ARID2, ATM, ZIM2, MAP2K4, NALCN, SLC16A4, MAGEA6), ebenso eine Reihe von Tumorsuppressorgenen, deren Ausfall beschrieben ist, darunter DPC4, LKB1, INK4a oder MKK4 (25). Im Folgenden soll nur auf einzelne dieser genetischen Veränderungen eingegangen werden.

### **1. Punktmutationen des Onkogens KRAS und Überexpression von HER2/neu**

Verglichen mit einem zellulären Schalter, steht KRAS im Mittelpunkt vieler intrazellulärer Signaltransduktionswege, welche maßgeblich an der Regulation von Wachstums- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind (27, 28). In seiner Funktion als membranständiges GTP-bindendes Protein liegt es entweder aktiv als RasG oder inaktiv als Ras vor. Durch Übertragung von Phosphatgruppen auf andere Proteine greift es wachstumsstimulierend in den Zyklus der Zellen ein. Kommt es durch Punktmutationen zum Verlust der GTPase-Aktivität, verliert KRAS die Fähigkeit sich abzuschalten, was zu einem andauernden Signalaustausch führt. KRAS-Alterationen haben sich als spezifisch für maligne Tumoren herausgestellt, wobei sich ihre Lokalisation fast ausschließlich auf Codon 12 begrenzt. Ihr sporadisches Auftreten in gesundem Gewebe und benignen Prozessen kommt vor. In frühen Neoplasien PanIN-1A und PanIN-1B findet man sie zu ungefähr 30 % und in fortgeschrittenen Adenokarzinomen zu fast 100 %. (29, 30) Zusammen mit der Überexpression von HER2/neu, einem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor aus der Familie der humanen EGFR, gelten KRAS-Mutationen als frühes Ereignis der Karzinogenese. Das Membranprotein HER2/neu stimuliert unter Ausnutzung des RAS-MAP-Kinase-Weg die Zellproliferation und hemmt den natürlichen Zelltod (Apoptose) (30, 31).

### **2. Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p16, p53, DCP4 und BRCA1/2**

#### **p16**

Das Tumorsuppressorgen p16 (CDKN2A) gehört der Familie der CDK-Inhibitoren (Cyklin-D-Komplex-Inhibitoren) an. Es dient der Regulation der Expression des CDK4/6-Komplexes, welcher im Zellzyklus beim Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase eine große Rolle spielt. Verliert p16 seine Funktion, kommt es ohne zusätzliche

Wachstumsfaktoren zu uneingeschränkter Zellproliferation. Studien zeigten, dass Mutationen des CDKN2A-Gens in etwa 41.9 % aller Pankreaskarzinome zu finden sind (32). Zusätzlich ist ein Funktionsverlust von p16 häufig mit der Mutation von KRAS assoziiert. (30) Tumoren mit p16-Inaktivierung gelten biologisch als besonders aggressiv, da sie bereits in PanIN-2 Läsionen vorkommen (33).

### **p53**

Als „Wächter des Genoms“ reguliert das Tumorsuppressorgen p53 die Zellproliferation, indem es bei Schädigung der DNA den Zellzyklus am Übergang zur S- und zur G<sub>2</sub>/M-Phase durch Expression regulatorischer Gene stoppt. Die Zelle erhält dadurch die Möglichkeit, die Schäden an der DNA zu beheben. Bei irreparabler Schädigung kann durch p53 die Apoptose eingeleitet werden. Mutationen des p53 Gens lassen sich in einer Vielzahl humaner Malignome finden (34). Etwa 75 % aller Pankreaskarzinome zeigen eine Inaktivierung von p53 (30). Diese treten in der Regel erst in fortgeschrittenen Stadien des duktales Pankreaskarzinoms auf, man findet sie aber auch gehäuft in PanIN 3 Läsionen.

### **DPC4 (Smad4)**

Die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens DPC4 findet erst in späteren Stadien der neoplastischen Transformation (PanIN-3) zum invasiven Karzinom statt. DPC4 gehört zu den häufigsten inaktivierten Tumorsuppressorgenen in Pankreaskarzinomen. Sein Genprodukt Smad4 ist Bestandteil der TGF- $\beta$ -Signaltransduktionskaskade und ist dort an der Transkription und Wachstumsregulation der Zellen beteiligt (35). Nach einer Studie von McCarthy et al. konnte in 55 % der invasiven Pankreaskarzinome eine Inaktivierung von DPC4 festgestellt werden (36). Eine Beeinträchtigung der Smad4-Expression ist nicht organspezifisch, da es auch in anderen Tumorentitäten vorkommt. Als diagnostischer Marker lässt sich Smad4 im immunhistochemischen Präparat nachweisen, dort ist es bei fortgeschrittenen Läsionen zum Teil nicht mehr nachweisbar und kann so Hinweise auf die Schwere der Erkrankung geben (37).

### **BRCA1/2**

Auch Mutationen des Tumorsuppressorgens BRCA1/2 stehen prädisponierend für ein höheres Risiko im Leben an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, insbesondere beim Vorliegen einer familiären Vorgeschichte. In diesen Fällen sollte eine Keimbahndiagnostik erfolgen, damit bei positivem Ergebnis mit einer Platin-basierten



Erstlinientherapie leitliniengerecht und erhaltungstherapeutisch interveniert werden kann (4).

## 1.4 Klinische Symptomatik

Die Entstehung eines Pankreaskarzinoms verläuft für gewöhnlich lange klinisch stumm. Es wird oft erst erkannt, wenn es bereits fortgeschritten und metastasiert ist, was sich nachteilig auf therapeutische Möglichkeiten auswirkt. Als nicht charakteristisch zeigen sich Symptome wie Oberbauch- und gürtelförmige Rückenschmerzen, Gewichtsverlust, Leistungsminderung, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe. Ein schmerzloser Ikterus mit generalisiertem Pruritus, hellem Stuhl und Steatorrhoe kann als Frühsymptom einer Obstruktion der ableitenden Gallenwege auftreten und ist in der Regel typisch für Pankreaskopf- und Papillenkarzinome. Etwa ein Drittel der Patienten mit Pankreaskopfkarzinom zeigen eine tastbar vergrößerte Gallenblase (Zeichen nach Courvoisier) als Folge o.g. Obstruktion. Tritt ein Ikterus bei Karzinomen des Pankreaskorpus oder des Pankreasschwanzes auf, liegen häufig bereits Lymphknotenmetastasen vor. Inappetenz, Aszitesentwicklung und rezidivierende Thrombosen zählen zu den Spätsymptomen (2, 38). Das Auftreten eines Diabetes mellitus ohne erklärbare Ursache kann ebenfalls auf einen Tumor der Bauchspeicheldrüse hinweisen, insbesondere dann, wenn er nach der 6. Lebensdekade auftritt und keine klassischen Risikofaktoren vorliegen (39).

## 1.5 Diagnose und Staging

Das Fehlen charakteristischer Frühsymptome und geeigneter *Screening*-Methoden erschweren die zeitnahe Diagnose erheblich.

In der Primär-Diagnostik kommen verschiedene bildgebende Verfahren zur Anwendung. Zur Abklärung einer Verdachtsdiagnose hat sich ein initiales *Screening* mit Oberbauchsonografie als geeignet erwiesen (40). Die Sensitivität und Spezifität dieser Untersuchungsmethode schwankt jedoch mit der Größe des Tumors (41), der Erfahrung des Untersuchers (42) und den technischen Möglichkeiten der eingesetzten Sonografie-Geräte. Weiterhin gelten als Verfahren der ersten Wahl die Endosonografie, die Multidetektor-CT-Untersuchung sowie die MRT in Kombination mit der MRCP (4). Die ERCP stellt eine eingeschränkte Methode zur Detektion von Pankreaskarzinomen dar.

Ihre Diagnostik ist hauptsächlich auf die Erkennung von intraduktalen Veränderungen ausgerichtet. Gangfernere Raumforderungen werden mit diesem Verfahren nicht zur Darstellung gebracht (43).

Alle bisher identifizierten Tumormarker sind aufgrund ihrer mangelnden Sensitivität und Spezifität nicht für *Screening*-Untersuchungen geeignet. Lediglich die Bestimmung des *Carbohydrate*-Antigens CA 19-9 im Serum kommt als Routineparameter für das Adenokarzinom des Pankreas bei Verlaufskontrollen und der Differentialdiagnostik zur Anwendung, ist aber für ein *Screening* weniger geeignet, da es auch bei gutartigen Erkrankungen des Pankreas oder des biliären Systems erhöht sein kann (44). Die Sensitivität von CA 19-9 wird in der Literatur mit 70-90 % und seine Spezifität mit 70-98 % angegeben (45).

Weiterhin ist eine histologische bzw. zytologische Untersuchung, insbesondere vor palliativer Behandlung (Chemotherapie), wesentlich (46). Bei primär resektablen Pankreaskarzinomen kann auf eine präoperative histologische oder zytologische Diagnostik verzichtet werden. Die Gewinnung von Gewebeproben und Zellmaterial erfolgt mit Hilfe der sonografisch, endosonografisch oder CT-gestützten Feinnadelpunktion. Diese Methoden haben sich als Standardverfahren in der morphologischen Abklärung etabliert und sich als hochspezifisch und sehr sensitiv erwiesen (47). Eine weitere *Staging*-Methode ist die explorative Laparoskopie. Sie dient insbesondere der Identifizierung resektabler Tumoren (48).

## 1.6 Morphologische Diagnostik

Pankreastumoren entwickeln sich sowohl aus dem exokrinen Teil, als auch aus dem endokrinen Teil des Pankreas. Sie finden sich zu 60 - 70 % im Pankreaskopf, zu 5 - 10 % im Pankreaskörper und zu 10 – 15 % im Pankreasschwanz. Den Rest machen überlappende Karzinome in zwei oder mehr Unterbezirken aus (49).

Maligne Tumoren des exokrinen Pankreas zeigen verschiedene Differenzierungsrichtungen. Man unterscheidet unter den duktal differenzierten Zellen zum einen die schleimproduzierenden Zellen, welche sich in den großen Gängen finden, und die serösen duktilär-zentroazinären Zellen, welche nur in den Übergängen zu den Endstücken

auftreten. Das duktales Adenokarzinom, einschließlich seiner Varianten, ist dabei mit etwa 85 - 90 % am häufigsten vertreten. Es entwickelt sich vorwiegend aus Zellen des Gangepithels. Lokalisiert ist der Tumor zu 60 – 70 % im Pankreaskopf. Muzinöszystische Tumore sind mit etwa 2 % unter den verbleibenden Tumoren noch die häufigsten. (50)

Die malignen epithelialen Tumoren des exokrinen Pankreas werden nach der aktuellen WHO-Klassifikation von 2019 wie folgt histologisch klassifiziert (siehe Tabelle 1) (51).

Oberbegriff / Hauptform	Subformen / Spezielle Entitäten
Duktales Adenokarzinom NOS	Kolloidales Karzinom <i>Poorly cohesive</i> Karzinom Siegelringzellkarzinom Medulläres Karzinom Adenosquamöses Karzinom Hepatoides Karzinom Undifferenziertes Karzinom Undifferenziertes Karzinom mit osteoklastären Riesenzellen
Azinuszellkarzinom	Azinuszelladenokarzinom Gemischtes azinär / neuroendokrines Karzinom Gemischtes azinär / endokrin / duktales Karzinom Gemischtes azinär / duktales Karzinom
Pankreatoblastom	----
Solide pseudopapilläre Neoplasie	Solide pseudopapilläre Neoplasie mit high-grade Karzinom

**Tabelle 1:** *WHO-Klassifikation der primären malignen epithelialen Neoplasien des exokrinen Pankreas (51)*

Hinzu kommen zu dieser Aufstellung noch in einer eigenen Rubrik geführte Karzinome, die eine zystische Komponente aufweisen (seröses Zystadenokarzinom) oder offenbar aus prämaligen intraduktalen bzw. zystischen Neoplasien hervorgegangen sind, nämlich aus intraduktalen papillären muzinösen Neoplasien, intraduktalen papillären nicht-muzinösen Neoplasien oder intraduktalen zystischen Neoplasien.

Endokrine Tumoren des Pankreas kommen seltener vor und machen nur etwa 3 % der Pankreastumoren aus. Sie betreffen häufiger Personen unter 40 Jahren. Hierbei stellen Insulinome mit 50 – 80 %, gefolgt von Gastrinomen mit 20 - 30%, VIPomen mit 3 - 8% und Glukagonomen mit 4 - 5%, die häufigste endokrine Tumorentität dar. Ferner gibt es seltene Entitäten, darunter die Somatostatinome mit weniger als 1 % der Fälle. Da die Dichte der endokrinen Inseln im Pankreasschwanz und im Pankreaskorpus relativ

gesehen dichter ist als im Pankreaskopf, befinden sich diese Tumoren häufiger in den distaleren Organabschnitten (52).

Im Mittelpunkt dieser Studie steht das duktales Adenokarzinom. Es gilt als besonders aggressiv, da es frühzeitig lymphogen und hämatogen metastasiert. Bei Diagnosestellung zeigt sich daher in vielen Fällen ein organüberschreitendes Wachstum mit Infiltration des peripankreatischen Weichgewebes. Insbesondere große Gefäße wie die *V. mesenterica superior* und die *V. portae* können, entsprechend der klinischen Klassifikation nach T4, von einer Krebszellinvasion betroffen sein. Dieser Umstand macht den Tumor nur bei 25 – 30 % der Betroffenen resektabel. Lymphknotenmetastasen finden sich in der Regel entlang der *A. mesenterica superior*, der *A. gastroduodenalis*, der *A. hepatica communis*, der *A. lienalis* und dem *Truncus coeliacus*. Bei vorhandenen Fernmetastasen sind diese primär in der Leber, in den Lymphknoten und später in der Lunge angesiedelt (2, 53).

Morphologisch zeigt das duktales Adenokarzinom, solange es noch einigermaßen differenziert ist, ein Wachstum in Form drüsiger Strukturen, die von Zellen mit atypischen Kernen gebildet werden; muzinöse Differenzierungsrichtungen sind dabei möglich, aber nicht sonderlich häufig. Der Charakter eines manifesten Karzinoms wird in Abgrenzung gegenüber Vorstufen inklusive dem *Carcinoma in situ* durch den Nachweis invasiven Wachstums gesichert. Dieses geht charakteristischerweise mit einer ausgeprägten Bindegewebsinduktion durch den Tumor („desmoplastische Reaktion“) einher. Immunhistochemisch zeigen duktales Adenokarzinome des Pankreas überwiegend eine starke CK7-Positivität bei CK20-Negativität und eine variable cdx-2-Expression. Gegenüber anderen Karzinomen des Oberbauches (Magenkarzinome, Gallenblasen- und Gallenwegskarzinome) sind sie seitens der Morphologie nicht eindeutig abgrenzbar, weil alle Differenzierungsspielarten inklusive Siegelringkarzinomen oder einzellig zerfallenden, dissolut wachsenden gering differenzierten Karzinomen bei den genannten Entitäten vorkommen können. Formal muss also die Organzuordnung in der Zusammenschau von Klinik, radiologischer Bildgebung und Morphologie erfolgen.

## 1.7 Therapie

Die kurative Resektion beim Pankreaskarzinom stellt das primäre therapeutische Ziel dar. Aufgrund der meist fortgeschrittenen Tumorstadien ist es jedoch kaum realisierbar.

Gerade mal 20 % der Tumore sind bei Diagnosestellung operabel. Dieser Umstand hat sich in den letzten zwanzig Jahren nicht verändert (54). Als Resektions- und Rekonstruktionsverfahren stehen verschiedene Operationstechniken, je nach Tumorlokalisation und Ausdehnung, zur Verfügung. Zielsetzung der Operation des Karzinoms ist die Resektion im Gesunden (R0). Angestrebt wird hier operationstechnisch die kurative Entfernung des Tumors mit größtmöglichem Sicherheitsabstand.

Als klassische Standardeingriffe seien bei Pankreaskopftumoren die partielle Pankreatikoduodenektomie (PD) nach Kausch-Whipple, die pyloruserhaltende partielle PD nach Traverso-Longmire, die totale PD und bei Tumoren im Pankreaskorpus und -schwanz die Pankreaslinksresektion mit Splen- und Lymphadenektomie genannt (4).

Chemotherapien werden neoadjuvant, adjuvant und palliativ angewendet. Hierbei hängt die Art der chemotherapeutischen Anwendung maßgeblich vom Erscheinungsbild der Erkrankung ab. Neoadjuvante Chemotherapien sollten bei resektabel eingeschätzten Pankreaskarzinomen nur im Rahmen von Studien durchgeführt werden. Beim Vorliegen einer Borderline-Resektabilität, sowie bei stark fortgeschrittenen Tumoren, soll hingegen eine neoadjuvante Chemotherapie, sowie eine Strahlenchemotherapie erfolgen. Die adjuvante Chemotherapie stellt den Standard nach R0-Resektion dar. Auch bei R1-Resektionen soll die Chemotherapie additiv durchgeführt werden. Palliativmedizinisch durchgeführte Chemotherapien haben sich hinsichtlich einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten etabliert (4).

In der palliativen Anwendung werden kombinierte Therapien mit FOLFIRINOX, Gemcitabin+nabPaclitaxel, Gemcitabin+nabPaclitaxel, Gemcitabin+Erlotinib, sowie monotherapeutisch Gemcitabin angewendet. Adjuvante Therapien werden fallspezifisch mit mFOLFIRINOX, Gemcitabin, Gemcitabin+Capecitabin und 5-Fluorouracil (5-FU) bei Gemcitabin-Unverträglichkeit, durchgeführt (4). Für die neoadjuvante Chemotherapie wird in der Regel FOLFIRINOX sowie Gemcitabin plus nab-Paclitaxel angewendet. In Kombination mit einer Strahlentherapie werden Gemcitabin oder Capecitabin eingesetzt, wobei die Indikationsstellung für eine Radiochemotherapie dem individuellen Schaden-/Nutzen-Profil des Patienten angepasst werden muss und somit nicht standardisiert durchgeführt werden kann (4).

## 1.8 Prognose

### 1.8.1 Klassische Prognosefaktoren

Prognostische Aussagen über den Krankheitsverlauf, die kurativen und palliativen Therapiemöglichkeiten und die allgemeine Lebenserwartung nach Diagnosestellung sind am *Staging* nach der gültigen TNM-Klassifikation nach *UICC 2020 (Union for International Cancer Control)* orientiert (55).

Die Prognose verschlechtert sich mit zunehmendem Tumorstadium. So sinkt das relative 5-Jahres Überleben nach *UICC*-Stadium exponentiell mit Höhe der Einstufung. Das 5-Jahres Überleben ist mit Höhe der Einstufung bei beiden Geschlechtern nahezu gleich schlecht (1, 2). Die infauste Prognose ergibt sich aus mehreren Faktoren. Zum einen kommt es aufgrund anfänglicher Symptomfreiheit in vielen Fällen zu einer erst späten Diagnosestellung, zum anderen liegen nicht gelöste diagnostische und therapeutische Probleme vor. Somit befinden sich die meisten Karzinome bei der Diagnosestellung in einem weit fortgeschrittenen Tumorstadium (2, 4).

Nur etwa 20 – 30 % der diagnostizierten Pankreaskarzinome gelten als resektabel. Bei etwa 50 % der Betroffenen werden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Fernmetastasen festgestellt und bei ca. 80 % liegen Metastasen der regionären Lymphknoten vor (50). Bei chirurgisch behandelten Patienten hängt die weitere Prognose stark vom Residualtumorstatus ab. Etwa 80 – 85 % der operierten Tumore zählen zu den R0-Resektionen (56). Die Mehrheit der operierten Patienten entwickelt aber innerhalb von zwei Jahren nach Resektion trotz tumorfreier Ränder ein Rezidiv, was aus nicht entdeckten Mikrometastasen in Perineuralscheiden und Lymphgefäßen zum Zeitpunkt der Operation hervorgeht. Die medianen Überlebenszeiten nach Resektion werden mit 10 - 20 Monaten angegeben und ohne Resektion mit 3 - 6 Monaten (50). Laufende Studien bezüglich neuer adjuvanter Behandlungsmöglichkeiten, wie kombinierter Chemotherapie mit neuen Agenzien wie S-1, einem oralen Fluoropyrimidin, oder der Einsatz von zielgerichteten Antikörpern zeigen sich richtungsweisend im Hinblick auf eine Verbesserung der Prognose, haben sich aber aufgrund mangelnder Erfahrung noch nicht etablieren können (57). Insgesamt liegt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit trotz ausgedehnter Pankreasresektion mit R0-Status derzeit bei weniger als 20 % (58-63).

## 1.8.2 Morphologische und molekulare Prognosefaktoren

Zu den prognostisch relevanten histopathologischen Faktoren zählt das dreistufige *Grading* (G1-G3). Dieses erfolgt nach zytologischen Kriterien und der Bestimmung der Mitoserate (55). Die histopathologische Einstufung ist entscheidend für die weitere Therapieplanung nach chirurgischen Eingriffen (R0/R1-Resektion) sowie für die prognostische Einschätzung der Lebenserwartung. Der Umgang mit dem histopathologischen Präparat unterliegt daher hohen Anforderungen und erfordert höchste Sorgfalt und Genauigkeit im Rahmen der mikroskopischen Diagnostik (4).

Obwohl die molekularbiologischen Veränderungen während der Tumorprogression wie die mutationsbedingte Aktivierung von Onkogenen (KRAS, Her2/neu) und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (p16/p53/DPC4/BRCA2) ausreichend verstanden wurden, ist es bisher nicht gelungen, eine molekularbiologische Variable zu identifizieren, welche sich diagnostisch und therapeutisch als vielversprechend erweist (64). Entsprechend werden auch in den Leitlinien zur Diagnose und Therapie des Pankreaskarzinoms keine solchen Parameter erwähnt (8).

Zu den erprobtesten prognostischen Biomarkern zählt das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von KRAS und SMAD4 Mutationen. Pankreastumore ohne KRAS-Mutationen sind eine Seltenheit, da in 90 % aller Pankreaskarzinomen KRAS-Mutationen festgestellt werden. Fehlende KRAS-Mutationen lassen eine günstigere Prognose bzgl. des Überlebens zu (65, 66).

