

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

**NUCKS1 als Marker der Aggressivität im
Pankreaskarzinom**

Dissertation

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

vorgelegt von
Doctor medic Remus-Cătălin Bobe

2025

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Georg Flügen

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Christoph Roderburg

Zusammenfassung auf Deutsch

Das Pankreaskarzinom ist als aggressive Tumorentität trotz intensiver Forschung und moderner Therapieansätze schlecht behandelbar. NUCKS1 ist ein Protein, das in nahezu allen Zellen exprimiert wird und eine wichtige Rolle beim Zellwachstum, Proliferation und der DNA-Reparatur spielt. Vorangegangene Studien haben bereits vermehrt NUCKS1 in Krebszellen gefunden und mit Aggressivität, Prognose und biologischem Verhalten in Verbindung gebracht. Ziel meiner Arbeit war es, die Expression von NUCKS1 bei duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) zu untersuchen, um NUCKS1 als potenziellen Marker zur Einschätzung der Prognose zu verwenden. Zusätzlich wird der Zusammenhang von NUCKS1 und p53, einem bereits im PDAC etablierten Marker, untersucht. Zur Kohorte zählten 192 Patienten, die eine Pankreasresektion bei PDAC erhalten haben. Immunhistochemisch untersucht wurden TMAs mit Stenzen aus Tumorzentrum, -peripherie, Lymphknoten und Normalgewebe des Pankreas. Hierbei führte ich sowohl eine NUCKS1 als auch eine p53 Färbung durch, um dann die Expression semiquantitativ zu erfassen und statistisch auszuwerten. In höhergradig aberranten Tumoren (G2 vs. G3) zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression von NUCKS1 mit einem Trend zu einem kürzeren Überleben der „NUCKS1^{low}/G3 Tumoren“ ($p=0,051$, Log-Rank Test). In Patienten ohne Metastasen (M0) wurde signifikant mehr NUCKS1 Expression im Lymphknoten-Zellkern festgestellt als bei Patienten mit Metastasen (M1). Zusätzlich fand sich keine Überexpression von NUCKS1 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe des Pankreas. Diese Ergebnisse legen nahe, dass NUCKS1 im PDAC ein protektiver Faktor sein könnte. Eine niedrige Expression von NUCKS1 zeigt in der vorliegenden Studie im PDAC jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die 5-Jahres-Überlebensrate. Bei der p53 Expression wurde kein signifikanter Einfluss auf das Überleben und die Ausprägung der Tumorcharakteristika im PDAC in unserem Kollektiv gefunden. Allein in Lymphknotenmetastasen zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen NUCKS1 Expression und p53 Expressionsmuster. Bei aberranter p53 Expression war in Lymphknotenmetastasen häufiger eine hohe NUCKS1 Expression, was möglicherweise als eine Art Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Zellintegrität gesehen werden könnte.

Summary in English

The pancreas carcinoma is an aggressive form of cancer that proves to be difficult to manage despite intensive research. NUCKS1 is a protein present in almost all human cells and has proven to play an important role in tumor growth, proliferation and DNA repair. Past studies have demonstrated increased NUCKS1 presence in tumor cells and have shown how this correlates with aggressivity, prognosis and biological behavior. The objective of this study was to examine the expression of NUCKS1 in ductal adenocarcinomas to show if NUCKS1 can be used as a potential marker to determine the prognosis. Furthermore, I have examined the relation between NUCKS1 and p53, an already established marker in PDAC. The patient cohort is comprised of 192 patients who have undergone a pancreatic resection because of PDAC. TMAs from the tumor tissue, lymph nodes and normal pancreatic tissue underwent immunohistochemical staining for NUCKS1 and p53. The expression was evaluated semiquantitative and the data was statistically evaluated. Higher grade tumors (G3) have shown a significantly lower expression of NUCKS1 and a tendency to a shorter survival of the group "NUCKS1_{low}/G3 Tumor" ($p=0,051$, Log-Rank Test). The patients without metastasis (M0) have shown a more significantly higher (more intensive) staining of NUCKS1 in the nucleus of lymph nodes than patients with metastasis (M1). Moreover, there was no overexpression of NUCKS1 in tumor tissue in comparison to normal pancreatic tissue. These results suggest that, in patients with PDAC, NUCKS1 could be a protective factor. A low expression of NUCKS1 in PDAC cases has shown no significant difference in the 5-year survival rate. In the analysis of p53 expression there was also no significant difference in survival nor in tumor features in PDAC in our patient collective. Regarding lymph node metastasis an inverse correlation was shown between NUCKS1 and p53 expression. The group that showed an aberrant p53 expression showed a high NUCKS1 expression in lymph nodes metastasis. This would suggest that the higher NUCKS1 expression could be an attempt to a compensation mechanism to preserve cell integrity.

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
N.	Nervus
°C	Grad Celsius
ABC	Avidin / Biotin-Komplex
al.	aliud, andere
Aqua dest.	destilliertes Laborwasser
BRCA2	Breast Cancer 2
bzw.	beziehungsweise
CdK	Cyclin-dependent Kinase
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CK2	Casein kinase II
CKK	Cholezystokinin
DAB	Diaminobenzidin
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
DPC4	deleted in pancreatic carcinoma
EtOH	Ethanol
FAMMM	familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanom-Syndrom
FAMMMPC	familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanom - Pankreaskarzinom - Syndrom
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FPC	familiäres Pankreaskarzinom
G	Grading

HCC	Hepatocelluläres Karzinom
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
IPMN	intraduktale papillär muzinöse Neoplasien
IRS	Immunreaktiver Score
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
l	Liter
LCS	Liquid Coverslip
M	Metastasen
mG	Milligramm
mM	Millimol
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
N	Nodus (Lymphknoten)
n	Anzahl
p16	Protein 16
p53	Protein 53
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ph-Wert	Potenz und dem Maß für Wasserstoff-Ionenkonzentration
PRSS1-Gen	Kationisches Trypsinogen-Gen
R	Resektion
SIRS	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
s.o.	siehe oben
SPINK1	Serin-Protease-Inhibitor Kazal Typ 1

SPSS	statistical Package für Social Sciences
STK11	Serine/threonine kinase 11
T	Tumor
TP53	Tumor Protein 53
u.a.	unter anderem
UICC	Union International Contre Cancer
µm	Mikrometer
vs.	versus

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Pankreas.....	1
1.1.1 Anatomie	1
1.1.2 Physiologie.....	2
1.2 Erkrankungen des Pankreas.....	3
1.2.1 Akute Pankreatitis	3
1.2.2 Chronische Pankreatitis	4
1.2.3 Pankreaskarzinom.....	4
1.2.3.1 Basisinformation und Pathogenese	4
1.2.3.2 Häufigkeit.....	6
1.2.3.3 Pathogenese.....	7
1.2.3.4 Risikofaktoren.....	7
1.2.4 Sonstige Pankreastumore	8
1.3 NUCKS1.....	8
1.4 p53	9
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	10
1.7 Ethikvotum	11
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Patientenkollektiv	11
2.2 Laborgeräte, Chemikalien und Einmalartikel	12
2.3 Tissue Microarray (TMA)	13
2.4 P53-Färbung.....	13
2.4.1 Antikörper.....	13
2.4.2 Färbeprotokoll	13
2.4.3 Auswertung der p53 Färbung.....	14
2.5.1 Antikörper.....	15
2.5.2 Färbeprotokoll	15

2.5.3 Auswertung der NUCKS1 Färbung	16
2.6 Statistische Auswertung.....	18
3 Ergebnisse	20
3.1 Deskriptive Datenanalyse	20
3.2 Explorative Datenanalyse	25
3.2.1 NUCKS1 Expression	25
3.2.2 p53 Expression	38
3.2.3 p53- und NUCKS1-Expression.....	40
4 Diskussion	43
4.1 NUCKS1 als Prognosemarker im Pankreaskarzinom.....	43
4.2 p53 als Marker für Pankreaskarzinom	45
4.3 Limitationen	46
4.4 Schlussfolgerungen	47
5 Literaturverzeichnis	48