Bei SMAD4 verhält es sich ähnlich. Je länger die SMAD4-Expression erhalten bleibt, desto günstiger sind die Auswirkungen auf das Gesamtüberleben, wobei sich der Verlust von SMAD4 günstig auf die Wirksamkeit adjuvanter Chemotherapien auswirkt (64, 67, 68).

Gleiches gilt im Grunde auch für die Immunhistochemie. Das Ergebnis einer großangelegten vergleichenden Analyse diverser Studien zeigte, dass keine der 76 untersuchten immunhistochemischen Variablen in ihrer unabhängigen prognostischen Bedeutung gesichert ist und derzeit nicht zur generalisierten klinischen Nutzung empfohlen werden kann. Dies ist größtenteils auf widersprüchliche Studienergebnisse, unzureichende Erprobung und nicht standardisierten immunhistochemischen Verfahren bei der Datenerhebung zurückzuführen (69).

Einer der Marker, der zur „Grundausstattung“ in den immunhistochemischen Laboren der Pathologie zählt und den somit jedes Institut anwenden könnte, ist Vimentin. Dieser Marker wurde in einer sehr großen, 356 Fälle resezierter Pankreaskarzinome umfassenden Studie vom Johns-Hopkins Hospital angewandt (70) und war im Vergleich einer hohen zu einer niedrigen Expression in den Tumorzellen sowohl prognostisch signifikant bezogen auf alle Patienten ( $p < 0.01$ ), als auch für wesentliche Untergruppen (z.B. T3-Fälle, N1-Fälle oder R0-Fälle). Im Cox-Modell zur multivariaten Analyse wurde Vimentin mit ähnlicher Relevanz wie das Tumorgrading und der R-Status aufgenommen; eine Validierung des Cox-Modells wurde nicht vorgestellt.

Ein weiterer Marker, der in jedem immunhistochemischen Labor vorgehalten wird, ist Her2/neu. Hier zeigten diverse Studien (71, 72), dass überwiegend eine Her2/neu-Überexpression als negativer Prognosefaktor gesehen wird, wobei die Ergebnisse aber nicht ganz einheitlich waren. In einem gut definierten Kollektiv von 129 resezierten Pankreaskarzinomen beispielsweise war eine klare Trennung in statistisch signifikant unterschiedliche Überlebensraten zu erkennen, wenn auch erst nachdem 12 Monate vergangen waren ( $p = 0.078$ ) (71).

Auch die Expression von Carboanhydrase IX in Pankreaskarzinomen mit Mikronekrosen und massiven Nekrosen konnten mit dem Überleben der Patienten korreliert werden. In einer immunhistochemischen Analyse von Hiraoka et al. wurde festgestellt, dass die Expression von Carboanhydrase IX das Outcome der chirurgisch behandelten Patienten negativ beeinträchtigt. Schlussfolgernd erlaubt die Expression von Carboanhydrase IX in Tumorgewebe eine prognostische Aussage zum postoperativen Outcome der Patienten (73).

Zur Zeit der Studienplanung etwa wurde eine Studie an resezierten Pankreaskarzinomen mit Antikörpern gegen Cyclooxygenase 2 (COX-2), den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF und das Hu-Protein-Antigen R (HuR) vorgenommen. Dabei zeigte sich bei allerdings nur begrenzter Zahl von Fällen ( $n=53$ ), dass sich eine hohe zytoplasmatische HuR-Expression im Zusammenhang mit Gemcitabin gestützter adjuvanter Chemotherapie positiv auf das Outcome der Patienten auswirkte ( $p = 0.033$ ), insbesondere bei erhöhtem T-Stadium (74). COX-2 und VEGF zeigten keinen prognostischen Effekt. Heute ist HuR weitestgehend verschwunden und wird im Grunde nicht mehr angewandt.



Ein weiterer zu nennender Marker wäre Survivin, das verschiedentlich angewandt wurde, ganz aktuell an 236 Fällen in einer aktuellen Studie aus Düsseldorf (101); der Stand der Literatur zu diesem Marker ist in der Arbeit wiedergegeben. Erstmals in der Literatur getrennt untersucht wurden dabei die Expression im Kern und im Zytoplasma sowie im Zentrum des Tumors und an der Wachstumsfront. Univariat einzig relevant war bei verschiedenen Vergleichen die zytoplasmatische Expression an der Wachstumsfront; die übrigen drei Aspekte blieben ohne Bedeutung. Interessanterweise war dann aber in diversen dargestellten multivariaten Cox-Modellen Survivin meistens ohne multivariate Varianz, und wenn doch, dann die Expression im Kern im Zentrum des Tumors - so dass letztendlich die Methodologie einer Survivin-Anwendung in der genannten Studie offenbar noch nicht abschließend geklärt werden konnte.

## **1.9 Hugl-1 als potentieller Prognosefaktor beim Pankreaskarzinom**

In der hier vorgelegten Arbeit soll eine neue prognostische Variable für das Pankreaskarzinom die Hugl-1-Immunhistochemie erprobt werden. Die Grundlagen hierfür sollen im Folgenden vorgestellt werden.

### **1.9.1 Das Tumorsuppressorgen *Drosophila lethal giant larvae***

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* hat sich aufgrund ihrer geringen Chromosomenzahl als gut geeigneter Modellorganismus der Genetik erwiesen. Das Gen *Drosophila lethal giant larvae* (*lgl*) ist durch seine Eigenschaft als Tumorsuppressor in der Literatur bekannt geworden (75, 76). In seiner Funktion als zytoplasmatisches Protein reguliert es komplexgebunden durch Interaktion mit dem zytoskeletalen Netzwerk die Polarität und Morphologie der Zellen und übt Kontrolle auf Proliferations- und Differenzierungsprozesse der Zellen aus (77). Geht die Funktion von *lgl* durch rezessive Mutationen des Genlokus verloren, kommt es während der Entwicklungsphasen (Embryo-Larve) zur Überexpression der ektodermalen Derivate. Hierzu zählen die Imaginalscheiben und das larvale Hirngewebe, insbesondere die optischen Neuroblasten. Dies konnte bereits in den 70er Jahren nachgewiesen werden (76). Weiterhin kommt es durch die Mutationen bzw. den Verlust von *lgl* zur Aufhebung der apiko-basalen Zellpolarität und der Proliferations-

und Differenzierungskontrolle. Dieser Umstand führt zur Bildung amorpher Tumormassen mit Zellmigrationspotential (78). Agrawal et al. stellten in einer Studie dar, dass das überschießende Zellwachstum dem humaner Karzinome ähnelt. Wurde oben beschriebenes neoplastisches Gewebe auf den Wildtyp von *Drosophila* übertragen, konnte eine Ausbreitung im Sinne einer Metastasierung festgestellt werden (79, 80). Durch Kreuzung von *Drosophila* lgl-Mutanten mit klonierten *Drosophila* lgl-Wildtypen konnte eine Unterdrückung des Tumorwachstums beobachtet werden. Anhand dieses Ergebnisses wurde der Beleg für die Tumorsuppressoreigenschaft des lethal giant larvae Gens von *Drosophila* erbracht (81). Eine Konservierung von lgl findet sich weiterhin in Spezies wie Hefe, Schleimpilzen, Mäusen, Insekten und Mensch (82).

### **1.9.2 Das Tumorsuppressorgen Hugl-1**

Das Gen *hugl-1* bildet ein humanes Homolog zum Tumorsuppressorgen *lethal giant larvae* (*lgl*) der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Die *hugl-1* cDNA hat ihren Genlokus auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p11.2-12) und nimmt dort einen Abschnitt von 25 kB ein. Das zugehörige Protein Hugl-1 setzt sich in seiner Sequenz aus 1057 Aminosäuren zusammen und erreicht ein Molekulargewicht von 115 kD (82). Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 17 stehen in engem Zusammenhang mit der Ausbildung von primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs) des ZNS bei Kindern und Jugendlichen sowie mit dem Auftreten des frühkindlichen Smith-Magins-Syndroms, welches zu Fehlbildungen und geistiger Retardierung führt (83). Hugl-1 wurde als Protein des zytoskelettalen Netzwerks identifiziert, wo es vorwiegend in kortikalen und submembranösen Anteilen nahe der Zellmembran zu finden ist. Über eine Myosin bindende Domäne kann das Protein Hugl-1 durch Phosphorylierung bestimmter Enzyme (Myosin-II-schwere-Kette-Kinase, Serinkinase) in Interaktion mit nicht-muskulären Myosin-II-Filamenten des Zytoskeletts treten. Kontakte dieser Art dienen der Aufrechterhaltung der Zellpolarität und Gewebemorphologie. In seiner Struktur entspricht es Homo-Oligomeren (82, 84). Oben genannte Eigenschaften sind aufgrund der bestehenden Sequenzhomologie zwischen *hugl-1* und *lgl* auf *Drosophila* lgl übertragbar (82). Insgesamt liegt die Sequenzhomologie zwischen *Drosophila* und Mensch bei etwa 62.5 % (85). In einem Substitutionsexperiment wurde humane *hugl-1* cDNA in das Genom von *lgl*-*Drosophila* Mutanten inseriert. Die anschließende

Expression von Hvgl-1 in den lgl-Mutanten verhinderte die Hyperproliferation der Zellen und machte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Entwicklung und Lebenserwartung der Fruchtfliegen, verglichen mit dem *Drosophila* Wildtyp, erkennbar. Auf diese Weise konnte die Tumorsuppressoreigenschaft auch von Hvgl-1 praktisch nachgewiesen und bestätigt werden (84). Analysen verschiedener Transkriptionsprofile humaner Karzinome im Vergleich mit Normalgewebe zeigten eine reduzierte Expression bzw. einen Verlust von Hvgl-1 beim Mammakarzinom (76%), Lungenkarzinom (63%), Prostatakarzinom (53%), Ovariakarzinom (50%), malignem Melanom (40%), Lebermetastasen (72%) und kolorektalem Karzinom (75%) (84, 86). Diese Fakten machen deutlich, dass Hvgl-1 beim Menschen ebenso eine wichtige Rolle bei der Tumorsuppression spielt und dass sich eine verminderte Expression bzw. ein Verlust von Hvgl-1 mit fortgeschrittenen Tumorstadien assoziieren lässt.

Als weiteres humanes Homolog zu lgl ist Hvgl-2 bekannt. Auf dieses soll jedoch in dieser Studie aufgrund der noch schwachen Datenlage nicht eingegangen werden (87).

## **1.10 Problemstellung**

Die Arbeitsgruppe um Priv.-Doz. Dr. Strand (1. Medizinische Klinik der Universitätsmedizin Mainz) stellte im Jahr 1995 einen Paraffin-gängigen Antikörper gegen Hvgl-1 her, so dass nunmehr Untersuchungen auf eine Hvgl-1-Expression nicht mehr nur molekularpathologisch, sondern auch immunhistochemisch am Gewebeschnitt möglich waren. (82)

Eine reduzierte Expression oder ein Verlust von Hvgl-1 wurde bisher mit der Tumorprogression beim kolorektalen Karzinom (86), beim malignen Melanom (88), beim Endometriumkarzinom (89), beim primären Leberzellkarzinom (90), beim Ösophaguskarzinom (91) und beim Lungenkarzinom (92) korreliert. Dabei wurden Korrelationen zwischen molekularem Profil und immunhistochemischer Expression von Hvgl-1 dargestellt, so daß man von einer guten Korrelierbarkeit beider Methoden ausgehen kann.

Für das Pankreaskarzinom liegen mit Hvgl-1 noch keine Untersuchungen vor. Ziel dieser Arbeit war daher, die Hvgl-1-Expression an dieser Tumorentität immunhistochemisch zu

analysieren und die Ergebnisse mit klinischen Daten, darunter auch die Überlebenszeit der Patienten, zu korrelieren. Sie entstand in einer Kooperation mehrerer Kliniken und Institute der Universitätsmedizin Mainz und der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

### **1.11 Ethikvotum**

Zu der Studie liegt ein positives Votum seitens der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor (Studiennummer Nr. 4116 vom 14.01.2013). Studienbeginn war im Frühjahr 2013.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientengut

Die vorliegende Studie bezieht sich auf 97 Fälle mit chirurgisch behandeltem exokrinen Adenokarzinom des Pankreas. Die Patientendaten wurden aus einer Datenbank der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Abdominalchirurgie der Universitätsmedizin Mainz (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gockel) entnommen. Die Tumordiagnose wurde am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz gestellt. Diese erfolgte anhand von HE und PAS gefärbten Paraffinschnitten mittels konventioneller Lichtmikroskopie, ggfls. ergänzt um immunhistochemische Untersuchungen. Für die hier vorgelegte Untersuchung lagen von dort repräsentative Paraffinblöcke mit ausreichender Menge an vitalem Tumorgewebe vor. Neben dem Alter und dem Geschlecht der Patienten waren die TNM-Klassifikation und das *Grading* des Tumors sowie die Überlebenszeit der Patienten, ermittelt über den klinischen Verlauf und durch einen Abgleich mit den Einwohnermeldeämtern, bekannt.

### 2.2 Methodik

#### 2.2.1 TNM-Klassifikation und Stadiengruppierung der Tumoren des exokrinen Pankreas

Die Klassifikation und die Stadiengruppierung der exokrinen Pankreastumore erfolgte nach den Vorgaben der *UICC* von 2020 (55) unter Beurteilung der Ausdehnung des Primärtumors (T), des Lymphknotenstatus (N) und einer Bildung von Fernmetastasen (M); die Bezeichnungen als T, N oder M beziehen sich auf Klinik und Bildgebung, die als pT, pN oder pM auf histopathologische Untersuchungsergebnisse.

**Tumorgroße: T/pT-Klassifikation**

- (p)TX: der Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- (p)T0: es besteht kein Anhalt für einen Primärtumor
- (p)Tis: es liegt ein *Carcinoma in situ* vor
- (p)T1: Tumor begrenzt auf Pankreas,  $\leq 2$  cm in größter Ausdehnung  
 - T1a: Tumor  $\leq 0,5$  cm in größter Ausdehnung  
 - T1b: Tumor  $> 0,5$  cm aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung  
 - T1c: Tumor  $> 1$  cm aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
- (p)T2: Tumor  $> 2$  cm aber nicht größer als 4 cm in größter Ausdehnung
- (p)T3: Tumor  $> 4$  cm in größter Ausdehnung
- (p)T4: der Tumor infiltriert Truncus coeliacus, A. mesenterica superior und-/oder A. hepatica communis

**Lymphknotenstatus (regionäre Lymphknoten): N/pN-Klassifikation**

Zu den regionären Lymphknoten zählen beim Pankreas alle peripankreatischen Lymphknoten. Die histologische Untersuchung soll an mindestens 10 Lymphknoten erfolgen. Liegen nur weniger als 10 tumorfreie Lymphknoten vor, so werden diese unter Angabe der Zahl der untersuchten Lymphknoten als pN0 klassifiziert (83).

- (p)NX: regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- (p)N0: es liegen keine regionären Lymphknotenmetastasen vor
- (p)N1: Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
- (p)N2: Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten

**Fernmetastasen: M/pM-Klassifikation**

- (p)MX: das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
- (p)M0: es liegen keine Fernmetastasen vor
- (p)M1: es liegen Fernmetastasen vor

Aus den erhobenen Daten ergibt sich zusammengefasst die Stadiengruppierung als TNM-Stadium:

**TNM/pTNM-Stadium**

TNM/pTNM 0:	Tis	N0	M0
TNM/pTNM IA:	T1	N0	M0
TNM/pTNM IB:	T2	N0	M0
TNM/pTNM IIA:	T3	N0	M0
TNM/pTNM IIB:	T1, T2, T3	N1	M0
TNM/pTNM III:	T1, T2, T3	N2	M0
	T4	jedes N	M0
TNM/pTNM IV:	jedes T	jedes N	M1

**2.2.2 Malignitätsgradierung**

Das *Grading* erfolgte semiquantitativ nach einem vierstufigen Schema (93, 94), bei dem der prozentuale Anteil des Tumors, der noch eine drüsige Differenzierung aufwies, ausschlaggebend war, so dass letztendlich das Wachstumsmuster das entscheidende Kriterium darstellte:

G1:	> 95 %
G2:	50 – 95 %
G3:	5 – 49 %
G4:	< 5 %

Informationen zum histomorphologischen Erscheinungsbild (tubuläre Differenzierung), zytologischem Erscheinungsbild (Kernpleomorphie), der Schleimproduktion, sowie der mitotischen Aktivität (Mitoserate) lagen nicht separat vor, weshalb die semiquantitative Gradierung nach der WHO (95) nicht vorgenommen werden konnte.

## 2.3 Immunhistochemie

Das Erstellen der Präparate und deren Vorbehandlung zur immunhistochemischen Aufarbeitung sowie die anschließende immunhistochemische Darstellung der Hugl-1 Expression erfolgte wie nachfolgend dargestellt. Der experimentelle, nicht kommerziell erhältliche Antikörper wurde von der 1. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz (Arbeitsgruppen Prof. Dr. Schimanski und Priv.-Doz. Dr. Strand) zur Verfügung gestellt. Die Untersuchungen erfolgten im Forschungsbereich der genannten Klinik und wurden am SFB 432 (Projektleiter Prof. Dr. Biesterfeld) ausgewertet.

### 2.3.1 Immunhistochemische Darstellung von Hugl-1 mittels LSAB-Methode

Die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehende Untersuchung der Hugl-1 Expression beim Pankreaskarzinom erfolgte mit Hilfe der *Labelled*-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB). Die LSAB-Methode gehört zu den indirekten immunhistochemischen Methoden, welche auf den Nachweis von Antigenen ausgerichtet sind. Gegenüber anderen immunhistochemischen Methoden gilt sie aufgrund ihrer hohen Enzyμβeteiligung als besonders sensitiv. Das Verfahren basiert auf der starken Affinität von Biotin zu Streptavidin bzw. Avidin. Die Verbindung dieser Stoffe zählt zu den stärksten nicht kovalenten biologischen Bindungen. Biotin (Vitamin H) bildet das Coenzym oder die prosthetische Gruppe für mehrere Enzyme, die Carboxylgruppen transferieren. Streptavidin ist ein bakterielles Protein der Spezies *Streptomyces avidinii* und besitzt 4 identische Proteinuntereinheiten, die jeweils ein Molekül Biotin binden können. Gegenüber Avidin hat Streptavidin den Vorteil, dass es bei physiologischem pH-Wert nicht an lektinähnliche, negativ geladene Gewebebestandteile bindet. Aus diesem Grund wird Streptavidin in der Immunhistochemie bevorzugt. Sowohl Avidin, als auch Streptavidin können mit Enzymen und Fluorochromen markiert werden. Da das Biotinmolekül sehr klein ist, kommt es zu keiner Beeinträchtigung des Makromoleküls, an dem es hängt. Das macht bei der endogenen Peroxidase mancher Gewebetypen (Leber, Niere, Darm) eine Blockierung des endogenen Biotins nötig (96).

Das Prinzip der LSAB-Methode soll im Folgenden kurz erläutert werden: Zuerst reagiert ein unkonjugierter Primärantikörper, hier ein polyklonaler IgG Kaninchenantikörper, mit



dem gesuchten Antigen, in unserem Fall mit dem gewebeständigen HUGL-1 Antigen. Im Anschluss wird ein Sekundärantikörper, an den Biotin kovalent gebunden ist, hinzugegeben. Die Konjugation des Sekundärantikörpers mit dem Primärantikörper erfolgt am Fc-Teil des Primärantikörpers. Das zugefügte enzymmarkierte Streptavidin-Substrat bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers. Da an jedes Biotinmolekül Streptavidin binden kann, wird eine hohe Amplifikation erreicht. Als Enzyme werden üblicherweise Meerrettichperoxidase (HRP) oder alkalische Phosphatase (AP) eingesetzt. In dieser experimentellen Studie wurde HRP verwendet. Zur Sichtbarmachung der erfolgten Peroxidasebindungen wird der Vorgang mit der Zugabe einer Substrat-Chromogen-Lösung (3,3-Diaminobenzidin = DAB), welche das Substrat des gewählten Enzyms (Wasserstoffperoxid) enthält, abgeschlossen. Es entsteht ein wasserunlösliches braunes Farbprodukt, das die Antigen-Antikörper-Komplexe nach einer Gegenfärbung mit HE (Hämatoxylin-Eosin) direkt lichtmikroskopisch zu beurteilen erlaubt (97).

### **2.3.2 Aufarbeitung und Vorbehandlung der Gewebeproben**

Aus den vom Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellten Paraffinblöcken von Formalin-fixierten Pankreaskarzinomen wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms 4 µm dicke Schnittpräparate angefertigt. Aus einem Block wurden ca. 5 Schnitte gewonnen und auf Objektträger gezogen. Diese wurden nach einem Standardprotokoll für die Inkubation mit dem HUGL-1 Antikörper vorbereitet:

#### **1. Vorbehandlung der Präparate**

Da es sich bei Paraffin um eine hydrophobe und alkoholunlösliche Substanz handelt, müssen die Schnittpräparate zunächst entparaffiniert und anschließend rehydriert werden. Auf diese Weise können Störungen im Färbemuster des nachfolgenden Färbeprozesses vermieden werden. Paraffinrückstände würden die Aufnahme der Farbstoffe behindern.

Zur Entparaffinierung wurden die Präparate für eine Stunde in einem Brutschrank bei 70 °C inkubiert. Nach Antrocknung der Präparate und Verflüssigung des Paraffins wurden die noch warmen Objektträger einer Lösung aus Xylol zugeführt und dort 5 Minuten gleichmäßig bewegt. Um alle Paraffinrückstände zu entfernen, wurde dieser

*Clearing*-Vorgang im Xylol-Bad dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Präparate zur Rehydratation folgender absteigender Alkoholreihe bis zum Aqua dest. zugeführt.

100% Ethanol	2 x 3 Minuten
96% Ethanol	1 x 3 Minuten
80% Ethanol	1 x 3 Minuten
70% Ethanol	1 x 3 Minuten
50% Ethanol	1 x 3 Minuten
Aqua dest.	1 x 3 Minuten

Nach diesem Vorgang lagen die Präparate in einem wässrigen Milieu vor und waren für die immunhistochemische Färbung zugänglich.