1 Einleitung

1.1 Pankreas

1.1.1 Anatomie

Die Bauchspeicheldrüse, genannt Pankreas (von griech. *pan* = „alles“, *kreas* = „Fleisch“), ist ein im Oberbauch zwischen Duodenum und Milz gelegenes, sekundär retroperitoneales, längliches, parenchymatöses Organ. Als Organ mit endokriner sowie exokriner Funktion erhält es aus den Ästen des Truncus coeliacus (A. hepatica communis und A. splenica) sowie der A. mesenterica superior seine komplexe Blutversorgung. Die venöse Drainage erfolgt über die V. splenica in die Pfortader. Innerviert wird das Pankreas sympathisch über den Plexus pancreaticus des Plexus coeliacus und parasymphatisch über den N. vagus (1).

Makroskopisch kann das Pankreas in drei Teile gegliedert werden: Kopf (Caput), Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda). Durch das Pankreas verläuft ein ca. 2 mm breiter Ausführungsgang (Ductus pancreaticus oder Ductus wirsungianus) für das exokrine Pankreassekret. Gemeinsam mit dem Gallengang (Ductus choledochus) mündet er in der Papilla duodeni major in den absteigenden Teil des Zwölffingerdarms (Pars descendens duodeni) (2). Mitunter gibt es auch einen weiteren Pankreasgang (Ductus pancreaticus accessorius), der in der Papilla duodeni minor mündet.

Mikroskopisch betrachtet besteht das Pankreas überwiegend aus exokrinem, rein serösem Drüsengewebe, welches Verdauungssäfte produziert. Unterteilt wird der exokrine Teil des Pankreas in Lappen (Lobi), diese wiederum in Läppchen (Lobuli). Ein Lobulus besteht aus Acini mit dazugehörigen Ausführungsgängen, genannt Schaltstücken. In den Acinuszellen werden Vorstufen der Verdauungsenzyme produziert, über Schaltstücke zunächst in intralobuläre, dann in interlobuläre Ausführungsgänge und schließlich in den Ductus pancreaticus gegeben. In sogenannten Pankreas-Sternzellen findet in ruhendem Zustand die Speicherung von Fett und Vitamin A statt. In aktivem Zustand wird unter anderem Bindegewebe gebildet. Beispielweise im Rahmen einer chronischen Pankreatitis, aber auch bei maligner Transformation, kommt es hier zu einer übermäßigen Bildung von Bindegewebe und schließlich zur Organfibrose. Durch Bindegewebssepten im Organ verlaufen

Ausführgänge mit Sekretion von Mucinen und Hormonen, Blut- und Lymphgefäße sowie vegetative Nerven (3).

Ein geringerer Anteil, etwa 2% des Pankreasgewebes, ist endokrines Drüsengewebe, auch Inselorgan genannt. Hier werden in inselartig angesammelten endokrinen Zellen verschiedene Hormone produziert. Die höchste Dichte an endokrinen Zellen befindet sich im Pankreasschwanz. Vier verschiedene Zellarten verteilen sich innerhalb der Inseln unterschiedlich, pro Insel mehrere Tausend Zellen. A-Zellen befinden sich ebenso wie D-Zellen häufig in der Inselperipherie, während B-Zellen meist gruppiert innerhalb der Insel relativ gleichmäßig verteilt sind. Auch sogenannte PP-Zellen sind gleichmäßig in der Insel verteilt (3).