### **2. Blockierung der endogenen Peroxidase**

Da das verwendete Chromogen DAB nicht zwischen endogener Peroxidase und Streptavidinperoxidase unterscheiden kann, wurden die Objektträger mit 3%igem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) beträufelt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Blockierung der endogenen Peroxidase trägt zur Reduzierung der unspezifischen Hintergrundfärbung bei. Dieses ist insbesondere wichtig, wenn die Sichtbarmachung des Antigens auf einer Peroxidasereaktion beruht, so wie es in auch unserer Studie der Fall ist.

### **3. Plasmapräinkubation**

Zur Verhinderung von Reaktionen des Primärantikörpers mit stark geladenen Kollagen- und Bindegewebeelementen, welche ebenfalls Einfluss auf das Färbemuster nehmen können und so die Sensitivität für die Bindung des spezifischen Antikörpers gegen Hvgl-1 beeinträchtigen, wurden die Proben zur Neutralisation der Ladungsträger eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blutplasma inkubiert.

### **2.3.3 Immunhistochemischer Färbevorgang**

#### **1. Inkubation mit dem Primärantikörper**

Auf die vorbereiteten Präparate konnte nun der Primärantikörper, welcher zuvor aus seinem gefriergetrockneten Zustand mittels PBS-Puffer gelöst wurde, aufgetragen werden. Hierbei handelte es sich um einen polyklonalen IgG Kaninchenantikörper (Arbeitsgruppe Priv.-Doz. Dr. Strand, 1. Med. Klinik der Universitätsmedizin Mainz). In vorausgegangenen Versuchen mit gesundem Pankreasgewebe hatte sich gezeigt, dass bei einer Verdünnung der Antikörperlösung von 1:300 und einer 3-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur, eine optimale Färbung erzielt werden konnte.

#### **2. Inkubation mit dem Sekundärantikörper**

Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, einem in PBS-Lösung vorliegenden biotinyliertem Anti-Kaninchenantikörper, erfolgte 15-minütig bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper lag hier in höherer Konzentration vor, um ein „*cross-linking*“ der Bindung von zwei Primärantikörpern an den Fab-Regionen der Sekundärantikörper zu verhindern.

#### **3. Zugabe der Streptavidinperoxidase**

Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde das Streptavidin-Substrat hinzugegeben. Als Enzym diente in diesem Fall die Meerrettichperoxidase, welche zusammen mit dem Streptavidin als Streptavidinperoxidase komplexiert vorlag. Die Inkubation erfolgte ebenfalls 15-minütig bei Raumtemperatur.

#### **4. Sichtbarmachung des AG-AK Komplexes**

Zur Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes wurden die Präparate mit dem Chromogen DAB behandelt. Die Inkubation erfolgte ebenfalls 15-minütig bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid als Substrat der HRP oxidieren die

freiwerdenden Protonen das vorher fast farblose Chromogen zu seinem farbigen Endprodukt unter Bildung von Wasser. In vorliegendem Fall kommt es zu einer Präzipitation eines braunen Farbproduktes.

### **5. Entwässerung (Dehydrieren)**

Nach Abschluss des immunhistochemischen Färbevorgangs wurden die Präparate mittels ansteigender Alkoholreihe dehydratisiert:

Aqua dest.	1 x 3 Minuten
50% Ethanol	1 x 3 Minuten
70% Ethanol	1 x 3 Minuten
80% Ethanol	1 x 3 Minuten
96% Ethanol	1 x 3 Minuten
Xylol	2 x 3 Minuten

Nach Dehydrierung konnten die Präparate einer Kernfärbung mit wässriger Hämatoxylin-Eosin-Lösung (HE-Färbung) unterzogen werden und mit einem üblichen Eindeckmedium auf Xylol-Basis eingedeckt werden.

### **6. Qualitätssicherung**

Zum Zwecke der Qualitätssicherung wurde als Negativkontrolle bei einem Schnittpräparat von jedem Tumorblock auf die Behandlung mit dem primären Antikörper verzichtet. Alle anderen Behandlungsschritte wurden exakt identisch durchgeführt. Somit konnte die spezifische Bindung des Primärantikörpers belegt werden und falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Als Positivkontrolle für die Wirksamkeit der Färbung diente das die Tumoren umgebende gesunde Pankreasgewebe.

## 2.4 Histologische Expressionsbeurteilung von Hvgl-1

Zur lichtmikroskopischen Beurteilung der Hvgl-1 Expression im Tumorgewebe wurden folgende Expressionsstufen anhand eines 4-stufigen Score festgelegt:

- 0 = negativ (keine Hvgl-1-Expression)
- 1 = schwach (Hvgl-1-Expression von geringer Färbeintensität)
- 2 = mittel (Hvgl-1-Expression von mittlerer Färbeintensität)
- 3 = stark (Hvgl-1-Expression von starker Färbeintensität)

Lichtmikroskopisch zeichnete sich erhaltenes Pankreasgewebe durch eine homogene mittelgradige Färbung seiner Gangstrukturen aus, welche mit Expressionsstufe 2 des erkrankten Gewebes verglichen werden kann. In erkranktem Gewebe erwies sich die Expression von Hvgl-1 recht unterschiedlich. Es kamen sowohl Expressionsverluste, als auch Überexpressionen vor. Die Auswertung der Gewebeproben erfolgte semiquantitativ und unabhängig durch drei immunhistologisch erfahrene Gutachter.

## 2.5 Statistische Auswertungen

Alle erhobenen Daten wurden mit dem Programm BMDP des *Department of Biomathematics (BMDP)* der *University of California, Statistical Software Inc.*, Los Angeles, USA, ausgewertet (111).

An biometrischen Basiswerten standen alle Variablen der deskriptiven Statistik, insbesondere Modalwert, Median, Mittelwert, Minimal- und Maximalwert, Varianz, Standardabweichung und Variationskoeffizient sowie Angaben zu allen gewünschten Perzentilen zur Verfügung.

Die Beziehungen zwischen kategorisierten Parametern wurden in Mehr-Felder-Tafeln dargestellt und mittels des Pearson Chi-Quadrat-Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Univariate Überlebensanalysen erfolgten unter Berechnung von Kaplan-Meier-Überlebenskurven (112), die mit dem Mantel-Cox-Test auf statistische Signifikanz überprüft wurden. Angeschlossen wurden multivariate Überlebensanalysen unter

Berechnung von Cox-Regressionsmodellen (*Cox Proportional Hazard Regression Models*) im "forward stepping" -Modus, deren Ergebnisse wiederum mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven validiert wurden. Diese wurden mit dem Programm SPSS 26.0 erstellt (113). Bei zwei und mehr unabhängigen Variablen erfolgten die Gesamtvergleiche mit Log-Rank-Test.

Statistische Signifikanz wurde jeweils für ein  $\alpha$ -Niveau von  $\leq 0.05$  (Cox-Modell:  $\leq 0,10$ ) angenommen, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\leq 5\%$  (Cox-Modell:  $\leq 10\%$ ), die Null-Hypothese fälschlich zu verwerfen.

Wegen der in dieser Arbeit vorliegenden multiplen Testproblematik, welche immer dann vorliegt, wenn anhand eines Kollektivs mehrere statistische Tests bzgl. verschiedener Zielparameter durchgeführt werden, konnte die statistische Auswertung nur explorativ angesetzt werden. Um als signifikant nachgewiesene Thesen von dem hier untersuchten Patientenkollektiv auf die Grundgesamtheit zu verallgemeinern, sind daher weitere Studien notwendig.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immunhistochemische Analyse der Hugl-1 Expression am Pankreas

Da die Hugl-1 Immunhistochemie im Rahmen der Studie erstmalig beim Pankreasgewebe angewendet wurde erwies es sich zunächst als nützlich, das Färbemuster von lichtmikroskopisch normalem Pankreasgewebe zu analysieren. Aufgrund der Erstbeschreibung gehören die entsprechenden Abbildungen redaktionell auch zum Ergebnisteil.

Die Antigen-Antikörper-Reaktion zeigte, dass sich die Expression von Hugl-1 insbesondere in kortikalen und submembranösen Zellkompartimenten aller Gangstrukturen (zentroazinärer Zellen, Schaltstückzellen, Gangzellen aller Größen) darstellen ließ. Das homogene Färbemuster macht eine hohe Bindungsspezifität des Hugl-1 Antikörpers für sein Antigen deutlich. Auch im Zytoplasma fand sich eine homogene mittelgradige Verteilung. Eine Färbung des exokrinen Parenchyms sowie von Gefäßwänden, Bindegewebe oder Fettgewebe konnte kaum beobachtet werden (siehe Abb. 3 und 4).

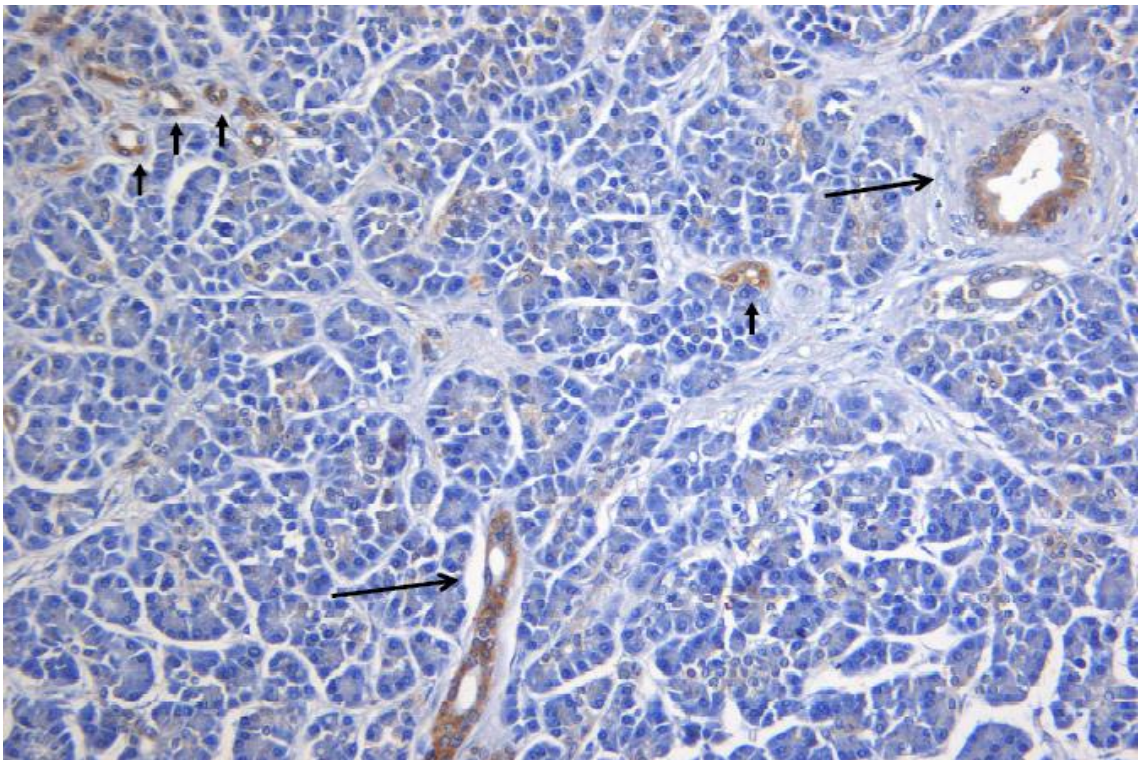
Wie erwartet, zeigten die Zellkerne peripankreatischer parasymphischer Ganglienzellen ebenfalls eine starke Färbung (siehe Abb. 5), was Ergebnisse an einer Studie mit Hirngewebe bestätigt (82).

Es stellte sich ebenfalls heraus, dass die Inselzellen als Repräsentanten des endokrinen pankreatischen Anteils ebenfalls Hugl-1 positiv sind. Sie zeigten zwar eine schwache, aber meist positive zytoplasmatische Färbung.

Auch ein Vergleich mit entzündlich affektiertem Gewebe aus Proben einer akuten bzw. chronischen Pankreatitis zeigte keine Abweichung hinsichtlich der Hugl-1 Expression im Normalgewebe. Es ist somit davon auszugehen, dass die Färbung von Gangepithel in Pankreasgewebe reproduzierbar und spezifisch ist.

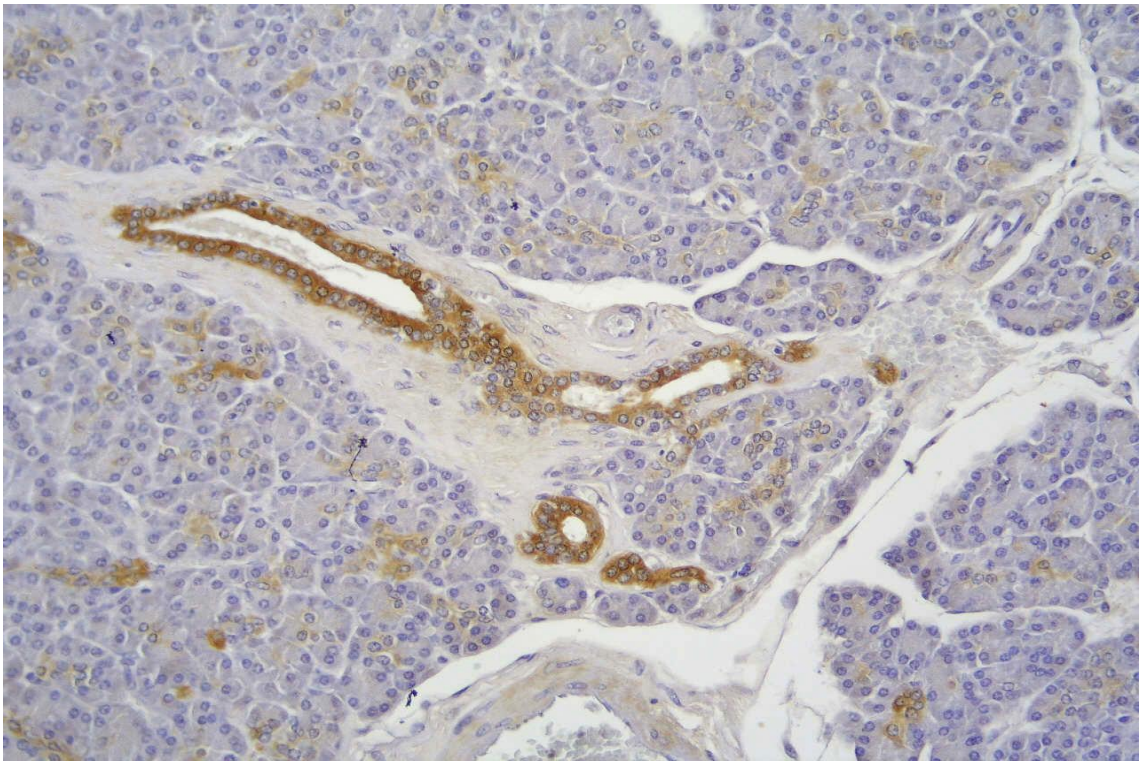
Die folgenden Abbildungen 3 - 7 (98) zeigen die Hugl-1 Expression in gesundem und entzündlichem Pankreasgewebe.

### 3.1.1 Hugl-1 Expression in gesundem Pankreasgewebe



*Abb. 1: Normales Pankreas. Positiv in großen und kleinen Ausführungsgängen, Objektivvergrößerung 10-fach*



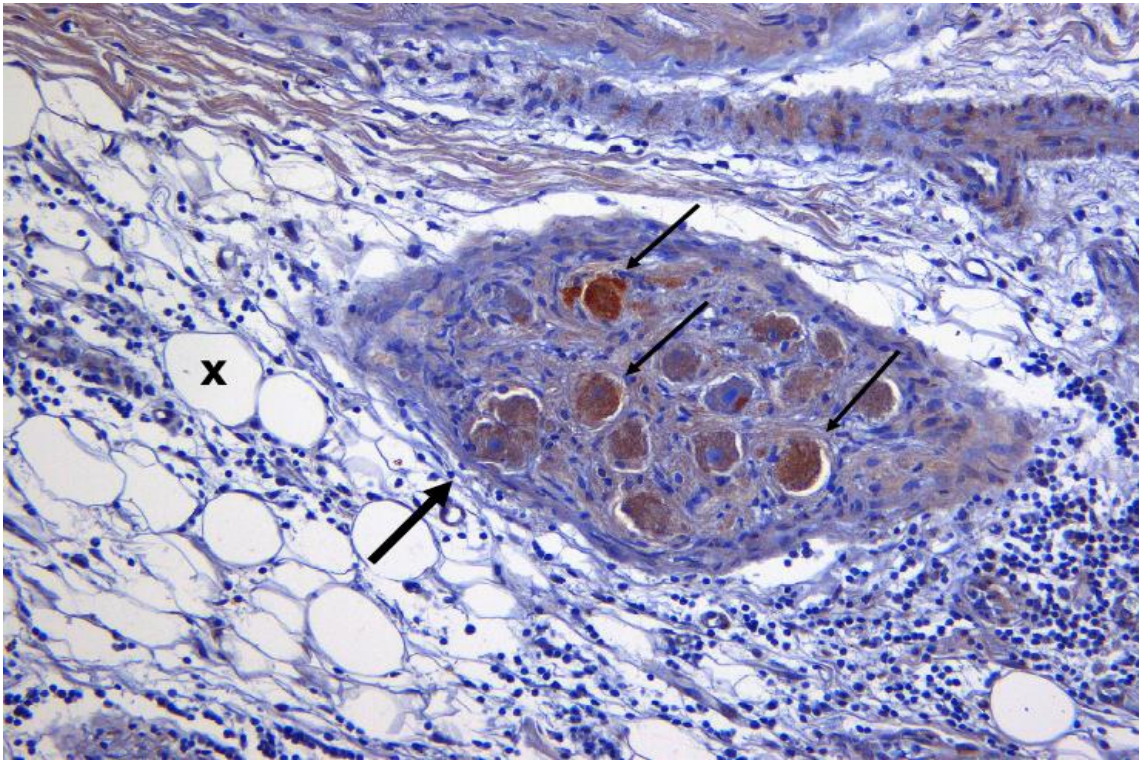


**Abb. 2:** *Normales Pankreas. Positiv in großen und kleinen Ausführungsgängen, Objektivvergrößerung 10-fach*

Abbildung 1 zeigt die Struktur einer serösen Drüse. Innerhalb der locker zusammengefügtten Läppchen befinden sich Gruppen von Gangverzweigungen mit ihren Drüsendstücken (Azini). Die einzelnen Läppchen sind durch dünne Bindegewebssepten voneinander abgegrenzt. Die Hugl-1 Expression zeigt sich deutlich in den submembranösen Kompartimenten der Gangepithelien der großen Ausführungsgänge (große Pfeile) sowie auch in den submembranösen Anteilen der kleinen Ausführungsgänge (kleine Pfeile). Die innerhalb des Drüsenparenchyms liegenden zentroazinären Zellen zeigen sich im Gegensatz zu den Azini ebenfalls Hugl-1 positiv.

In Abbildung 2 sieht man zentral die Struktur eines großen Ausführungsgangs. Dieser ist neben kleineren Ausführungsgängen durch Bindegewebe vom exokrinen Parenchym abgegrenzt. Die Hugl-1 Expression in den Gangepithelzellen ist homogen verteilt und hebt sich deutlich vom umgebenden Gewebe ab. Auch die Hugl-1 Expression in den kleinen Gangstrukturen, bis hin zu den zentroazinären Zellen in umliegendem Drüsengewebe kann als regelmäßig und homogen beurteilt werden.

### 3.1.2 Hugl-1 Expression in peripankreatischen parasympathischen Ganglienzellen



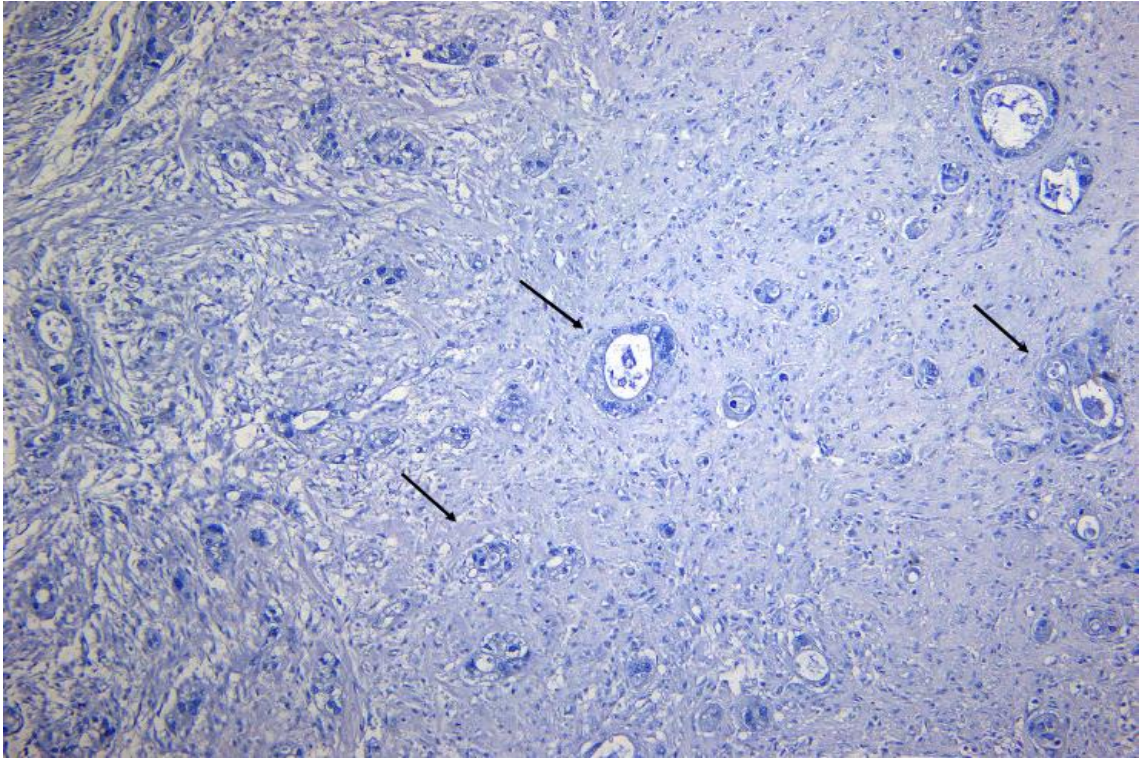
*Abb. 3: Hugl-1-Expression in einem parasympathischen Ganglion, Objektivvergrößerung 20-fach*

Die Abbildung 3 zeigt ein intramurales parasympathisches Ganglion im peripankreatischen Fettgewebe (großer Pfeil). Das X markiert eine peripankreatische Fettzelle. In den Perikaryen der Ganglienzellen ist die Hugl-1 Expression deutlich erkennbar. Das Verteilungsmuster ist hier sowohl submembranös, als auch zytoplasmatisch (kleine Pfeile). Das umgebende Gewebe ist durchweg negativ.