1.1.2 Physiologie

Als sowohl endokrines als auch exokrines Organ spielt das Pankreas eine zentrale Rolle bei der Aufschließung von Nahrungsbestandteilen und der Regulation des Blutzuckerspiegels. Täglich werden je nach Nahrungszufuhr etwa 2 l Pankreassekret in das Duodenum sekretiert. Die Sekretionsrate und die Zusammensetzung des Sekretes sind dabei abhängig von verschiedenen Verdauungsphasen (3).

Wasser, Natrium, Kalium, Chlorid und Bikarbonat sind die wichtigsten anorganischen Komponenten des Pankreassekretes und werden von sogenannten zentroazinären Zellen sekretiert. Durch Bikarbonat wird der pH-Wert des Pankreassekretes angehoben und saurer Mageninhalt neutralisiert. Dadurch können Verdauungsenzyme nachfolgend im Darmlumen optimal arbeiten (4).

Duktale Zellen des Pankreas sind für den Austausch von Bicarbonat und Chloridionen sowie für die Sekretion von Elektrolyten und Wasser zuständig. Den aktiv sezernierten Salzen folgt Wasser dann sekundär.

Für die Synthese und Sekretion von Verdauungsenzymen, die 90% der Proteine des Pankreassekretes ausmachen, sind Azinuszellen des exokrinen Pankreas zuständig. Azinuszellen produzieren inaktive Vorstufen proteolytischer Enzyme. Hier ist insbesondere das Enzym Trypsin zu nennen, dessen Vorstufe Trypsinogen erst am Bürsteneithel des Darms durch das dort vorhandene Enzym Enteropeptidase zu aktivem Trypsin gespalten wird. Trypsin selbst kann ebenfalls andere Proenzyme, darunter auch Trypsinogen, in ihre aktive Form umwandeln (5,6).

Andere wichtige Enzyme des Pankreas sind beispielweise Chymotrypsin und Trypsin als Endopeptidasen, die Peptidverbindungen in Proteinen spalten. Alpha-Amylasen sind für die Spaltung glykosidischer Bindungen verantwortlich.

Für die Fettverdauung sezerniert das Pankreas vor allem Lipase, Phospholipase A und Cholesterinesterasen.

Reguliert wird die Sekretion von exokrinem Pankreassekret neural, beispielweise in der sogenannten kephalen und gastralen Verdauungsphase parasymphatisch über den N. Vagus, und auch hormonell. Neben einer neuralen Stimulation kommt es beispielweise in der intestinalen Verdauungsphase im Duodenum zu einer Sekretion von Sekretin aus sogenannten S-Zellen des Duodenums und Jejunums. Sekretin wiederum stimuliert die Sekretion von Bicarbonat in den zentroazinären Zellen des Pankreas. Ein weiterer wichtiger humoraler Mediator für Verdauungsenzyme ist Cholezystokinin (CKK), welches im oberen Dünndarm gebildet wird (6).

Die endokrinen Zellen des Pankreas sind wichtig für den Kohlenhydratstoffwechsel. Hierbei sind α -Zellen für die Synthese von Glukagon, β -Zellen für die Synthese von Insulin, δ -Zellen für die Synthese von Somatostatin und F-Zellen für die Synthese von pankreatischem Polypeptid (PP) zuständig (7).

Insgesamt gibt es eine Vielzahl von gastrointestinalen Peptiden, die in Magen, Darm, Ösophagus, Pankreas und auch im Fettgewebe gebildet werden und Einfluss auf die komplexe exokrine und endokrine Funktion des Pankreas haben (4).

1.2 Erkrankungen des Pankreas

1.2.1 Akute Pankreatitis

Eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse wird als Pankreatitis bezeichnet. Bei einer akuten Pankreatitis kommt es durch eine fehlgeleitete Enzymaktivierung im Pankreas selbst zu einer Selbstverdauung des Organs. Ursächlich für eine Pankreatitis sind beispielweise übermäßiger Alkoholkonsum, obstruierende Gallensteine, Infektionen, Komplikationen nach Bauchoperationen oder endoskopischen Eingriffen sowie Autoimmunprozesse (8).