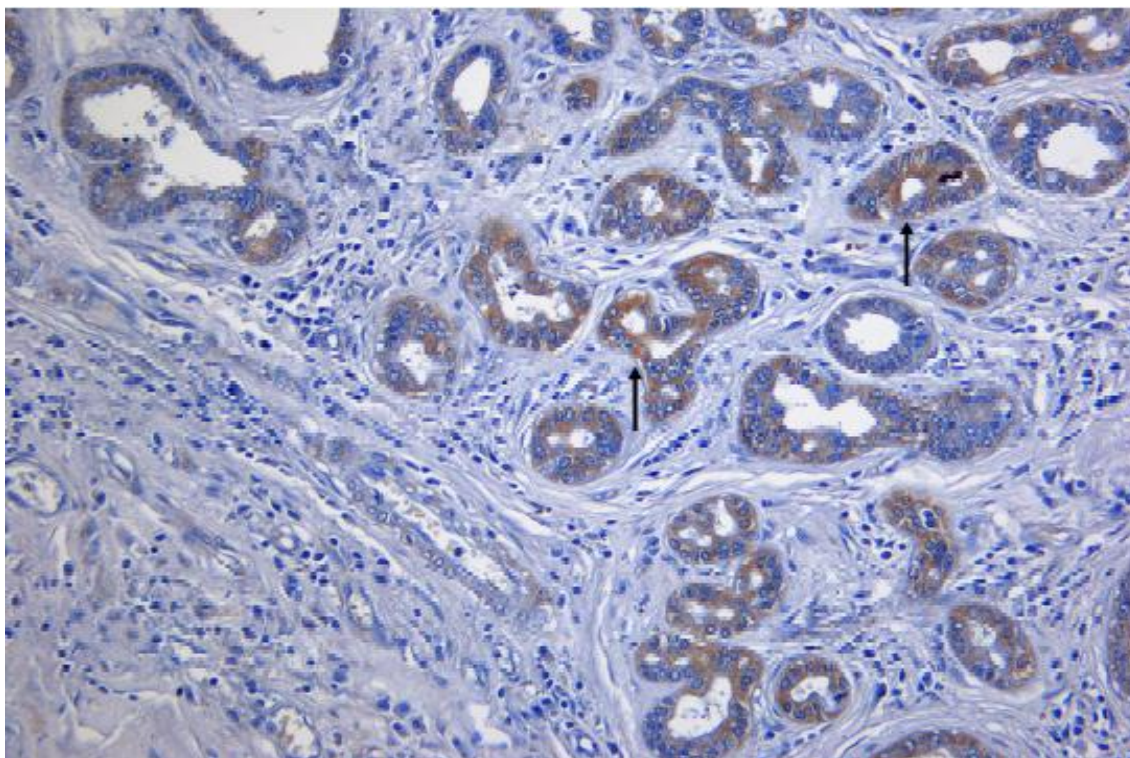
### 3.2 HUG1-1 Expression in Adenokarzinomen des Pankreas

Im Folgenden sind Beispiele für die von Tumor zu Tumor sehr unterschiedliche HUG1-1-Expression in Pankreaskarzinomen wiedergegeben.



**Abb. 4:** *Pankreaskarzinom mit komplettem Verlust der HUG1-1-Expression, Objektivvergrößerung 4-fach*

Die Abbildung 4 zeigt gering differenziertes Tumorgewebe (G3) mit partiell drüsigem, partiell soliden und einzelligen Wachstum bei ausgeprägter, für Pankreaskarzinome typischer desmoplastischer Umgebungsreaktion. Die Pfeile markieren noch als drüsig differenziert erkennbare Tumoranteile.



**Abb. 5:** *Pankreaskarzinom mit mäßig ausgeprägter Expression von HUGL-1, Objektivvergrößerung 10-fach*

Abbildung 5 zeigt Karzinomgewebe mit mäßig starker HUGL-1-Expression in einem gangartig aufgebautem, besser differenzierten Pankreaskarzinom (G2) (Pfeile). Die Stärke der HUGL-1-Expression entspricht dabei derjenigen von Normalgewebe.

Von allen 97 untersuchten Tumoren waren 36 HUGL-1 negativ und 33 schwach positiv. Eine mittlere HUGL-1 Expression konnte in 19 Tumoren festgestellt werden. In 9 Fällen wies der Tumor eine starke HUGL-1 Expression auf (Tabelle 2).

<b>HUGL-1 Expressionsstufe</b>	<b>Anzahl der Tumoren (n)</b>
0 = Verlust	36
1 = schwach	33
2 = mittel	19
3 = stark	9
	n = 97

**Tabelle 2:** *Verteilung der HUGL-1-Expressionsstufen in 97 Pankreaskarzinomen*

### 3.3 Überlebensanalyse

Die im Folgenden dargestellte univariate Überlebensanalyse, die jeweils in tabellarischer Form und durch Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt wird, bezieht sich in der Regel auf alle 97 Patientenfälle. In die multivariate Überlebensanalyse konnten nur diejenigen 94 Fälle aufgenommen werden, deren Datensatz zu allen erhobenen Parametern vollständig war. Bei drei Patienten fehlten einzelne Angaben.

#### 3.3.1 Allgemeine Daten zum Überleben

Von den 97 Patienten waren 56 (57.7 %) männlich und 41 (42.3 %) weiblich. Das mittlere Alter lag zum Zeitpunkt der Diagnose bei 64.6 Jahren  $\pm$  8.8 (SD) und wies keinen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen auf ( $p > 0.05$ ). Der Beobachtungszeitraum lag zwischen 2 und 92 Monaten, wobei die mittlere Beobachtungsdauer bei  $17 \pm 16$  (SD) Monaten lag. 86 Patienten starben nach einer Beobachtungszeit von  $14 \pm 12$  (SD) Monaten, während 11 Patienten nach einer Beobachtungszeit von  $44 \pm 22$  (SD) Monaten noch lebten. Das mittlere Überleben aller Patienten lag bei 17.4 Monaten, das mediane Überleben bei 11 Monaten. Die 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit betrug 47.4 % und die 2 Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 20.6 % (Abb. 6).

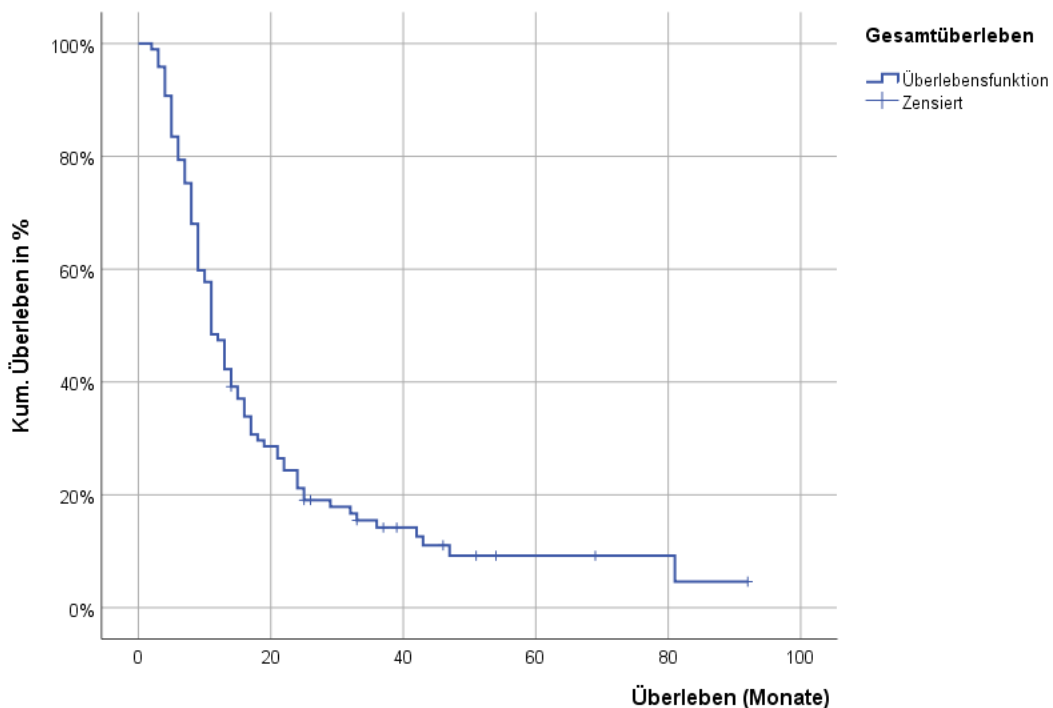


Abb. 6: *Kaplan-Meier-Überlebenskurve für alle 97 Patienten (Gesamtüberleben)*

### 3.3.2 Univariate Überlebensanalyse

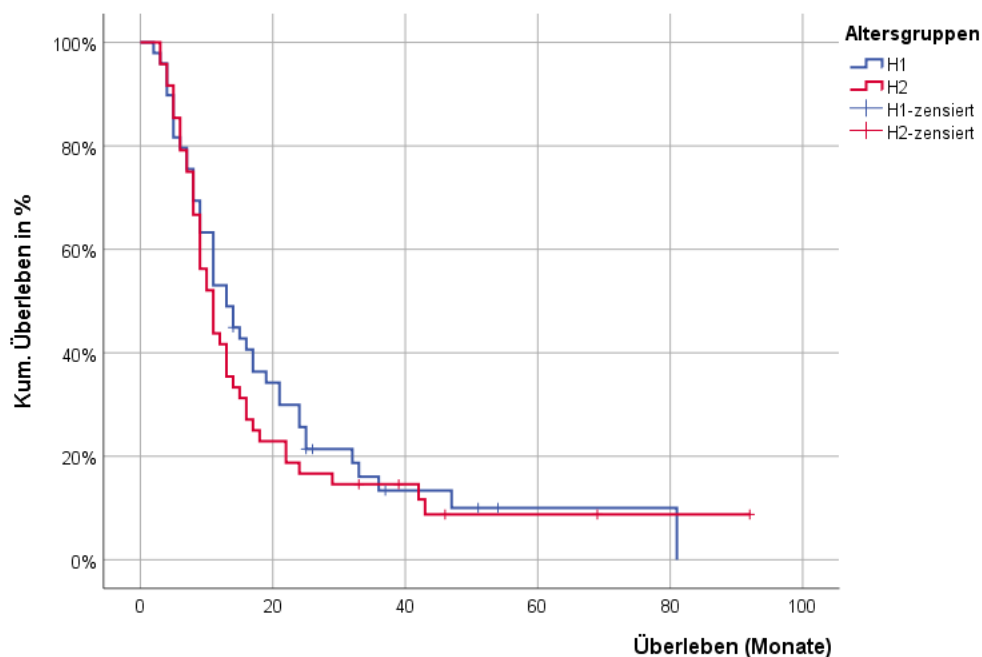
#### 3.3.2.1 Alter der Patienten

Die Überlebensanalyse zum Alter der Patienten bei Diagnosestellung erfolgte durch Bildung zweier Gruppen mit dem Median (65 Jahre) als Grenze, wodurch sich zwei annähernd gleich große Gruppen (49:48) bilden ließen.

Zwischen beiden Gruppen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied im Überleben (Tabelle 3, Abbildung 7).

Alter	≤ 65 Jahre (H1)	> 65 Jahre (H2)
Anzahl der Patienten	49	48
verstorbene Patienten	43	43
Medianes Überleben (Monate)	14	11
Mittleres Überleben (Monate)	22	20
1-Jahres-ÜLW %	55.1	43.8
2-Jahres-ÜLW %	29.8	20.8

**Tabelle 3:** Überleben in Bezug zur Altersverteilung ( $p > 0.05$ )



**Abb. 7:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Altersverteilung der Patienten



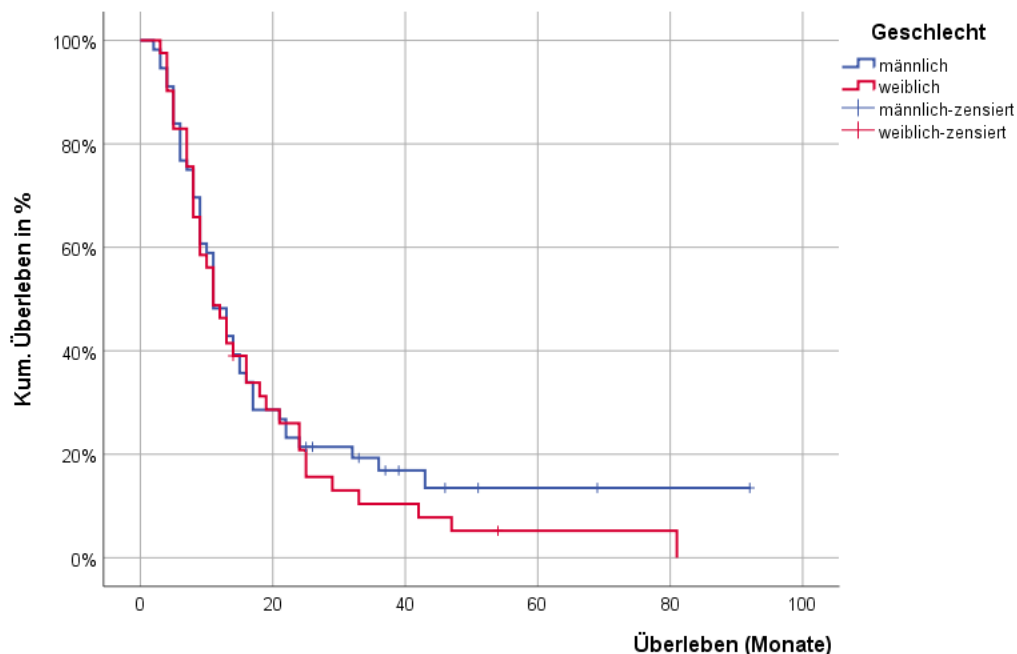
### 3.3.2.2 Geschlecht der Patienten

Weiterhin kann festgestellt werden, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit nicht mit dem Geschlecht der Patienten korreliert (Tabelle 4, Abbildung 8).

Die Überleber unter den 56 Männern (57.7 %) wiesen zwar einen höheren Wert für das mittlere Überleben auf als die 41 Frauen (42.3 %), der sich auch als Trend in den ab ca. 2 Jahren Krankheitsverlauf auch in den Überlebenskurven widerspiegelt. Eine statistische Signifikanz ergab sich aber nicht ( $p > 0,05$ ).

Geschlecht	männlich	weiblich
Anzahl der Patienten	56	41
verstorbene Patienten	47	39
Medianes Überleben (Monate)	11	12
Mittleres Überleben (Monate)	24	18
1-Jahres-ÜLW %	48.2	51.2
2-Jahres-ÜLW %	25.0	25.8

**Tabelle 4:** Überleben in Bezug zum Geschlecht ( $p > 0.05$ )



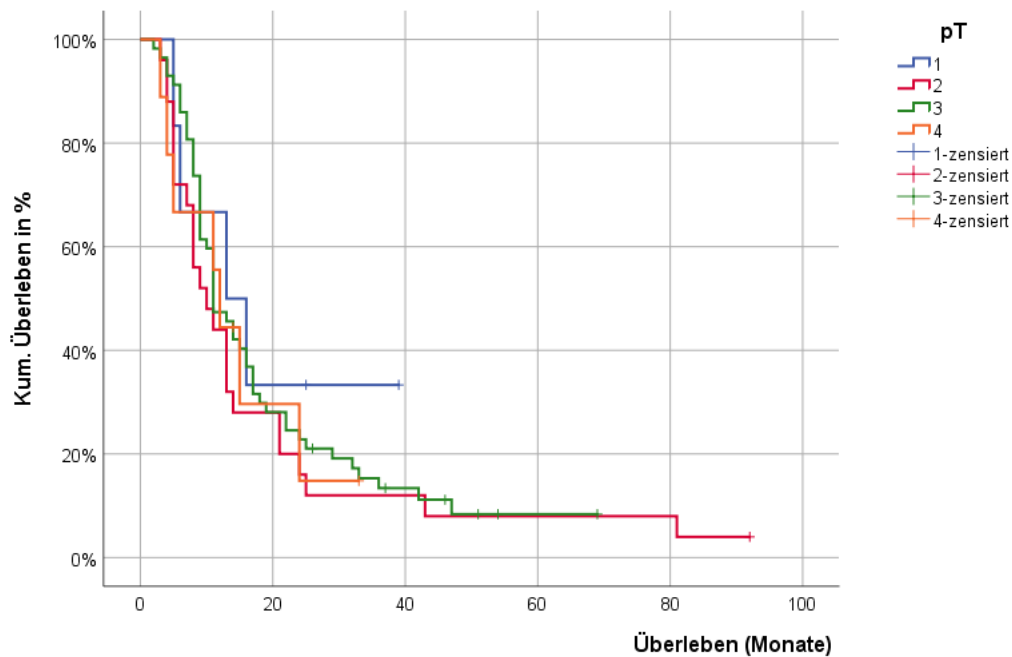
**Abb. 8:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Geschlecht der Patienten

### 3.3.2.3 Ausdehnung des Primärtumors (pT)

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit T1 Tumoren ist im 1. Jahr der Erkrankung mit 66.7 % deutlich höher als die der Patienten mit T2 (44 %), T3 (49.1 %) und T4 (44.4 %) Tumoren (Tabelle 5, Abbildung 9). Im 2. Jahr fällt auf, dass sich die Überlebenswahrscheinlichkeiten von T1 (16.7 %) und T2 (16 %) kaum noch unterscheiden. Dass T3 Tumore eine höhere 2-Jahres-ÜLW von 24.6 % zeigten, ist ausweislich der Kaplan-Meier-Kurven als „Momentaufnahme“ anzusehen.

pT	1	2	3	4
Anzahl der Patienten	6	25	57	9
verstorbene Patienten	4	24	51	7
Medianes Überleben (Monate)	13	10	11	12
Mittleres Überleben (Monate)	18	18	18	13
1-Jahres-ÜLW (%)	66.7	44	49.1	44.4
2-Jahres-ÜLW (%)	16.7	16	24.6	11.1

**Tabelle 5:** Überleben in Bezug zur Tumorausdehnung (pT) ( $p > 0.05$ )



**Abb. 9:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Tumorausdehnung (pT)



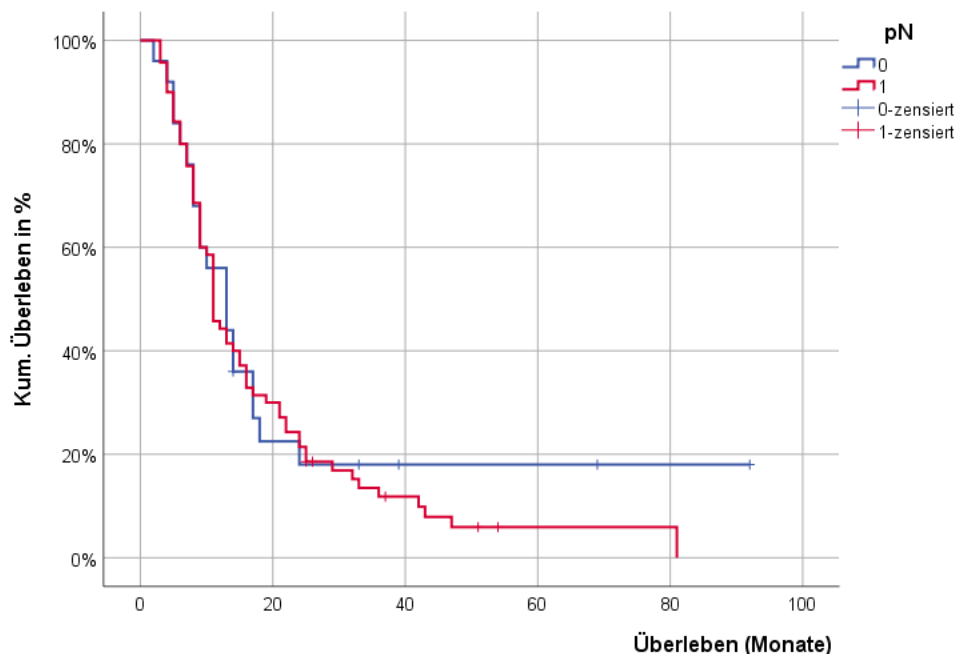
### 3.3.2.4 Lymphknotenstatus (pN)

Für zwei Patienten konnte kein Lymphknotenstatus erhoben werden, so dass sich die Statistik zu pN nur auf 95 Patienten beziehen kann (Tabelle 6, Abbildung 10).