Klinisch beklagen Patienten typischerweise starke, meist gürtelförmig ausstrahlende Schmerzen, Übelkeit und ein prall-elastisches Abdomen. Flüssigkeitsgefüllte Kammern, sogenannte gutartige Pseudozysten, können sich im Pankreasgewebe entwickeln und wieder spontan zurückbilden, aber auch superinfizieren. Zu lebensbedrohlichen Komplikationen kommt es auch durch ein Übergreifen der Entzündung auf benachbarte Strukturen, Gewebeschäden mit Blutungen, Dehydrierung und Multiorganversagen durch ein systemisches, inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) (9).

1.2.2 Chronische Pankreatitis

Als chronische Pankreatitis bezeichnet man eine lang bestehende Entzündung der Bauchspeicheldrüse, die zu einem irreversiblen Verlust der Struktur und dem Ausfall von exokriner und endokriner Funktion führt. Bei der sogenannten exokrinen Pankreasinsuffizienz kommt es zu einer gestörten Aufspaltung von Nahrung (=Maldigestion) mit nachfolgendem Gewichtsverlust, Blähungen, Durchfall und Fettstuhl (10).

Durch einen Verlust der Inselzellen ist das Hormon Insulin vermindert und es kommt zu diabetischen Stoffwechselluständen (11).

Die häufigsten Ursachen einer chronischen Pankreatitis sind Alkoholmissbrauch und Tabakkonsum sowie obstruierende Gallensteine (10).

1.2.3 Pankreaskarzinom

1.2.3.1 Basisinformation und Pathogenese

Neben den gutartigen Tumoren wie Zystadenomen und muzinösen Zystomen des exokrinen Pankreasgewebe finden sich häufiger die malignen Tumoren.

Das Pankreaskarzinom ist der häufigste Tumor des Pankreas, in etwa drei Viertel der Fälle im Pankreaskopf gelegen. 20% der Pankreaskarzinome finden sich im mittleren Anteil und 5% im Pankreasschwanz (12). Duktale Adenokarzinome stellen mit 85–90% die weitaus häufigste Entität der malignen epithelialen Tumoren des exokrinen Pankreas dar (13).

Klassifiziert werden Pankreaskarzinome meist basierend auf ihrer Histologie und Lokalisation anhand der TNM-(Tumor-Nodus-Metastasen-) Klassifikation der *Union International Contre Cancer* UICC (Tabelle 1-4) (12). Zusätzlich gibt das sogenannte *Grading* (G) eine Einstufung der Differenzierung der Tumorzellen (Tabelle 5).

T Klassifikation	
Tx	Primarius nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primarius
TiS	Carcinoma in Situ/PanIN
T1	Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung, limitiert auf dem Pankreas
T2	Tumor begrenzt auf Pankreas, mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich jenseits des Pankreas aus, jedoch fehlende Infiltration des Truncus coeliacus oder der A.mesenterica superior
T4	Infiltration des Truncus coeliacus oder A.mesenterica superior

Tabelle 1 - T Klassifikation

N Klassifikation	
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht zu beurteilen
N0	Regionäre Lymphknoten ohne Metastasen
N1	Anwesenheit regionärer Lymphknotenmetastasen

Tabelle 2 - N Klassifikation

M Klassifikation	
Mx	Fernmetastasen nicht zu beurteilen
M0	Abwesenheit von Fernmetastasen
M1	Anwesenheit von Fernmetastasen

Tabelle 3 - M Klassifikation

UICC Stadium 8. Ausgabe	
Stadium 0	Tis, N0, M0
Stadium IA	T1, N0, M0
Stadium IB	T2, N0, M0
Stadium IIA	T3, N0, M0
Stadium IIB	T1-3, N1, M0
Stadium III	T1-3, N2, M0
	T4, jedes N, M0
Stadium IV	jedes T, jedes N, M1

Tabelle 4 - UICC 8. Ausgabe

Tumor Grading	
G1	gut differenzierte Zellen
G2	mäßig differenzierte Zellen
G3	schlecht differenzierte Zellen
G4	undifferenzierte Zellen

Tabelle 5 - Tumor Grading

Kennzeichnend für Pankreaskarzinome sind ein aggressives Wachstum, frühe Metastasierung und ein schlechtes Therapieansprechen.

1.2.3.2 Häufigkeit

Das Pankreaskarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Pankreas.

Etwa 20.230 Menschen erkrankten im Jahr 2020 in Deutschland an einem Pankreaskarzinom und fast ebenso viele Personen starben aufgrund der schlechten Prognose. Das Pankreaskarzinom ist die vierthäufigste Krebs-Todesursache mit ca. 9 Prozent bei Frauen bzw. 7,5 Prozent bei Männern. Für Frauen liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 76 Jahren und für Männer bei 72 Jahren (14).

1.2.3.3 Pathogenese

Die Entartung einer „normalen“ zu einer malignen Pankreazelle ist ein schrittweiser Prozess, getrieben von der Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen. Häufig entstehen zunächst nicht invasive, nicht maligne Vorstufen, sogenannte Präkanzerosen.

Die häufigsten präkanzerösen Vorstufen des Pankreaskarzinoms stellen die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinös zystische Neoplasie dar, die sich anhand ihrer histomorphologischen Architektur unterscheiden (15).

Häufig finden sich in den Tumorzellen durch Mutation inaktivierte Gene für Wachstumsregulation und Tumorunterdrückung, beispielweise HER2/neu, KRAS, p16, p53 oder DPC4 (13,16).

1.2.3.4 Risikofaktoren

Als wichtigster Risikofaktor für das Pankreaskarzinom gilt die chronische Pankreatitis. Andere erworbene Risikofaktoren sind Diabetes mellitus, Zigarettenrauchen, Übergewicht, Vitamin-D-Mangel als auch fettreiche Ernährung. Als angeborene Risiken werden beispielweise zystische Fibrose oder die kongenitale Autoimmunpankreatitis genannt (12,16).

Daneben existiert eine Reihe genetischer Krankheitsbilder und familiärer Belastungen, die das Risiko erhöhen, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Ihnen gemeinsam ist eine gestörte Regulation der Zellproliferation, DNA-Reparatur oder Hemmung des Zellzyklus. Hierzu gehört beispielweise das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom mit Keimbahnmutationen im BRCA1-, BRCA2- oder PALB2-Gen, die hereditäre Pankreatitis mit Keimbahnmutation im PRSS1- oder SPINK1-Gen oder das Peutz-Jeghers-Syndrom mit Keimbahnmutationen im STK11-Gen (17–19). Ebenfalls ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Pankreaskarzinoms besteht bei Familien mit mindestens zwei Verwandten ersten Grades mit Pankreaskarzinom (familiäres Pankreaskarzinom (FPC) und FAMMM (familiäres atypisches multiples Muttermal- und

Melanom-Syndrom) oder FAMMMPC - Syndrom (familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanom - Pankreaskarzinom - Syndrom) mit Keimbahnmutationen im CDKN2A-Gen (20). Hierin zeigt sich schon die Signifikanz dieser zellschützenden Mechanismen in der Onkogenese des Pankreaskarzinom.

1.2.4 Sonstige Pankreastumore

In der Bauchspeicheldrüse können sich viele verschiedene sowohl gutartige als auch bösartige Tumore bilden.

Die meisten zystischen Tumoren des Pankreas sind benigne, wobei teilweise ein hohes Potential für eine Entartung zu einem bösartigen Tumor vorliegen kann. Neben serösen und muzinösen Zystadenomen finden sich beispielweise häufig intraduktale papillär muzinöse Neoplasien (IPMN), die sich in Haupt- oder Nebengängen des Pankreas bilden (21).