Die große Mehrheit der Patienten wies bereits Lymphknotenmetastasen auf ( $n = 70$ , 73.7 %); die 1-Jahres-ÜLW dieser Patienten (45.7 %) ist gegenüber den Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (56 %) vermindert. Die 2-Jahres-ÜLW ist in beiden Gruppen annähernd gleich niedrig.

pN	0	1
Anzahl der Patienten	25	70
verstorbene Patienten	19	65
Medianes Überleben (Monate)	13	11
Mittleres Überleben (Monate)	19.1	16.9
1-Jahres-ÜLW (%)	56	45.7
2-Jahres-ÜLW (%)	20	21.4

**Tabelle 6:** Überleben in Bezug zum Lymphknotenstatus (pN) ( $p > 0.05$ )



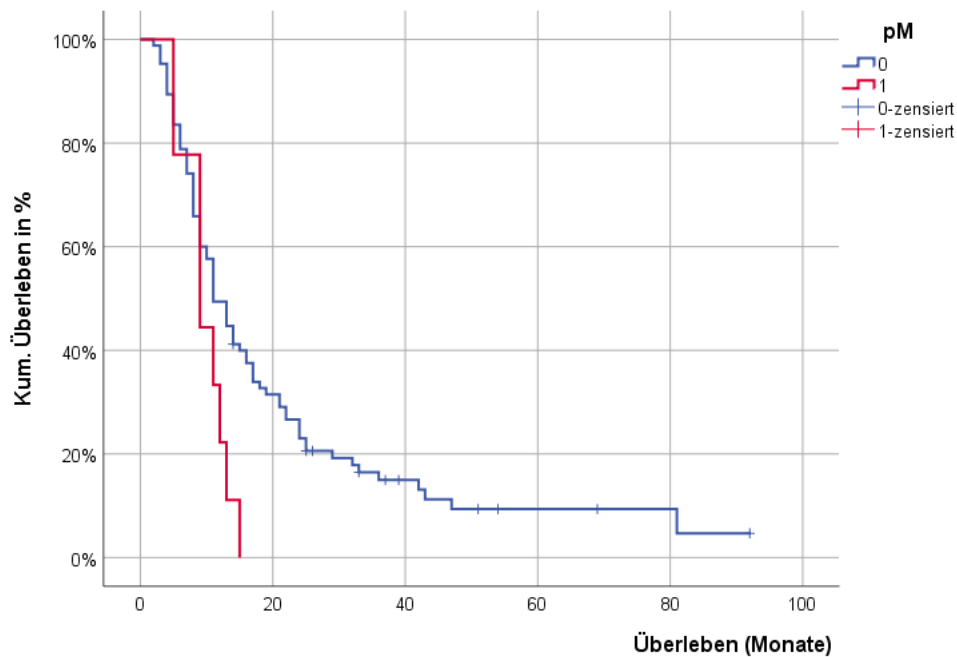
**Abb. 10:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Lymphknotenstatus (pN)

### 3.3.2.5 Fernmetastasierung (pM)

Auch bezüglich der Fernmetastasierung war der Datensatz nicht ganz vollständig; hier fehlten Angaben zu drei Patienten, so dass insgesamt 94 Beobachtungen vorliegen (Tabelle 7, Abbildung 11). Die Anwesenheit von Fernmetastasen reduziert die Überlebenswahrscheinlichkeit deutlich. So liegt die 1-Jahres-ÜLW bei Patienten ohne Fernmetastasen bei 50.6 % und bei Patienten mit Fernmetastasen nur bei 22.1 %. Nach zwei Jahren waren alle Patienten mit Fernmetastasen bereits verstorben. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist statistisch signifikant ( $p = 0.0474$ ).

pM	0	1
Anzahl der Patienten	85	9
verstorbene Patienten	75	9
Medianes Überleben (Monate)	13	9
Mittleres Überleben (Monate)	18.2	9.8
1-Jahres-ÜLW (%)	50.6	22.1
2-Jahres-ÜLW (%)	23.5	0

**Tabelle 7:** Überleben in Bezug zur Fernmetastasierung (pM) ( $p = 0.0474$ )



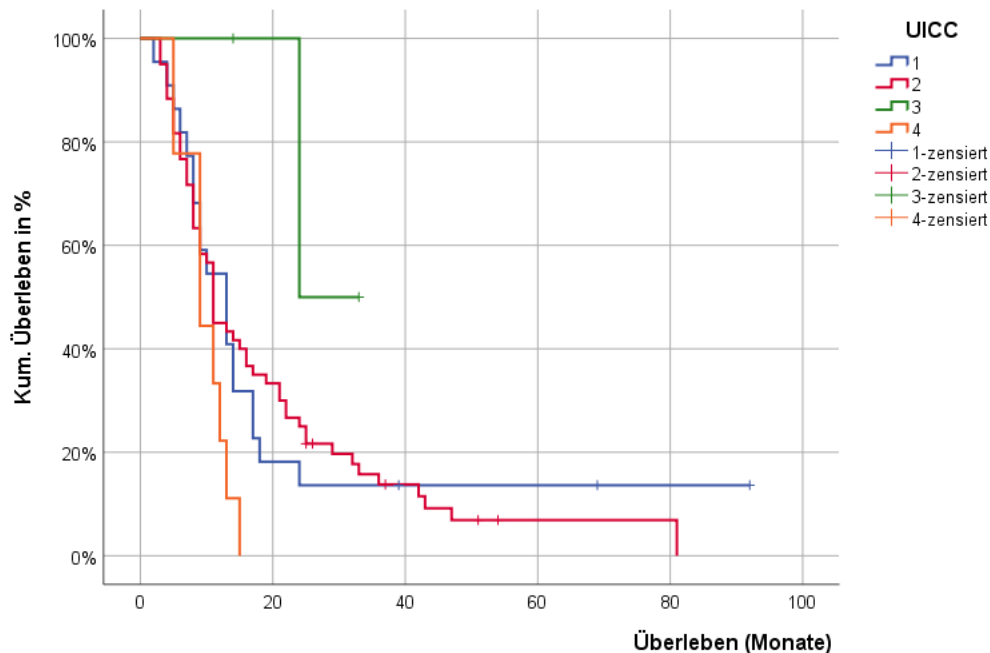
**Abb. 11:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Fernmetastasierung (pM)

### 3.3.2.6 pTNM-Klassifikation der UICC

Für die zusammenfassende pTNM-Klassifikation nach UICC standen Daten von 94 Patienten zur Verfügung (Tabelle 8, Abbildung 12). Von diesen befanden sich allein 70 im Stadium II (65.8 %). Im Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeiten der beiden besser besetzten Gruppen I und II zeigt sich insgesamt kein statistisch signifikanter Unterschied.

pTNM (UICC)	I	II	III	IV
Anzahl der Patienten	12	70	3	9
verstorbene Patienten	10	64	1	9
Medianes Überleben (Monate)	13	11	24	9
Mittleres Überleben (Monate)	24.4	19.6	28.6	9.8
1-Jahres-ÜLW (%)	58.3	45.7	100.0	33.3
2-Jahres-ÜLW (%)	25.0	24.3	100.0	0

**Tabelle 8:** Überleben in Bezug zur pTNM-Klassifikation der UICC ( $p > 0.05$ )



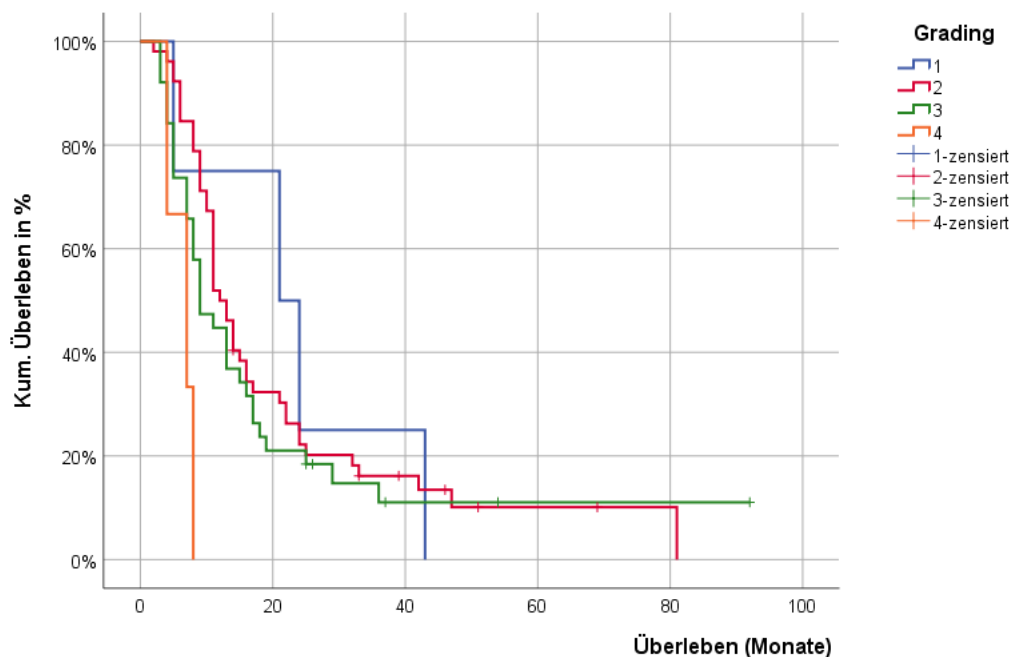
**Abb. 12:** Kaplan-Meier Überlebenskurven zur pTNM-Klassifikation der UICC

### 3.3.2.7 Tumorgradierung

Die Überlebenswahrscheinlichkeit bei gut differenzierten Tumoren liegt im ersten Jahr bei 75 %. Die 2-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit ist in den Gruppierungen 1-3 homogen verteilt und liegt im Durchschnitt bei 22 %. Für schlecht differenzierte Tumore der Gruppe 4 liegen hier keine Ergebnisse vor, da alle drei betroffenen Patienten weniger als ein Jahr überlebt haben; formal könnte man auch 0 % als Wert angeben. Die Überlebenskurven belegen, dass die Gradierung innerhalb der gut besetzten Gruppen G2 und G3 keinen unterschiedlichen Einfluss auf das Überleben hatte (Tabelle 9, Abbildung 13).

<b>Grading</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Anzahl der Patienten	4	52	38	3
verstorbene Patienten	4	46	33	3
Medianes Überleben (Monate)	21	12	9	7
Mittleres Überleben (Monate)	23.3	18.7	16.4	6.3
1-Jahres-ÜLW (%)	75	50	47.4	-
2-Jahres-ÜLW (%)	25	21.2	23.7	-

**Tabelle 9:** *Überleben in Bezug zur Tumorgradierung (Grading) ( $p > 0.05$ )*



**Abb. 13:** *Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Tumorgradierung*

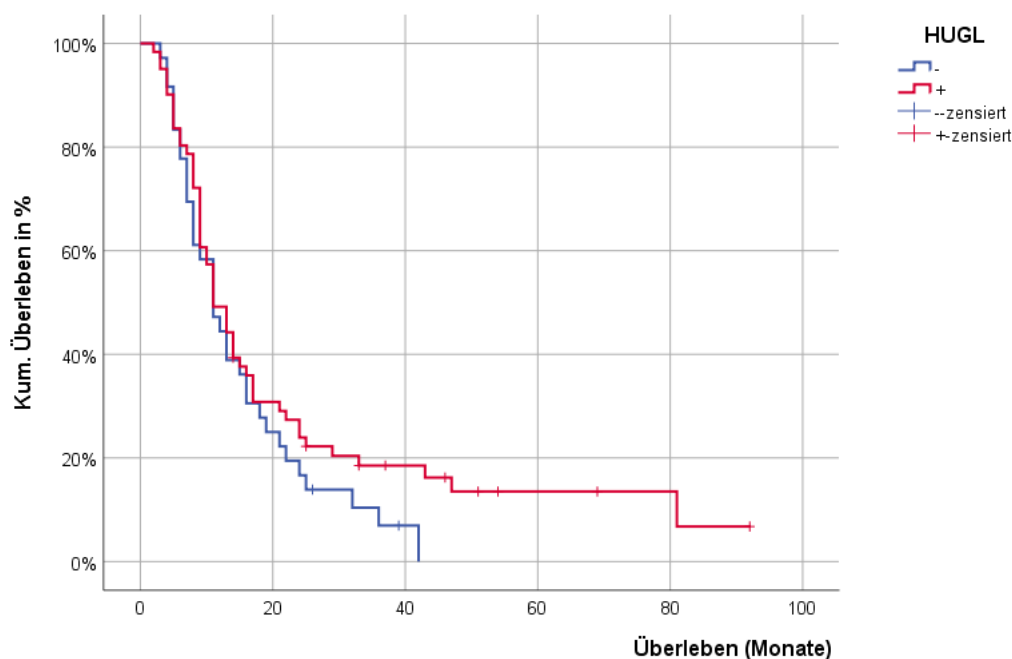
### 3.3.2.8 HUGL-1-Expression

Bei der Auswertung der HUGL-1-Expression wurde zunächst ein negatives Färgergebnis (0) mit einem positiven (1-3) verglichen (Tabelle 10, Abbildung 14).

Dabei zeigte sich, dass zwar das mediane Überleben und die 1-Jahres-ÜLW gleich waren, sich aber ab dem zweiten Beobachtungsjahr doch ein positiver Effekt bei HUGL-1-Positivität abzeichnete, der sich in den Daten im höheren mittleren Überleben von mehr als 5 Monaten (23.6 vs. 15.0) und einer höheren 2-Jahres-ÜLW manifestierte. Dieser Unterschied war allerdings noch nicht statistisch signifikant, stellt aber bei einer Krebserkrankung des Pankreas durchaus einen beachtenswerten Unterschied dar.

HUGL-1 Expression	-	+
Anzahl der Patienten	36	61
verstorbene Patienten	34	52
Medianes Überleben (Monate)	11.5	11
Mittleres Überleben (Monate)	15.0	23.6
1-Jahres-ÜLW (%)	47.2	49.2
2-Jahres-ÜLW (%)	19.4	27.4

**Tabelle 10:** Überleben in Bezug zur HUGL-1-Expression, neg. (-) vs. pos. (+) ( $p > 0,05$ )

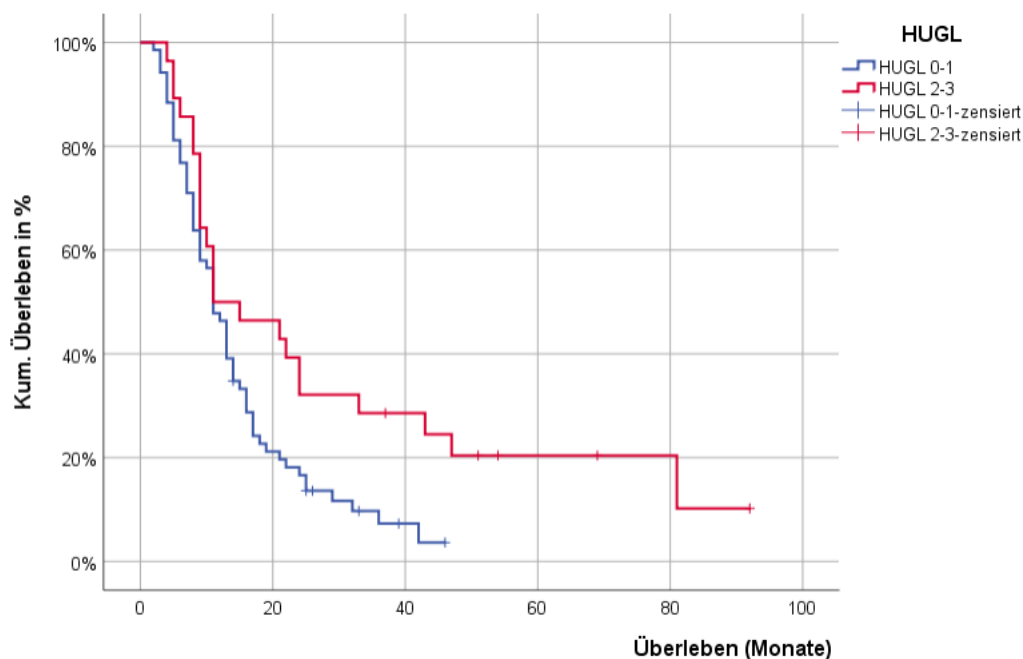


**Abb. 14:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur HUGL-1-Expression neg. vs. pos.

In einer zweiten Datenauswertung wurden die 33 Patienten mit geringer HUGL-1-Expression (Score 1) gemeinsam mit den negativen (Score 0) in einer Gruppe geführt (Tabelle 11, Abbildung 15). So entstanden zum Vergleich die Gruppen 0-1 und 2-3. Zwischen diesen konnte ein statistisch signifikanter Unterschied dargestellt werden, der sich ab ca. 12 Monaten Verlauf herausbildete. Die Patienten der Gruppe 2-3 verfügten über eine doppelt so lange mittlere Überlebenszeit und eine fast doppelte 2-Jahres-ÜLW. Statistik und grafische Darstellung zeigen, dass diese Einteilung am besten die Möglichkeiten der HUGL-1-basierten Prognostik wiedergibt.

HUGL-1 Expression	0-1	2-3
Anzahl der Patienten	69	28
verstorbene Patienten	63	23
Medianes Überleben (Monate)	11	11
Mittleres Überleben (Monate)	15	30
1-Jahres-ÜLW (%)	49.3	50.3
2-Jahres-ÜLW (%)	21.0	39.3

**Tabelle 11:** Überleben in Bezug zur HUGL-1-Expression, zwei Gruppen ( $p=0.0241$ )



**Abb. 15:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur HUGL-1-Expression in zwei Gruppen (0-1 vs. 2-3)

### 3.3.3 Korrelation der Hugl-1 Expression mit klinischen Parametern, Staging und Grading

Um eine mögliche Korrelation der Hugl-1 Expression mit den einzelnen klinischen Parametern sowie *Staging* und *Grading* festzustellen, wurden diese den Ergebnissen der Hugl-1 Expressionsstufen in Tabelle 12 gegenübergestellt.

Variable		Hugl-1 Expressionsstufen			
		0	1	2	3
<b>Anzahl der Fälle</b>		36	33	19	9
<b>Alter</b>	≤ 65	19	15	10	5
	> 65	17	18	9	4
<b>Geschlecht</b>	männlich	17	24	11	4
	weiblich	19	9	8	5
<b>Tumorausdehnung</b>	pT1	4	2	0	0
	pT2	9	6	7	3
	pT3	20	21	10	6
	pT4	3	4	2	0
<b>Lymphknotenstatus</b>	pN0	7	12	5	1
	pN1/pN2	28	20	14	8
<b>Fernmetastasen</b>	M0	31	29	16	9
	M1	3	3	3	0
<b>pTNM nach UICC-Klassifikation</b>	I	7	10	4	1
	II	24	17	11	8
	III	0	2	1	0
	IV	3	3	3	0
<b>Gradierung</b>	G1	0	0	3	1
	G2	18	20	8	6
	G3	17	13	7	1
	G4	1	0	1	1

**Tabelle 12:** *Korrelation der Hugl-1 Expression mit klinischen Parametern, Staging und Grading*

Im direkten Vergleich mit den einzelnen Parametern kann augenscheinlich festgestellt werden, dass die HUGL-1 Expression in den vier Expressionsstufen 0, 1, 2 und 3 nicht mit den anderen Größen korreliert war (Chi<sup>2</sup>-Test:  $p > 0.05$ ). Gleiches galt auch für die Darstellung in zwei Expressionsstufen (0-1 bzw. 2-3;  $p > 0.05$ , hier nicht wiedergegeben).

### 3.3.4 Multivariate Überlebensanalyse

Mit Hilfe des Cox-Regressionsmodells werden die einzelnen klinisch bzw. morphologisch relevanten Parameter (Geschlecht, *Staging*, *Grading*) und HUGL-1 Expression multivariat in Bezug auf ihre prognostische Aussagekraft unter Berücksichtigung etwaiger Abhängigkeiten zueinander untersucht. Dabei werden nur die Parameter mit zueinander unabhängiger prognostischer Relevanz aufgenommen.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 12 und 13 schrittweise dargestellt. Angegeben sind jeweils die Chi<sup>2</sup>-enter- bzw. die Chi<sup>2</sup>-remove Werte sowie die dazugehörigen p-Werte für das Ausgangsmodell und das Endergebnis nach der Aufnahme des letzten aufnahmefähigen Parameters. HUGL-1 wurde dabei in zwei Interpretationen vorgegeben, einmal in vier Gruppen (Ausprägungen 0, 1, 2 und 3) und einmal in den oben auch in den Kaplan-Meier-Überlebenskurven gezeigten zwei Gruppen (Ausprägungen 0-1 bzw. 2-3). Von den 97 Patientenfällen gingen aufgrund der Vollständigkeit der Daten nur 93 Fälle in die Analyse ein. Die Ausgangssituation vor Schritt 1 ist in Tabelle 13 wiedergegeben.

Variable	Chi <sup>2</sup> enter	Chi <sup>2</sup> remove	p-Wert
HUGL-1 (0-1 / 2-3)	5.82		0.0158
HUGL-1 (0 / 1 / 2 / 3)	2.48		0.1153
M	2.13		0.1448
G	1.82		0.1777
pTNM nach UICC	0.73		0.3932
pN	0.57		0.4491
Geschlecht	0.32		0.5688
pT	0.01		0.9400

**Tabelle 13:** Cox-Modell vor Schritt 1



Aus den Chi<sup>2</sup>-enter Werten geht hervor, dass sich die HUGL-1-Expression in zwei Gruppen im Vergleich mit den anderen Variablen als am relevantesten erweist, so sie als erste in das Cox-Modell aufgenommen wurde (Tabelle 14).

Variable	Chi <sup>2</sup> enter	Chi <sup>2</sup> remove	p-Wert
HUGL-1 (0-1 / 2-3)		5.82	0.0158
M	2.19		0.1392
HUGL-1 (0 / 1 / 2 / 3)	1.07		0.3010
pTNM nach UICC	0.87		0.3496
G	0.82		0.3659
pN	0.80		0.3720
Geschlecht	0.33		0.5632
pT	0.00		0.9691

**Tabelle 14:** *Cox-Modell nach Schritt 1 (Endergebnis)*

Weitere Variablen wurden nicht mehr berücksichtigt, da der Grenzwert für das p-Niveau für eine Aufnahme in das Cox-Modell ( $p \leq 0.10$ ) jeweils überschritten war.

Zusammenfassend wurde also im Cox-Modell nur HUGL-1, gestuft in den beiden Gruppen 0-1 bzw. 2-3, multivariate prognostische Relevanz zuerkannt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Pankreaskarzinome - Tumoren mit sehr schlechter Prognose

Die Diagnose eines duktales Pankreaskarzinoms bedeutet für die große Mehrzahl der Patienten eine sehr schlechte, im Grunde infauste Prognose. Die die in diesem Abschnitt wiedergegebenen letztverfügbaren Zahlen des Robert-Koch-Institutes für die Jahre 2017 und 2018 (1) weisen für Deutschland in diesem Zeitraum 19.280 bzw. 19.020 Neuerkrankungen aus, denen 18.005 bzw. 18.332 Todesfälle gegenüberstehen - letzten Endes bedeutet das anschaulich, dass innerhalb eines Jahres die Gruppe der Erkrankten fast komplett durch Tod bzw. „Nachrücken“ Neuerkrankter erneuert wird. Die relativen 5- und 10-Jahres-Überlebensraten von 10 % bzw. 7 - 8 % sprechen Bände, ebenso die Tatsache, dass Pankreaskarzinome unter 4 % aller maligner Tumoren stellen, aber für ca. 8 % der Krebstodesfälle verantwortlich sind. Nur für das maligne Mesotheliom, das aber mit ca. 1.600 Fällen pro Jahr viel seltener ist (1), ist die Prognose noch schlechter.

Andererseits weisen die Zahlen aber auch aus, dass es durchaus Langzeitüberleber gibt, also Patienten, die ein Pankreaskarzinom für viele Jahre überleben. Entsprechend ist trotz der Vielzahl der Patienten, die an dem Tumor schnell versterben, doch eine große Bandbreite an Verläufen möglich. Entsprechend macht es durchaus Sinn, nach Prognoseparametern auch beim Pankreaskarzinom zu suchen und sie für die Planung der Behandlungsstrategie (z.B. kurativer vs. palliativer Ansatz) in Anwendung zu bringen.

Der Status Quo der Prognostik ist sicher am besten der aktuellen „S3-Leitlinie für das exokrine Pankreaskarzinom“ zu entnehmen, die seit Dezember 2021 in der Langversion 2.0 vorliegt (4): Bezogen auf resezierte Pankreaskarzinome beschränken sich die Aufgaben des Faches Pathologie darauf, eine standardisierte, insgesamt umfangreiche Makropräparation durchzuführen, um zu einer sicheren Aussage zum R-Status der Tumoren zu gelangen. Außerdem sollen die Parameter zu pT, pN und pM aus der TNM-Klassifikation (55) verlässlich bestimmt werden und ein *Grading* vorgenommen werden. Außerdem sollen anlässlich der histologischen Untersuchung auch Aussagen über Lymphspalteninvasion (L), Blutgefäßinvasion (V) und Perineuralscheideninfiltration (Pn) getroffen werden. Immunhistochemische Anwendungen sind dort nur bezüglich der MMR-Proteine vorgesehen, da nur bei *Mismatch-Reparatur-Defizienz* (dMMR) bzw.

Mikrosatelliteninstabilität (MSI) im Tumor eine Voraussetzung für eine Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren in der Palliativsituation gegeben ist. Die immunhistochemischen Untersuchungen des PD-L1- oder des Her2/neu-Status, die gelegentlich bei Fällen von Pankreaskarzinomen klinischerseits angefordert werden, sind in der S3-Leitlinie nicht erwähnt. Molekularpathologische Anwendungen werden dort nur für die Bestimmung einer BRCA 1-/2-Keimbahnmutation vorgesehen; liegt diese vor, so empfiehlt die S3-Leitlinie eine Platin-basierte Erstlinientherapie.

Zusammenfassend ist es bisher nicht gelungen, neben den oben genannten klassischen Prognosefaktoren molekularbiologische oder immunhistochemische Variable als ergänzende anerkannte Prognosefaktor zu etablieren (69, 99). Alle bisher bekannten prognostischen Variablen, welche in Studien untersucht wurden, scheitern an widersprüchlichen Ergebnissen, nicht genügender Erprobung und Erfahrung oder dienen lediglich dazu, die Tumorgenese zu beschreiben.

Dennoch bleibt die Erprobung möglicher neuer immunhistochemischer oder molekularer Marker wichtig, um vielleicht doch in Zukunft Variablen zur Hand zu haben, die dabei behilflich sind, für den jeweiligen Patienten einen optimierten therapeutischen Weg zu eröffnen. Hierauf soll später in Kapitel 4.3 näher eingegangen werden.

## **4.2 Hugl-1 als möglicher immunhistochemischer Prognosefaktor**

Der in Mainz etablierte Hugl-1-Antikörper (bzw. ein gewerblich erhältlicher Lgl-1-Antikörper) wurde im Laufe der Jahre von den dortigen Arbeitsgruppen, aber auch anderweitig zur Charakterisierung von Tumorentitäten unter verschiedenen klinischen Gesichtspunkten eingesetzt. Im Folgenden soll zunächst auf diese Studien, danach auf unsere eigene Arbeit am Pankreaskarzinom eingegangen werden. Insgesamt konnten bei verschiedenen Tumorentitäten eine verminderte Expression des Markers sowie eine Korrelation mit klinikopathologischen Parametern, der Tumorprogression und der Prognose demonstriert werden.

### 4.2.1 Hvgl-1 Expression beim kolorektalen Karzinom

In einer Studie an der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz wurde untersucht, ob eine veränderte Expression von Hvgl-1 zur Progression des kolorektalen Karzinoms (CRC) beiträgt (86). Die Daten stammten aus einem Patientenkollektiv von 94 Patienten mit leitliniengerecht chirurgisch behandeltem CRC. Zur Evaluation der Entwicklung der Hvgl-1 Expression während der Adenom-Karzinom-Sequenz wurden mittels RT-PCR Transkriptionsprofile nicht-neoplastischer kolorektaler Mukosa (n=19), kolorektaler Polypen (n=10), CRCs (n=94) und Lebermetastasen (n=14) angefertigt und jeweils mit einem  $\beta$ -Aktin Transkriptionsprofil als Standard-Reaktionskontrolle verglichen. In nicht-neoplastischer kolorektaler Mukosa fand sich kein Verlust von Hvgl-1. Hingegen zeigten 60% der untersuchten kolorektalen Polypen einen Verlust von Hvgl-1. Bei den CRC lag der Verlust sogar bei 75 % und bei Lebermetastasen bei 72 %. Weitere immunhistochemische Untersuchungen der Proben mittels Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und PCR-Assays bestätigten o.g. Ergebnis. Ein Vergleich mit den klinischen Daten der 94 Patienten zeigte, dass der Verlust von Hvgl-1 unabhängig vom Geschlecht, der Tumorlokalisation, dem T-Status und dem M-Status erfolgte. Eine deutliche Korrelation mit einem Verlust von Hvgl-1 stellte sich für Tumore fortgeschrittener Tumorstadien (*UICC* III/IV) ( $p=0.0043$ ) heraus; schwächer signifikant war der Effekt für die Lymphknotenmetastasierung ( $p=0.034$ ).

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass sich ein Rückgang des Expressionsprofils von Hvgl-1 schon in frühen Phasen der Karzinomentstehung einstellt und eine damit zusammenhängende Tumorprogression und Infiltration von CRC-Tumorzellen ins lymphatische Gefäßsystem ein frühes genetisches Ereignis während der Adenom-Karzinom-Sequenz darstellt. Daten zum Überleben der Patienten lagen nicht vor (86).

### 4.2.2 Hvgl-1 Expression beim malignen Melanom

Am Pathologischen Institut der Universitätsklinik Regensburg fand parallel zur o.g. Studie eine Untersuchung der Hvgl-1 Expression im malignen Melanom und seiner Metastasen statt (88). Zur Begutachtung der Hvgl-1 Expression während der Melanomentwicklung kamen verschiedene molekularbiologische und immunhistochemische Verfahren zur Anwendung.

Neun Zelllinien des malignen Melanoms und seiner Metastasen wurden kultiviert und hinsichtlich der Hvgl-1 Expression untersucht. Die Expressionsprofile wurden mittels RT-PCR erstellt und mit normalen humanen epithelialen Melanozyten (NHEM) verglichen. In allen Zelllinien konnte eine deutliche Reduktion der Hvgl-1 Expression festgestellt werden. Eine Zelllinie zeigte sogar einen totalen Verlust von Hvgl-1. Ein ähnliches Ergebnis lieferte eine Inkubation der Zelllinien mit einem Anti-Hvgl-1 Antikörper und der anschließenden Analyse mit Western Blot.

Weiterhin wurde RNA von normaler Haut, isolierten humanen epidermalen Melanozyten, 4 Melanomen (Primärtumore), 7 Lymphknotenmetastasen und 5 Fernmetastasen analysiert. Das Zellmaterial wurde mit Hilfe der Laser-Dissektion gewonnen. Die anschließende molekulargenetische Untersuchung erfolgte mit RT-PCR. Auch hier zeigte sich eine deutliche Korrelation bezüglich des Hvgl-1 Verlust und der Tumorprogression. In normaler Haut und den isolierten humanen epidermalen Melanozyten zeigte sich keine Reduktion der Hvgl-1 Expression. Hingegen fand sich in 50 % der Melanome, in 71 % der Lymphknotenmetastasen und in 100 % der Fernmetastasen eine Reduktion bzw. ein Verlust der Hvgl-1 Expression.

Zusätzlich erfolgte eine *in vivo* Untersuchung von 15 humanen Gewebeproben, welche mit einer Anti-Hvgl-1-Antikörper Färbung immunhistochemisch behandelt und lichtmikroskopisch begutachtet wurden. Die Proben stammten von Patienten mit benignen melanozytären Nävi, Melanomen (Primärtumore) und Metastasen. Auch hier fand sich eine deutliche Reduktion der Hvgl-1 positiven Zellen beim Übergang vom normalen Hautnaevus zum metastasierenden Melanom.

Welche Auswirkungen der Verlust von Hvgl-1 auf die Funktionalität der Zellen hat, konnte anhand von transfizierten Melanomzelllinien mit stabiler Expression von Hvgl-1 gezeigt werden. Mit Hilfe von Migrationsassays wurde festgestellt, dass alle transfizierten Melanomzelllinien mit Hvgl-1 Expression im direkten Vergleich zur Wildtyp Melanomzelllinie eine stark verminderte Migrations- bzw. Invasionstendenz und erhöhte Zelladhäsion zeigten. Ein Einfluss auf die Zellproliferation konnte nicht belegt werden. Weiterhin ergaben die Analysen der transfizierten Melanomzelllinien, dass es neben der Expression von Hvgl-1 auch zu einer Expression von E-Cadherin und einer Downregulation von Metalloproteasen (MMP) insbesondere der des Typs MMP-9 und MMP-14 kommt. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Melanominvasion, da eine Downregulation von E-Cadherin und MMP-14 die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) unterstützt (100). Durch die EMT erlangt die Zelle mesenchymale Eigenschaften,

welche es ihr ermöglichen, die Basalmembran zu durchdringen und so zu metastasieren. O.g. Erkenntnisse geben Grund zur Annahme, dass die Expression von E-Cadherin und die Regulation einiger MMP's unter dem Einfluss von Hugel-1 stehen könnten (88). Dies könnte auch eine Erklärung für die aggressiven Metastasierungsprozesse beim Pankreaskarzinom sein, zumal wir in unserer Studie festgestellt haben, dass Metastasierungsprozesse mit einem Hugel-1 Verlust assoziiert waren.

### **4.2.3 Hugel-1 Expression beim Endometriumkarzinom**

Wissenschaftler der Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie der Universität von Tokio publizierten in Anlehnung an o.g. Ergebnisse im Juni 2007 eine Studie über den Zusammenhang des Verlust der Hugel-1 Expression und der Entwicklung von Lymphknotenmetastasen beim Endometriumkarzinom (89). Zur Untersuchung standen Gewebeproben und Patientendaten von 86 Patientinnen mit chirurgisch behandeltem Endometriumadenokarzinom (Hysterektomie) an. Die Analyse der Hugel-1 Expression erfolgte mit semiquantitativer RT-PCR.

Zusammengefasst stellte sich eine signifikante Korrelation des Hugel-1 Verlustes mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen dar ( $p=0.012$ ). 31.6 % der Hugel-1 negativen Tumore waren mit der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen assoziiert, wohingegen nur 7.5 % der Hugel-1 positiven Tumore Lymphknotenmetastasen zeigten. Weitere Parameter wie Patientenalter, Tumorstadium, Fernmetastasen und histopathologische Gradierung des Tumors blieben von dem Hugel-1 Verlust unbeeinflusst. Inwieweit sich der Verlust der Hugel-1 Expression auf das Outcome der Patientinnen auswirkte, zeigte eine anschließende Überlebensanalyse während einer 6-jährigen *Follow-up* Periode ( $p=0.012$ ). Tumore mit negativer Hugel-1 Expression waren mit einem statistisch schlechteren Überleben assoziiert. Somit konnte der Verlust der Hugel-1 Expression als prognostisch signifikanter Faktor beim Endometriumkarzinom identifiziert werden (89). Auch in unserer Studie konnte der Verlust der Hugel-1 Expression mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert werden.

#### 4.2.4 Hugi-1 Expression beim hepatozellulären Karzinom

Um etwaige Ursachen für eine gestörte Hugi-1 Funktion zu identifizieren, wurde 2009 am Institut für Biochemie und Zellbiologie, Shanghai, China, eine Studie bezüglich der molekularbiologischen Mechanismen, welche zu einem Verlust der Hugi-1 Funktion führen, durchgeführt (90). Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) geht wie das Pankreaskarzinom mit vergleichbar schlechter Prognose einher, wobei in der Studie allerdings keine Daten zum Überleben vorlagen.

Die Untersuchung fand an 80 Gewebeproben von hepatozellulären Karzinomen statt. Die Analyse der Proben zeigte, dass es während der RNA-Prozessierung beim Spleißvorgang zu Aberrationen kommt. Die Expression der Hugi-1 Proteine verläuft in der Folge fehlerhaft und ist mit einem Verlust der Tumorsuppressorfunktion verbunden.

Eine aberrante Hugi-1 Expression stand in signifikanter Korrelation mit der Tumorgröße ( $p=0.031$  bis  $<0.005$ ) und der histopathologischen Differenzierung ( $p=0.002$  bis  $<0.005$ ). Weiterhin zeigte sich bei 29.2 % (7 von 24) der Patienten mit mutierten Hugi-1 Proteinen eine Invasion ins Gefäßsystem. Prozentual lag dieses Ergebnis über dem der Patienten mit regelrechter Hugi-1 Expression (13.9 % / 5 von 36). Daraus wurde geschlossen, dass fehlerhaftes *Splicing* zur Tumorprogression des HCC beiträgt.

Von der Charakterisierung der fehlerhaften primären Hugi-1 RNA erhofften sich die Autoren Ansätze für ein neues therapeutisches Spektrum zur Behandlung des HCC. Unter Verwendung von *Antisense*-Nukleotiden könnte eine Blockade der fehlerhaften Hugi-1 RNA herbeigeführt werden und so die Tumorsuppressorfunktion erhalten werden.

#### 4.2.5 Hugi-1 Expression beim Ösophaguskarzinom

Song et al. (91) untersuchten in einer in vitro und in vivo Studie die positive Auswirkung der Hugi-1 Expression auf die Tumorsuppression beim Ösophaguskarzinom. Hierzu wurde ein Hugi-1 exprimierendes Plasmid konstruiert, welches man mittels Transfektion in humane ösophageale Krebszelllinien eingebracht hat, um so eine Überexpression von Hugi-1 zu erreichen. Die Überprüfung der Hugi-1 Expression erfolgte mittels RT-PCR Testung und Western Blot. In vitro Zellproliferation und Apoptose wurden separat mittels CCK-8 Assay, Western Blot und Durchflusszytometrie vor und nach Transfektion mit dem Plasmid untersucht. Die Beurteilung der Zellzyklusverteilung erfolgte mittels

Durchflusszytometrie. Die Effekte der Überexpression von Hugl-1 auf das Tumorstadium *in vivo* wurde im Mausmodell an Nacktmäusen untersucht, welche vorher ein ösophageales Tumorzelltransplantat (Xenograft Transplantat) erhalten haben. Die Expression von Hugl-1 im Xenograft Tumortransplantat wurde immunhistochemisch untersucht. Um apoptotische Zellen zu detektieren und zu quantifizieren, wurde die TUNEL Technik angewendet. Im Ergebnis konnte die Effektivität der Transfektion mittels RT-PCR Testung und Western Blot bestätigt werden. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe, dass die mRNA-Spiegel und die Protein Level von Hugl-1 in der pEZ-M29-Hugl1 behandelten Gruppe erheblich erhöht waren ( $p < 0.05$ ). Mit Hilfe eines CCK-8 Assay konnte gezeigt werden, dass das Zellwachstum bei Hugl-1 überexprimierenden Zellen signifikant niedriger war, als in der Kontrollgruppe. Auch ein Zellzyklusarrest am Übergang der  $G_0$ - zur  $G_1$ -Phase wurde bei Hugl-1 exprimierenden Zellen festgestellt ( $64.09 \% \pm 3.14 \%$  vs.  $50.32 \% \pm 4.60 \%$ ,  $64.09 \% \pm 3.14 \%$  vs.  $49.13 \% \pm 2.24 \%$ ).

Die Quantifizierung apoptotischer Zellaktivität bei Hugl-1 überexprimierenden Zellen erfolgte mit Hilfe der Annexin-V-Flourescein-Isothiocyanat Färbung und war im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant erhöht ( $17.33 \% \pm 4.76 \%$  vs.  $6.9 \% \pm 1.61 \%$ ,  $17.33 \% \pm 4.76 \%$  vs.  $6.27 \% \pm 0.38 \%$ ). Auch wurde herausgefunden, dass sich Hugl-1 auf den Gehalt von Proteinen auswirkt, welche an der Regulation des programmierten Zelltods (Apoptose) beteiligt sind. In diesem Fall ging es um die Proteine Bcl-2 (antiapoptotisch) und Bax (proapoptotisch), sowie um eine Aktivierung der Caspasen 3 und 9. Mit TUNEL-Assay konnte gezeigt werden, dass Hugl-1 die Apoptoserate von Eca109-Zellen *in vivo* deutlich erhöht ( $60.50 \% \pm 9.11 \%$  vs.  $25.00 \% \pm 12.25 \%$ ).

Schlussfolgernd deuten alle Ergebnisse darauf hin, dass Hugl-1 in einer humanen Zelllinie des Ösophaguskarzinom *in vitro* und *in vivo* das Tumorstadium hemmt und die Apoptose induziert (91).

#### 4.2.6 Hugl-1 Expression beim Lungenkarzinom

In einer Studie von Matzusaki et al. (92) konnte gezeigt werden, dass die Hugl-1 Expression auch beim Lungenkarzinom mit dem Tumorstadium und dem Überleben korreliert. Hierzu wurden Gewebeproben aus chirurgisch resezierten Lungenkarzinomen von 103 Patienten gewonnen, immunhistochemisch aufbereitet und analysiert. Der



Patientenpool bestand aus 97 Männern und 6 Frauen, welche sich im mittleren Lebensalter von 67.2 (+/- 9.1) Jahren befunden haben. Es wurden verschiedene Proteine, welche an der Steuerung der Zellpolarität beteiligt sind, untersucht. Neben aPKC, Par3, Par6 und Hugl-2 wurden auch die Effekte der Hugl-1 Expression auf die Zellpolarität untersucht.

Die Analyse und Gegenüberstellung aller Variablen ergab, dass die Hugl-1-Expression zu Variablen des Stadiums (pT, pN) und zum *Grading* unabhängig war ( $p > 0,05$  im Pearson  $\chi^2$ -Test), aber statistisch signifikant mit dem Überleben der Patienten verknüpft ist: Eine reduzierte Hugl-1 Expression bedeutete in diesem Fall eine schlechtere Prognose für die Patienten, die an einem Lungenkarzinom erkrankt waren ( $p = 0,0223$ ) (92).

#### 4.2.7 Hugl-1 Expression beim Pankreaskarzinom

Beginnend haben wir festgestellt, dass in gesundem Pankreasgewebe Hugl-1 regelmäßig exprimiert wird. Die Expression findet hier vorwiegend in den Gangepithelien, peripankreatischen Ganglienzellen und Inselzellen statt und lässt sich immunhistochemisch darstellen und lichtmikroskopisch analysieren. Auch in entzündlich verändertem Gewebe, wie es bei der chronischen Pankreatitis der Fall ist, ist die Hugl-1 Expression nicht verändert. Die Hugl-1 Expression in gesundem Pankreasgewebe kann somit als spezifisch und reproduzierbar bezeichnet werden.

In unserer Studie konnten wir anhand von 97 Patientenfällen mit chirurgisch behandeltem Adenokarzinom des Pankreas zeigen, dass die Hugl-1 Expression auch dort eine wichtige Rolle spielt. Hierzu analysierten wir die immunhistochemischen Expressionsprofile von Hugl-1 der Tumorproben und korrelierten sie mit den klinischen Daten und dem Überleben der Patienten. Das *Follow-up* betrug bis zu 92 Monate.

Es konnte beobachtet werden, dass Patienten, deren Hugl-1 Expression im Tumorgewebe erhalten geblieben war, eine signifikant höhere Überlebenschance aufwiesen als Patienten, bei denen die Hugl-1 Expression rückläufig oder gar verlorengegangen war (siehe Abbildung 15). Dabei wurde der positive Einfluss von Hugl-1 erst nach dem ersten postoperativen Jahr offensichtlich. Die prognostische Bedeutung der Hugl-1 Expression

konnte weiterhin an einem multivariaten Cox-Regressionsmodell demonstriert werden. Hier erreichte sie als einzige Variable die Eingangsgrenzen des Cox-Regressionsmodells und machte so den prognostischen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten deutlich.

Interessanterweise konnte ein Verlust oder ein Erhalt der Hugel-1 Expression nicht mit der Differenzierung der Tumore und dem *Staging* korreliert werden. So hatten manche Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren und fortgeschrittenen Tumorstadien bei erhaltener Hugel-1 Expression ein deutlich besseres *Outcome*, als Patienten bei denen es umgekehrt der Fall war. Außerdem waren diese Parameter auch ohne sichere prognostische Relevanz, abgesehen von einem schwachen signifikanten Ergebnis im Vergleich zwischen M0 und M1. Insgesamt sind klinisch-morphologische Grundparameter beim Pankreaskarzinom lange nicht so „verlässliche“ Prognosefaktoren wie bei anderen Tumorentitäten. Das zeigen auch Ergebnisse deutlich größerer Studien als der hier vorgelegten, beispielsweise an einem 2022 vorgestellten großen, nach aktuellen Standards operativ behandeltem Kollektiv aus dem hiesigen Universitätsklinikum (101). An 236 Fällen von resezierten Pankreaskarzinomen waren, abgesehen vom Alter der Patienten, nur für wenige Einzelaspekte statistisch signifikante Überlebensunterschiede zu erheben. Es wurden neun klinikopathologische Parameter (Geschlecht, TNM-Parameter T, N, M, L, V, R und Pn, *UICC*-Stadium sowie *Grading*) auf fünf Subgruppen des Patientenkollektivs bezogen (Untergruppen R0, R0/M0, M0, Tumor im Pankreaskopf, Tumor im Pankreasschwanz); von den 41 Überlebensanalysen führten überhaupt nur vier zu einem statistisch signifikanten Ergebnis, davon lediglich eine auf einem p-Niveau von  $p < 0,04$ , nämlich der Vergleich M0 vs. M1 für 217 Tumoren des Pankreaskopfes, ( $p = 0.001$ ).

#### **4.3 Einordnung eigener Ergebnisse in den prognostischen Gesamtzusammenhang des Pankreaskarzinoms**

Die bekanntermaßen sehr schlechte Prognose der meisten, aber nicht aller Patienten mit einem Pankreaskarzinom hat schon viele Arbeitsgruppen mit der Frage beschäftigt, ob sich durch die Etablierung von Biomarkern bestimmte Subgruppen herausarbeiten ließen, bei denen aufgrund besserer prognostischer Voraussetzungen auch ambitioniertere

Therapien sinnvoll sein könnten. Biomarker können dabei sowohl serologische, also im Blut erhobene Variable sein, als auch immunhistochemisch oder molekular (z.B. per FISH- oder per PCR-basierten Verfahren) erhobene Größen am Tumorgewebe oder an der Tumorumgebung (z.B. peritumorale Immunabwehr). Für einen Review von McGuigan und Mitarbeitern aus dem Jahr 2021, der in Kapitel 4.3.2 thematisch eingebunden ist, wurden 1101 Arbeiten über Biomarker an Pankreaskarzinomen erfasst, in denen mehr als 700 verschiedene Biomarker eingesetzt worden seien (102). Im Folgenden sollen hierzu einige wesentliche Aspekte zu ihrer Anwendung angesprochen werden.

### **4.3.1 Prognostische Bedeutung immunhistochemischer Biomarker an den Tumorzellen**

Die größte Vielzahl an Biomarkern betrifft immunhistochemische Anwendungen, wobei aber nicht auf diagnostische Bemühungen, aktuell zusammengestellt von Luu in einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2021 (103), eingegangen werden soll, sondern nur auf einzelne prognostische Ansätze. Dabei muss vorausgeschickt werden, dass sich keiner von ihnen in der Routinediagnostik durchgesetzt hat.

In einem sehr informativen und übersichtlich verfassten Review aus dem Jahr 2011 (69) werden elf Marker genannt, die in zwei oder mehr Studien einen unabhängigen prognostischen Einfluss auf das Überleben gezeigt haben, nämlich Ki-67, p27, p53, TGF  $\beta$ 1, bcl-2, Survivin, VEGF, COX-2, CD34, S100 A4 und hENT 1. Trotz der positiven Effekte in Studien schließen die Autoren aber aus der Gesamtgemengelage, dass keiner von ihnen für den Routinebetrieb empfohlen werden könne, weil die Ergebnisse inkonsistent seien; ihre eigene Empfehlung, in prospektiven Multicenterstudien weiter an der Eignung der Marker zu forschen, scheinen sie bis heute nicht umgesetzt zu haben.

Ein weiterer Review, ebenfalls aus dem Jahr 2011 (104), befasst sich teils überschneidend mit p53, p16, smad4, bcl-2, bax, VEGF und EGFR. Auch in dieser Arbeit wurde auf Inkonsistenzen der Ergebnisse hingewiesen, aber letztendlich geschlossen, dass VEGF ein geeigneter Prognosefaktor für das Pankreaskarzinom sei. Durchgesetzt hat sich VEGF allerdings nicht. Aktuelle telefonische Rückfragen in großen Instituten (RWTH Aachen, Pathologie Koblenz, Universitätsmedizin Mainz, Universitätsklinikum Köln) ergaben

erwartungsgemäß, dass keiner der genannten Marker in der Routine beim Pankreaskarzinom zu prognostischen Zwecken eingesetzt wird und manche Marker hier und da gar nicht vorgehalten werden.

Seitdem sind keine weiteren Reviews in Pubmed zu immunhistochemischen Prognosefaktoren von Pankreaskarzinomen nachweisbar. Allerdings gibt es eine Vielzahl von Einzelstudien, die durchaus ähnlich wie unsere eigene Studie gute Ergebnisse erbringen, so auch für Vimentin (70) und Her2/neu (71), zwei Marker, die zur „Grundausrüstung“ jedes immunhistochemischen Labors gehören. In der Routine eingesetzt werden aber auch diese beiden Marker offenbar nicht. Nur für die Jahre 2021-2023 werden für die Phrase [("*survival*" or "*prognos\**" or "*outcome*") and "*pancreatic cancer*" and "*immunohistochem\**"] 328 Publikationen aufgelistet (Stand 15.11.2022).

Letzten Endes ist zu konstatieren, dass bislang kein einziger immunhistochemischer Marker, der an den Tumorzellen bindet, in die aktuelle S3-Leitlinie (4) aufgenommen wurde. Trotz aller Auftrennung von Patienten in Studien liegt offenbar bei keinem von ihnen eine allgemeine Akzeptanz vor.

### **4.3.2 Prognostische Bedeutung der immunhistochemisch analysierten peritumoralen Immunabwehr**

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse zu einer eventuellen prognostischen Bedeutung der peritumoralen Immunantwort wurden im Jahr 2021 in einer systematischen Meta-Analyse aus der Universität Belfast zusammengestellt (102): Insgesamt wurden 26 immunhistochemische Arbeiten ermittelt, die von ihrer Qualität her Aufnahme in die Meta-Analyse finden konnten; in 18 von ihnen wurden nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Aussagen getroffen. Die Arbeiten befassten sich mit dem Stellenwert der Markerexpression von CD3 (T-Zell-Marker) sowie von CD4, CD8, und FoxP3 (Marker verschiedener Subtypen von T-Zellen), von CD20 (B-Zell-Marker), von CD68 und CD163 (Makrophagenmarker) sowie von PD-1 und PD-L1, die jeweils in mindestens drei geeigneten Studien Anwendung gefunden hatten. In ein bis zwei Studien war mit den Makrophagenmarkern CD204, CD206 und FR $\beta$  (Folatrezeptor  $\beta$ ) gearbeitet worden, in jeweils einer Studie mit dem Mastzellmarker CD117 sowie den Neutrophilenmarkern Chloracetatesterase bzw. CD15. Fasst man die Ergebnisse zusammen, so verfügten

Patienten mit einem hohen Gehalt an CD4-positiven T-Lymphozyten bzw. an CD8-positiven T-Lymphozyten am Tumor über ein längeres rezidivfreies Überleben. Ein hoher Gehalt an CD163-positiven Makrophagen war mit einem kürzeren allgemeinen Überleben assoziiert. Alle übrigen Parameter, darunter auch die bei vielen Tumorentitäten etablierte und immer wieder nachgefragte PD-L1-Expression, zeigten gemäß den Ergebnissen der Meta-Analyse keinen statistisch signifikanten, prognostisch nutzbaren Einfluss, unabhängig vom Auswertemodus (TPS, CPS oder IC-Score).

### 4.3.3 Prognostische Bedeutung molekularpathologischer Ansätze

Das sich rasch weiterentwickelnde Feld molekularpathologischer Erkenntnisse kann im Rahmen dieser Arbeit nicht systematisch abgehandelt werden. Vielmehr kann auch hier nur auf dasjenige eingegangen werden, was bereits über das Niveau einzelner wissenschaftlicher Studien hinausgeht und sich in den Leitlinien abbildet.

Legt man die deutsche „S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom“ (4), die derzeit in der Version 2.0 von November 2021 vorliegt, zugrunde, so werden molekulare Mechanismen (von einer Erwähnung in der Diagnostik zystischer Läsionen abgesehen) lediglich in Kapitel 8 („Palliative Therapie des Pankreaskarzinoms“) erwähnt, spielen also für die „Diagnostik“ (Kapitel 5), die „Chirurgische Therapie“ (Kapitel 6) und die „Adjuvante und neoadjuvante nichtchirurgische Therapie“ (Kapitel 7) keine Rolle. In Kapitel 8 werden zunächst die Monochemotherapie mit Gemcitabin und danach Kombinationschemotherapien auf der Basis von 5-FU bzw. Gemcitabin abgehandelt. Danach erfolgt im Kapitel 8.5 („Molekularbiologisch gezielte Therapien“) die Besprechung molekularer Mechanismen, die bei der Therapiefindung in der Palliativsituation eine Rolle spielen.

Dabei wird in diesem Kapitel zunächst auf die Möglichkeit eingegangen, statt einer Gemcitabin-Monotherapie eine Kombination aus Gemcitabin und dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib zu geben - für diese Therapie sind allerdings keine molekularpathologischen Testungen mehr Voraussetzung. Andere Kombinationen mit speziellen Targets wie Bevacizumab, Cetuximab, Axitinib oder anderen werden unter Verweis auf zwei Meta-Analysen (105, 106) nicht empfohlen, weil sie keinen Benefit für das Überleben der Patienten bedeuten.

Danach wird in Kapitel 8.6 („Therapie in molekularen Subgruppen“) auf spezielle Konstellationen in der Palliativsituation eingegangen (4): Zum einen soll bei Patienten mit einer Keimbahnmutation für BRCA-1 und / oder BRCA-2 bzw. für PALB2, wovon allerdings nur 4-7 % der Patienten mit Pankreaskarzinomen betroffen sind (107), im Erstlinienansatz eine Platin-basierte Chemotherapie und eine Erhaltungstherapie mit einem PARP-Inhibitor angestrebt werden. Zum anderen sind Immuntherapeutika insbesondere wirksam bei Tumoren, in denen eine Mismatch-Reparatur-Defizienz (dMMR) bzw. eine Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) nachgewiesen ist, was allerdings in nur ca. 1 % der Pankreaskarzinome der Fall ist (108, 109). Der Nachweis dieser Veränderung ist aktuell Voraussetzung für die Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren.

Insgesamt sind somit zwei grundlegende molekulare Mechanismen zum heutigen Stand Teil der Therapieplanung und somit auch, wenn man positive therapeutische Effekte einrechnet, Teil der Prognostik. Wenn allerdings nur 4-7 % bzw. ca. 1 % der palliativ zu behandelnden Patienten die Konstellation aufweisen, die sie von der günstigeren therapeutischen Variante profitieren lassen könnte, ist letztendlich der Benefit der Erkenntnisse wohl bezogen auf den Einzelfall zu würdigen, stellt aber keinen sehr großen Fortschritt für die Masse der Erkrankten dar. Gleichwohl kann man die Verankerung dieser Untersuchungen in der S3-Leitlinie als gewissen Meilenstein in der molekularen Medizin des Pankreaskarzinoms sehen.

#### **4.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

In der hier vorliegenden Studie wurde die Gelegenheit wahrgenommen, den an der Universitätsmedizin Mainz entwickelten Antikörper Hugl-1 in einem Kooperationsprojekt mit der dortigen Chirurgischen Klinik, der I. Medizinischen Klinik, die die Gastroenterologie und Hepatologie vertritt, und dem SFB 432 auf das Überleben von Patienten mit resezierten Pankreaskarzinomen zu beziehen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Antikörper prinzipiell geeignet ist, aus der großen Zahl von Patienten, die am Pankreaskarzinom schnell versterben, eine Gruppe herauszuarbeiten, die über ein deutlich besseres Überleben verfügt. Dabei fiel auf, dass in den ersten etwa zwölf Monaten kein prognostischer Effekt zu erkennen war - in diesem Zeitraum dürften dann zum einen Frührezidive zum Tragen kommen, die bekanntermaßen trotz formaler R0-

Resektion bei dieser Tumorentität häufig sind. Außerdem zeigt sich darin aber wohl auch, dass die Patienten etwa über diesen Zeitraum mit der umfangreichen Operation und der Rekonvaleszenz „kämpfen“ und dass erst dann, wenn sie diese Phase überlebt haben, prognostische Einflüsse wirksam werden, die von der peri- und postoperativen Situation unabhängig sind. Auch in anderen Arbeiten kann man ähnliche Überlebenskurven für das erste Jahr nach der Operation nachvollziehen (88-92).

Entsprechend wäre zu postulieren, dass insbesondere eine therapeutisch beeinflussbare Vermeidung von Frührezidiven, vorzugsweise kombiniert mit einer Optimierung der peri- und postoperativen Rekonvaleszenz, wesentlich zur Verbesserung der Gesamtprognose beitragen würde. Ansonsten kann man nur hoffen, dass in der Zukunft mehr therapeutisch angehbare tumorbiologische Zusammenhänge aufgedeckt werden. Denn letzten Endes werden den individuellen Patienten nur Erkenntnisse weiterhelfen, die sich in eine konkrete adjuvante Therapie umsetzen lassen. Hier scheinen die Möglichkeiten der Immunhistochemie, therapeutische Abzweige zu weisen, begrenzt, gerade wenn man bedenkt, dass ihre entsprechenden aktuellen onkologischen Domänen wie die Bestimmung von Hormonrezeptor-Expression, HER2/neu oder PD-L1 beim Pankreaskarzinom nicht therapeutisch oder prognostisch weiterhelfen. Hingegen liegt hier sicher die Bedeutung der Molekularpathologie, die sich immer schneller weiterentwickelt und von der man am ehesten erwarten kann, dass sie in der Zukunft therapeutische Ansätze bei diesem prognostisch so schlechten Tumorleiden ermöglicht. Auch Arbeitsgruppen am Universitätsklinikum Düsseldorf, an dem ja ein wissenschaftlicher Schwerpunkt zum Pankreas etabliert werden konnte, werden sicher daran ihren Anteil haben: Eine aktuell 2022 vorgelegte Arbeit aus einem Kooperationsprojekt des UKD von Chirurgie, Gastroenterologie und nicht zuletzt Pathologie mit dem selbsterklärenden Titel „*Genetic alterations predict long-term survival in ductal adenocarcinoma of the pancreatic head*“ (110) zeigt, dass dort auf diesem Themengebiet ambitioniert Forschung betrieben wird, um irgendwann die Perspektive einer erfolgreichen, womöglich wirklich kurativen *targeted therapy* auch beim Pankreaskarzinom verwirklichen zu können.

#### IV. Literaturverzeichnis

- (1) Robert-Koch-Institut (RKI) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) (2012): Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe; S. 60-63
- (2) Tumorzentrum München (TZM) (2020): Manual Gastrointestinale Tumoren. 10. Auflage; S. 189-240
- (3) World Cancer Research Fund International (2020): *Cancer trends. Pancreatic cancer statistics*. Online unter <https://www.wcrf.org/cancer-trends/pancreatic-cancer-statistics> , abgerufen am 13.02.2023
- (4) Seufferlein T, Mayerle J, Böck S, Brunner T, Ettrich TJ, Grenacher L, Gress TM, Hackert T, Heinemann V, Kestler A, Sinn M, Tannapfel A, Wedding U, Uhl W (2022): S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom. *Z Gastroenterol*, 60: 812-909
- (5) Hart AR, Kennedy H, Harvey I (2008): *Pancreatic cancer: a review of the evidence of causation*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 6(3): 275-282
- (6) Rivenson A, Hoffmann D, Prokopczyk B, Amin S, Hecht SS (1988): *Induction of lung and exocrine pancreas tumour in F344 rats by tobacco-specific and Aroca-derived N-nitrosamines*. *Cancer Res*, 48: 6912-6917
- (7) Momi N, Kaur S, Ponnusamy MP, Kumar S, Wittel UA, Batra SK (2012): *Interplay between smoking-induced genotoxicity and altered signaling in pancreatic carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 33(9): 1617-1628
- (8) Klein AP, Brune KA, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, Griffin C, Cameron JL, Yeo CJ, Kern S, Hruban RH (2004): *Prospective risk of pancreatic cancer in familial cancer kindreds*. *Cancer Res*, 64: 2634-2638



- 
- (9) Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Amman RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimango EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L (1993): *Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group.* N Engl J Med, 328(20): 1433-1437
- (10) Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Lévy P, Ruszniewski P (2002): *Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis.* Gut, 51(6): 849-852
- (11) Talamini G, Falconi M, Bassi C, Sartori N, Salvia R, Caldiron E, Frulloni L, DiFrancesco V, Vaona B, Bovo P, Vantini I, Pederzoli P, Cavallini G (1999): *Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis.* Am J Gastroenterol, 94(5): 1253-1260
- (12) Howes N, Lerch MM, Greenhalf W, Stocken DD, Ellis I, Simon P, Truninger K, Ammann R, Cavallini G, Charnley RM, Uomo G, Delhaye M, Spicak J, Drumm B, Jansen J, Mountford R, Whitcomb DC, Neoptolemos JP; European Registry of Hereditary Pancreatitis and Pancreatic Cancer (EUROPAC) (2004): *Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2(3): 252-261
- (13) Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK Jr, Perrault J, Whitcomb DC (1997): *Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group.* I Natl Cancer Inst, 89(6): 442-446
- (14) Rebours V, Boutron-Ruault MC, Schnee M, Ferec C, Maire F, Hammel P, Ruszniewski P, Levy P (2008): *Risk of pancreatic adenocarcinoma in patients with hereditary pancreatitis: a national exhaustive series.* Am J Gastroenterol, 103(1): 111-119
- (15) Everhart J, Wright D (1995): *Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis.* JAMA, 273: 1605-1609

- 
- (16) Stevens RJ, Roddam AW, Beral V (2007): *Pancreatic cancer in type I and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis*. Br J of Cancer, 96: 507-509
- (17) Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M (2005): *Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta analysis of 36 studies*. Br J Cancer, 92: 2076-2083
- (18) Shi C, Hruban RH, Klein AP (2009): *Familial pancreatic cancer*. Arch Pathol Lab Med, 133(3):365-374
- (19) Lynch HT, Smyrk T, Hruban RH, Lightdale CJ, Lemon SJ, Lynch JF, Fusaro LR, Fusaro RM, Ghadirian P (1996): *Familial pancreatic cancer: a review*. Semin Oncol, 23(2): 251-275
- (20) Michaud DS (2004): *Epidemiology of pancreatic cancer*. Minerva Chir, 59(2): 99-111
- (21) Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, Offerhaus JA (2000): *Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome*. Gastroenterology, 119(6):1447-1453
- (22) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988): *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Eng J Med, 319: 525-532
- (23) Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM (2022): *Pancreatic cancer: pathogenesis, screening, diagnosis and treatment*. Gastroenterology, 163: 386-402
- (24) Goral V (2015): *Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis*. Asian Pac J Cancer Prev, 16(14): 5619-5624
- (25) Hruban R, Goggins M, Parsons J, Kern S (2000): *Progression Model for Pancreatic Cancer*. Clin Cancer Res, 6(8): 2969-2972

- 
- (26) Lüttges J, Klöppel G (2000): *Precancerous conditions of pancreatic carcinoma*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 7(6): 568-574
- (27) Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossmann KL, Clark GJ, Der CJ (1998): *Increasing complexity of Ras signaling*. Oncogene 17: 1395-1413
- (28) Malumbres M, Barbacid M (2003): *RAS Oncogenes: the first 30 years*. Nat Rev Cancer, 3: 459-465
- (29) Klimstra DS, Longnecker DS (1994): *K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions*. Am J Pathol, 145: 1547-1550
- (30) Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1997): *Tumor suppressive Pathways in pancreatic carcinoma*. Cancer Res, 57: 1731-1734
- (31) Day JD, DiGiuseppe JA, Yeo CJ, Loi Goldman M, Anderson S, Kern SE, Hruban RH (1996): *Immunohistochemical evaluation of Her-2/neu oncogene expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms*. Hum Pathol, 27: 119-124
- (32) Hu YX, Watanabe H, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Ha A, Okai T, Sawabu N (1997): *Frequent loss of p16 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma*. Clin Cancer Res, 3: 1473-1477
- (33) Yomano M, Fujii H, Takagaki T, Kadowaki N, Watanabe T, Shirai T (2000): *Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma*. Am J Pathol 156(6): 2123-2133
- (34) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991): *p53 mutations in human cancers*. Science 253: 49-53

- 
- (35) Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH (2000): *Loss of expression of DPC4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: Evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression*. Cancer Res, 60: 2002-2006
- (36) McCarthy DM, Brat DJ, Wilentz RE, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH (2001): *Pancreatic intraepithelial neoplasia and infiltrating adenocarcinoma: analysis of progression and recurrence by DPC4 immunohistochemical labeling*. Hum Pathol, 32(6): 638-642
- (37) Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL, Bova GS, Isaacs WB, Cairns P, Nawroz H, Sidransky D, Casero RA Jr, Meltzer PS, Hahn SA, Kern SE (1996): *DPC gene in various tumor types*. Cancer Res 56: 2527-2530
- (38) Müller M (2010): *Chirurgie für Studium und Praxis*, 16. Auflage, Medizinische Verlags- und Informationsdienste Breisach
- (39) Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM (1994): *Diabetes and the risk of pancreatic cancer*. New Engl J Med, 331: 81-84
- (40) Gandolfi L, Torresan F, Solmi L, Puccetti A (2003): *The role of ultrasound in biliary and pancreatic diseases*. Eur J Ultrasound, 16(3):141-159
- (41) Böttger TC, Boddin J, Düber C, Heintz A, Küchle R, Junginger T (1998): *Diagnosing and staging of pancreatic carcinoma – what is necessary?* Oncology, 55(2): 122-129
- (42) Karlson BM, Ekblom A, Lindgren PG, Källskog V, Rastad J; (1999): *Abdominal US for diagnosis of pancreatic tumor: prospective cohort analysis*. Radiology, 213: 107-111
- (43) Adamek HE, Albert J, Breer H, Weitz M, Schilling D, Rieman JF (2000): *Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography*

- and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study.* Lancet, 356(9225): 190-193
- (44) Tanaka M, Chari S, Adsay V, Fernandez del Castillo C, Falconi M, Shimizu M, Yamaguchi K, Yamao K, Matsuno S (2006): *International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas.* Pancreatology, 6: 17-32
- (45) Nazli O, Bozdag AD, Tansung T, Kir R, Kaymak E; (2000): *The diagnostic importance of CEA and CA 19-9 for the early diagnosis of pancreatic carcinoma.* Hepatogastroenterology, 47:1750-1752
- (46) David O, Green L, Reddy V, Kluskens L, Bitterman P, Attal H, Prinz R, Gattuso P (1998): *Pancreatic masses: a multi institutional study of 364 fine-needle aspiration biopsies with histopathologic correlation.* Diagn Cytopathol, 19: 423-427
- (47) Agarwal B, Abu-Hamda E, Molke KL, Correa AM, Ho L (2004): *Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration and multidetector spiral CT in the diagnosis of pancreatic cancer.* Am J Gastroenterol 99: 844-850
- (48) Feußner H, Härtl F (2006): *Staginglaparoskopie in der Onkologie.* Der Chirurg, 77: 971-980
- (49) Hartwig W, Gluth A, Hinz U, Koliogiannis D, Strobel O, Hackert T, Werner J, Büchler MW (2016): *Outcomes after extended pancreatectomy in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer.* Brit J Surg, 103: 1683-1694
- (50) Neuhaus P, Wittekind CH, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (2007): *Klassifikation maligner Tumoren des Gastrointestinaltrakts II, S. 235-237*

- 
- (51) Gill AJ, Klimstra DS, Lam AK, Washington MK (Hrsg.) (2019): *Tumours of the pancreas*. In: WHO classification of tumours of the digestive system, International Agency for Research on Cancer, Lyon; 5. Auflage; S. 295-375
- (52) Klimstra DS, Klöppel G, Couvelard A, Hruban RH, Komminoth P, La Rosa S, Osamura RY, Perren A, Rindi G (2017): *Non-functioning (non-syndromic) neuroendocrine tumours*. In: WHO classification of tumours of endocrine organs, International Agency for Research on Cancer, Lyon; 4. Auflage; S. 215-221
- (53) Reissfelder C, Koch M, Buchler MW, Weitz J (2007): Pankreaskarzinom. *Chirurg* 78(11): 1059-1071
- (54) Werner J, Combs SE, Springfield C, Hartwig W, Hackert T, Büchler MW (2013): *Advanced-stage pancreatic cancer: therapy options*. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10: 323-333
- (55) Wittekind C (Hrsg.) (2017): *TNM Klassifikation maligner Tumoren*, 8. Auflage, Wiley Verlag, Hoboken
- (56) Gebhardt CH, Meyer W, Reichel M, Wünsch PH (2000): *Prognostic factors in the operative treatment of ductal pancreatic carcinoma*. *Langenbeck's Arch Surg*, 385: 14-22
- (57) Strimpakos AS, Syrigos KN, Saif MW (2011): *Updates on first-line treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma*. *J Pancreas*, 12(4): 339-342
- (58) Cameron JL, Riall TS, Coleman J, Belcher KA (2006): *One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies*. *Ann Surg* 244: 10-15
- (59) Fatima J, Schnelldorfer T, Barton J, Wood CM, Wiste HJ, Smyrk TC, Zhang L, Sarr MG, Nagorney DM, Farnell MB (2010): *Pancreatoduodenectomy for ductal adenocarcinoma: implications of positive margin on survival*. *Arch Surg*, 145: 167-172

- (60) Shimada K, Sakamoto Y, Sano T, Kosuge T (2006): *Prognostic factors after distal pancreatectomy with extended lymphadenectomy for invasive pancreatic adenocarcinoma of the body and tail*. Surgery, 139: 288-295
- (61) Raut CP, Tseng JF, Sun CC, Wang H, Wolff RA, Crane CH, Hwang R, Vauthey JN, Abdalla EK, Lee Je, Pisters PW, Evans DB (2007): *Impact of resection status on pattern of failure and survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma*. Ann Surg, 246: 52-60
- (62) Howard TJ, Krug JE, Yu J, Zyromski NJ, Schmidt CM, Jacobsen LE, Madura JA, Wiebke EA, Lillemoe KD (2006): *A margin-negative R0 resection accomplished with minimal postoperative complications is the surgeon's contribution to longterm survival in pancreatic cancer*. J Gastrointest Surg, 10: 1338-1345
- (63) Kato K, Yamada S, Sugimoto H, Kanazumi N, Nomoto S, Takeda S, Kodera Y, Morita S, Nakao A (2009): *Prognostic factors for survival after extended pancreatectomy for pancreatic head cancer: influence of resection margin status on survival*. Pancreas, 38: 605-612
- (64) Ormanns S, Esposito I, Siveke J, Kirchner T, Neumann J (2014): *Pathologie und Molekularpathologie des Pankreaskarzinoms*. Trillium Krebsmedizin, 23(3): 110-115
- (65) Tao L, Zhang L, Xiu D, Yuan C, Ma Z, Jiang B (2016): *Prognostic significance of K-ras mutations in pancreatic cancer: a meta-analysis*. World J Surg Oncol, 14: 146
- (66) Sinn BV, Strieler JK, Rudl MA, Lehmann A, Bahra M, Denkert C, Sinn M, Stieler J, Klauschen F, Budczies J, Weichert W, Stenzinger A, Kamphues C, Dietel M, Riess H (2014): *KRAS mutations in codon 12 or 13 are associated with worse prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Pancreas, 43: 578-583
- (67) Oshima M, Okano K, Muraki S, Haba R, Maeba T, Suzuki Y, Yachida S (2013): *Immunohistochemically detected expression of 3 major genes (CDKN2A/p16,*

- TP53 and SMAD4/DPC4) strongly predicts survival in patients with resectable pancreatic cancer. Ann Surg, 258: 336-346*
- (68) Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, Adsay V, Abrams RA, Cameron JL, Kern SE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M (2001): *The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin Cancer Res, 7: 4115-4121*
- (69) Ansari D, Rosendahl A, Elebro J, Andersson R (2011): *Systematic review of immunohistochemical biomarkers to identify prognostic subgroups of patients with pancreatic cancer. Brit J Surg, 98: 1041-1055*
- (70) Handra-Luca A, Hong SM, Walter C, Hruban R, Goggins M (2011): *Tumour epithelial vimentin expression and outcome of pancreatic ductal adenocarcinomas. Br J Cancer, 104(8): 1296-1302*
- (71) Komoto M, Nakata B, Amano R, Yamada N, Yashiro M, Ohira M, Wakasa K, Hirakawa K (2009): *Her2 overexpression correlates with survival after curative resection of pancreatic cancer. Cancer Sci, 100(7): 1243-1247*
- (72) Han S, Ryu KH, Kwon A (2021): *The prognostic impact of Her2 genetic and protein expression in pancreatic carcinoma – Her2 protein and gene in pancreatic cancer. Diagnostics, 11(4): 653*
- (73) Hiraoka N, Ino Y, Sekine S, Tsuda H, Shimada K, Kosuge T, Zavada J, Yoshida M, Yamada K, Koyama T, Kanai Y (2010): *Tumour necrosis is a postoperative prognostic marker for pancreatic cancer patients with a high interobserver reproducibility in histological evaluation. Brit J Cancer, 103: 1057-1065*
- (74) Richards NG, Rittenhouse DW, Freydin B, Cozzitorto JA, Grenda D, Rui H, Gonye G, Kennedy EP, Yeo CJ, Brody JR, Witkiewicz AK (2010): *HuR status is a powerful marker for prognosis and response to Gemcitabine-based chemotherapy for resected pancreatic ductal adenocarcinoma patients. Ann Surg, 252: 499-450*



- 
- (75) Bridges CB, Brehme KS (1944): *The mutants of Drosophila melanogaster*. Carnegie Institute of Washington, Washington DC.
- (76) Gateff E (1978): *The genetics and epigenetics of neoplasm in Drosophila*. Biol Rev Camb Philos Soc 53(1): 123-168
- (77) Bilder D, Li M, Perrimon N (2000): *Cooperative regulation of cell polarity and growth by Drosophila tumor suppressors*. Science, 289: 113-116
- (78) Humbert PO, Grzeschik NA, Brumby AM, Galea R, Ellum I, Richardson HE (2008): *Control of tumorigenesis by the Scribble/Dgl/Lgl polarity module*. Oncogene, 27(55): 6888-6907
- (79) Agrawal N, Kango M, Mishra A, Sinha P (1995): *Neoplastic transformation and aberrant cell-cell interactions in genetic mosaics of lethal(2)giant larvae (lgl), a tumor suppressor gene of Drosophila*. Dev Biol, 172(1): 218-229
- (80) Woodhouse EE, Hersperger E, Shearn A (1998): *Growth, metastasis and invasiveness of Drosophila tumors caused by mutations in specific tumor suppressor genes*. Dev Genes Evol, 207(8): 542-550
- (81) Opper M, Schuler G, Mechler BM (1987): *Hereditary suppression of lethal(2)giant larvae malignant tumor development in Drosophila by gene transfer*. Oncogene, 1(2): 91-96
- (82) Strand D, Unger S, Corvi R, Hartenstein K, Schenkel H, Kalmes A, Merdes G, Neumann B, Krieg-Schneider F, Coy JF, Poustka A, Schwab M, Mechler BM (1995): *A human homologue of the Drosophila tumor suppressor gene l(2)gl maps to 17p11.2-12 and codes for a cytoskeletal protein that associates with nonmuscle myosin II heavy chain*. Oncogene, 11(2): 291-301
- (83) Scheurlen WG, Seranski P, Mincheva A, Kühl J, Sörensen N, Krauss J, Lichter P, Poustka A, Wilgenbus KK (1997): *High resolution deletion mapping of chromosome arm 17p in childhood primitive neuroectodermal tumours reveals a*

- common chromosomal disruption within the Smith-Magins region, an unstable region in chromosome band 17p11.2. Genes Chromos Cancer, 18: 50-58*
- (84) Grifoni D, Garoia F, Schimanski CC, Schmitz G, Laurenti E, Galle PR, Pession A, Cavicchi S, Strand D (2004): *The human protein Hugl-1 substitutes for Drosophila lethal giant larvae tumor suppressor function in vivo. Oncogene, 23: 8688-8694*
- (85) Frolidi F, Ziosi M, Tomba G, Parisi F, Garoia F, Pession A, Grifoni D (2008): *Drosophila lethal giant larvae neoplastic mutant as a genetic tool for cancer modeling. Curr Genom 9: 147-154*
- (86) Schimanski CC, Schmitz G, Kashyap A, Bosserhof AK, Bataille F, Schäfer SC, Lehr HA, Berger MA, Galle PR, Strand S, Strand D (2005): *Reduced expression of Hugl-1, the human homologue of Drosophila tumour suppressor gene lgl, contributes to progression of colorectal cancer. Oncogene, 24: 3100-3109*
- (87) Zimmermann T, Kashyap A, Hartmann U, Otto G, Galle PR, Strand S, Strand D (2008): *Cloning and characterization of the promotor of Hugl-2, the human homologue of Drosophila lethal giant larvae, (lgl) polarity gene. Biochem Biophys. Res Commun, 366: 1067-1073*
- (88) Kuphal S, Wallner S, Schimanski CC, Bataille F, Hofer P, Strand S, Strand D, Bosserhoff AK (2006): *Expression of Hugl-1 is strongly reduced in malignant melanoma. Oncogene, 25: 103-110*
- (89) Tsuruga T, Nakagawa S, Watanabe M, Takizawa S, Matsumoto Y, Nagasake K, Sone K, Hiraike H, Miyamoto Y, Hiraike O, Minaguchi T, Oda K, Yasugi T, Yano T, Taketani Y (2007): *Loss of Hugl-1 expression associates with lymph node metastasis in endometrial cancer. Oncol Res, 16: 431-435*
- (90) Lu X, Feng X, Man X, Yang G, Tang L, Du D, Zhang F, Huang Q, Zhang Z, Liu Y, Strand D, Chen Z (2009): *Aberrant splicing of Hugl-1 is associated with hepatocellular carcinoma progression. Clin Cancer Res, 15: 328-3296*

- 
- (91) Song J, Peng XL, Ji MY, Ai MH, Zhang JX, Dong WG (2013): *Hugl-1 induces apoptosis in esophageal carcinoma cells both in vitro and in vivo*. World J Gastroenterol, 19: 4127-4136
- (92) Matsuzaki T, Takekoshi S, Toriumi K, Kitatani K, Nitou M, Imamura N, Ogura G, Masuda R, Nakamura N, Iwazaki M (2005): *Reduced Expression of Hugl-1 Contributes to the Progression of Lung Squamous Cell Carcinoma*. Tokai J Exp Clin Med, 40: 169-177
- (93) Compton CA, Henson DE (1997): *Protocol for the examination of specimens removed from patients with carcinoma of exocrine pancreas. A basis for checklists*. Arch Pathol Lab Med, 121: 1129-1136
- (94) Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology (1998): *Recommendations for the reporting of pancreatic specimens containing malignant tumors*. Hum Pathol, 29: 893-895
- (95) Hruban RH, Adsay NV, Esposito I, Fukushima N, Furukawa T, Klöppel G, Maitra A, Notohara K, Offerhaus GJA, Ohike N, Pitman MB, Zamboni G (2019): *Pancreatic ductal adenocarcinoma*. In: WHO classification of tumours of the digestive system, International Agency for Research on Cancer, Lyon; 5. Aufl., S. 322-332
- (96) Lang G (2006): *Histotechnik. Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*. Springer-Verlag, S. 257-294
- (97) Boenisch T (Hrsg.) (2003): *Handbuch immunchemische Färbemethoden*. DakoCytomation, 5. Auflage, S. 58
- (98) Biesterfeld S (2014): *Zurverfügungstellung von urheberrechtlich geschützten Abbildungen aus dem Bestand des SFB 432 der Universitätsmedizin Mainz*

- 
- (99) Strimpakos AS, Syrigos KN, Saif MW (2010): *The molecular targets for the diagnosis and treatment of pancreatic cancer*. Gut Liver, 4: 433-449
- (100) Huber MA, Kraut N, Beug H (2005): *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. Current opinion in cell biology, 17(5): 548-558
- (101) Vay C, Babaei S, Safi SA, Dizdar L, Rehders A, Haeberle L, Roderburg C, Loosen SH, Esposito I, Knoefel WT, Krieg A (2022): *Clinicopathological and prognostic value of survivin expression in surgically resected pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cancers (Basel), 14: 3494
- (102) McGuigan AJ, Coleman HG, McCain RS, Kelly PJ, Johnston DI, Taylor MA, Turkington C (2021): *Immune cell infiltrates as prognostic biomarkers in pancreatic ductal adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis*. J Pathol Clin Res, 7: 99-112
- (103) Luu TT (2021): *Review of immunohistochemistry biomarkers in pancreatic cancer diagnosis*. Front Oncol, 11: 799025
- (104) Smith RA, Tang J, Smith CT, Neoptolemus JP, Ghaneh P (2011): *Meta-analysis of immunohistochemical prognostic markers in resected pancreatic cancer*. Br J Cancer, 104: 1440-1451
- (105) Ciliberto D, Staropoli N, Chiellino S, Botta C, Tassone P, Tagliaferri P (2016): *Systematic review and meta-analysis on targeted therapy in advanced pancreatic cancer*. Pancreatology, 16(2): 249-258
- (106) Tong M, Wang J, Zhang H, Xing H, Wang Y, Fang Y, Pan H, Li D (2019): *Efficacy and safety of gemcitabine plus anti-angiogenesis therapy for advanced pancreatic cancer: A systemic review and meta-analysis of clinical randomized phase III trials*. J Cancer, 10(4): 968-978

- (107) Holter S, Borgida A, Dodd A, Grant R, Semotiuk K, Hedley D, Dhani N, Narod S, Akbari M, Moore M, Gallinger S (2015): *Germline BRCA mutations in a large clinic-based cohort of patients with pancreatic adenocarcinoma*. J Clin Oncol, 33(28): 3124-3129
- (108) Humphris JL, Patch AM, Nones K, Bailey PJ, Johns AL, McKay S, Chang DK, Miller DK, Pajic M, Kassahn KS, Quinn MC, Bruxner TJ, Christ AN, Harliwong I, Idrisoglu S, Manning S, Nourse C, Nourbakhsh E, Stone A, Wilson PJ, Anderson M, Fink JL, Holmes O, Kazakoff S, Leonard C, Newell F, Waddell N, Wood S, Mead RS, Xu Q, Wu J, Pinese M, Cowley MJ, Jones MD, Nagrial AM, Chin VT, Chantrill LA, Mawson A, Scarlett CJ, Pinho AV, Rومان I, Giry-Laterriere M, Samra JS, Kench JG, Merrett ND, Toon CW, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N, Jamieson NB, McKay CJ, Carter CR, Dickson EJ, Graham JS, Duthie F, Oien K, Hair J, Morton JP, Sansom OJ, Grützmänn R, Hruban RH, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Schulick RD, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Rusev B, Corbo V, Salvia R, Cataldo I, Tortora G, Tempero MA; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Hofmann O, Eshleman JR, Pilarsky C, Scarpa A, Musgrove EA, Gill AJ, Pearson JV, Grimmond SM, Waddell N, Biankin AV (2017): *Hypermutation in pancreatic cancer*. Gastroenterol, 152(1): 68-74
- (109) Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, Lu S, Kemberling H, Wilt C, Luber BS, Wong F, Azad NS, Rucki AA, Laheru D, Donehower R, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Greten TF, Duffy AG, Ciombor KK, Eyring AD, Lam BH, Joe A, Kang SP, Holdhoff M, Danilova L, Cope L, Meyer C, Zhou S, Goldberg RM, Armstrong DK, Bever KM, Fader AN, Taube J, Housseau F, Spetzler D, Xiao N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Eshleman JR, Vogelstein B, Anders RA, Diaz LA (2017): *Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade*. Science, 357(6349): 409-413
- (110) Safi SA, Haeberle L, Goering W, Keitel V, Fluegen G, Stoecklein N, Rehders A, Knoefel WT, Esposito I (2022): *Genetic alterations predict long-term survival in ductal adenocarcinoma of the pancreatic head*. Cancers (Basel), 14(3):850

## V. Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
ARID1A	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 1A</i>
ARID1	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 1</i>
ARID2	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 2</i>
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia mutated gene</i>
CPS	Combined Positive Score
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMDP	<i>Bio-Medical Data Package</i>
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BRCA	Brustkrebsgen ( <i>Breast Cancer Associated Gene</i> )
CA	Carbohydrate Antigen
CCK8	<i>Cell Counting Kit 8</i>
CDK	Cyklin-abhängige Kinase
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
cdx-2	Homöobox-Protein
CD34	Stammzellmarker der Myelopoese
CDK	Cyklin-abhängige Kinase
CDKNA2A	Cyklin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A
Chi <sup>2</sup>	Chi-Quadrat
CK7	Zytokeratin 7
CK20	Zytokeratin 20
cm	Zentimeter

---

COX-2	Cyclooxygenase-2
CRC	kolorektales Karzinom
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
dest	destilliert
dMMR	<i>Mismatch-Reparatur-Defizienz</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
Eca109	Zelllinie beim humanen Ösophaguskarzinom
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)
EPC1	<i>Enhancer of Polycomb Homolog 1</i>
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
FAMMM	<i>Familial Atypical Multiple Mole Melanoma</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FR $\beta$	Folatrezeptor $\beta$
G	<i>Grading</i>
G <sub>0</sub>	Ruhephase des Zellzyklus
G <sub>1</sub>	Wachstumsphase des Zellzyklus
G <sub>2</sub>	Interphase zur Mitosephase des Zellzyklus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Her2/neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horseraddisch Peroxidase</i> )
Hugl	<i>Human giant larvae</i>

---

HuR	humanes Protein Antigen R
H1	Gruppe > 65 Jahre
H2	Gruppe < 65 Jahre
H2O2	Wasserstoffperoxid
IC-Score	<i>Immun Cells - Score</i>
IgG	Immunglobulin G
INK4A	Inhibitor Kinase 4A
IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien
kD	Kilo Dalton
Ki-67	Proliferationsmarker
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
L	Lymphspalteninvasion
Lgl	<i>Lethal giant larvae</i>
LKB1	<i>Liver Kinase B1</i>
LSAB	<i>Labelled Streptavidin-Biotin</i>
M	Metastasen
M	Mitosephase
MAGEA6	<i>Mage Family Member A6</i>
MAP	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
MAP2K4	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 4</i>
MKK4	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4</i>
MLL3	<i>Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia Protein</i>
MMP	Metalloproteasen
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie



---

MSI	Mikrosatelliteninstabilität
N	Lymphknoten
n	Anzahl
NALCN	<i>Sodium leak channel</i>
NHEM	normale humane epitheliale Melanozyten
p	p-Wert
PALB2	<i>Partner and localizer of BRCA2 gene</i>
PanIN	Intraepitheliale Neoplasie des Pankreas
PAR-3	<i>partition-defective 3 protein</i>
PAR-6	<i>partition-defective 6 protein</i>
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PAS	<i>Periodacid Schiff'sche</i> Reaktion
PBS	<i>phosphate-buffered-saline</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PD	Pankreatikduodenektomie
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
pEZ-M29	<i>plasmid encoding isoform</i>
Pn	Perineuralscheideninfiltration
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor
p16	CDK-Inhibitor 2A
p27	CDK-Inhibitor
R	Resektabel
R0	Resektion im Gesunden
Ras	inaktiviertes GTP bindendes Protein
RasG	aktiviertes GTP bindendes Protein

---

RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )
RT-PCR	<i>Real time – Polymerase chain reaction</i>
SD	<i>Survival Data</i>
SF3B1	<i>Splicing Factor 3B Subunit 1</i>
SLC16A4	<i>Solute carrier family 16 member 4</i>
S	Synthese Phase
SPSS	Programmpaket zur statistischen Analyse von Daten
S-1	orales Fluoropyrimidin
S100A4	Protein S100-4A
T	Tumor
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNM	Tumor / Nodus / Metastasen
TPS	Tumor Proportion Score
TSNA	tabakspezifische Nitrosamine
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs ( <i>Union for International Cancer Control</i> )
ÜLW	Überlebenswahrscheinlichkeit
V	Blutgefäßinvasion
VEGF	<i>Vaskular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
ZIM2	<i>Zinc Finger Imprinted 2 gene</i>
ZNS	Zentralnervensystem
5-FU	5-Fluorouracil
µm	Mikrometer

## **Danksagung**

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld, ehem. Leiter des Instituts für Cytopathologie der Universität Düsseldorf, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Eine große Hilfe waren mir seine wegweisenden Hinweise und Ratschläge, welche mir beim Erstellen meiner Dissertation sehr geholfen haben.

Danke.