Endokrine Tumore des Pankreas sind in ihrem biologischen Verhalten sehr variabel. Etwa die Hälfte aller endokriner Pankreastumore sezerniert letztlich Hormone und diese werden hierdurch symptomatisch, während hormon-inaktive Tumore meist zufällig diagnostiziert werden (22).

Durch die vermehrte Sekretion eines Insulinoms kann es zu wiederkehrenden Unterzuckerungen kommen (23). Gastrinome können durch die Gastrinproduktion zu einer Hypersekretion von Magensäure führen und damit aggressive Ulzera hervorrufen. Während Gastrinome, die sich auch im Dünndarm finden können, in der Regel bösartig sind, metastasieren Insulinome deutlich seltener (24).

1.3 NUCKS1

Nuclear, casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1 (NUCKS1) ist ein Protein, welches aus dem menschlichen Chromosom 1q32.1 in nahezu allen menschlichen Zelltypen exprimiert wird, insbesondere in Gehirn, Schilddrüse und Skelettmuskel (25,26). Studien mit Mäusen zeigten in der Embryonalentwicklung zunächst eine Zunahme von NUCKS1 mRNA, dann eine Abnahme von NUCKS1 mRNA in den untersuchten Gewebezellen außer in neuronalen Zellen und Skellettmuskulatur, wo sich weiterhin eine hohe Expression zeigte (26,27). NUCKS1

ist insbesondere im Zellkern lokalisiert, doch einige Studien fanden vermehrt in Krebszellen NUCKS1 im Zytoplasma (26,27).

NUCKS1 spielt hierbei eine signifikante Rolle bei der Regulation von Replikation, Transkription und Kondensation von Chromatin. Verschiedene Kinasen wie *Casein kinase II* (CK2), *Cyclin-dependent Kinase* (Cdk) und *DNA aktivierte Protein Kinase* können NUCKS1 phosphorylieren. NUCKS1 kann prinzipiell in allen Phasen des Zellzyklus phosphoryliert werden und die mitose-spezifische Phosphorylierung von Threonine-Residuen übernehmen. Diese wiederum spielen eine wichtige Rolle beim Zellwachstum, Proliferation und DNA-Reparatur (26,28). In-vitro Versuche deuten darauf hin, dass NUCKS1 als Substrat für sogenannte *second messenger-activated* Kinasen fungieren kann (28).

Vorangegangene Arbeiten zeigen, dass die durch DNA-Schäden induzierte p53-Antwort zu einer Verminderung von NUCKS1, sowie zum Stillstand des Zellzyklus führen kann. Einige Krebszellen können in diesen Mechanismus eingreifen und u.a. die Menge an NUCKS1 durch eine p53 Mutation erhöhen und so trotz DNA-Schäden und fehlenden Mitogenen weiterhin Zellproliferation betreiben (29).

Die vielfältigen Funktionen von NUCKS1 legen nahe, dass NUCKS1 als wichtiger Biomarker für verschiedene metabolische Krankheiten und Krebsarten, als auch als Angriffspunkt in neuartigen Therapien genutzt werden könnte (30).

Auch viele andere Krankheiten wie Morbus Parkinson, idiopathische Skoliose und bipolare Störungen werden mit NUCKS1-Alterationen in Verbindung gebracht. Ebenso zeigen vorangegangene Studien eine Überexpression von NUCKS1 in vielen Tumoren, wie dem kolorektalen Karzinom, Lungenkrebs, oder Endometriumkarzinomen (30,31).

Eine neuere Studie von Xianfeng et al. zeigt eine Überexpression von NUCKS1 in Gewebe von hepatozellulären Karzinomen und sogar ein längeres Überleben von HCC-Patienten mit niedriger NUCKS1 Expression, sodass die Expression als potentieller prognostischer Marker genutzt werden könnte (32).

1.4 p53

Das Tumorsuppressor-Protein p53, auch „Wächter des Genoms“ genannt, spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung von Zellintegrität und der Verhinderung

von Krebs. Kodiert vom TP53-Gen ist es in fast allen menschlichen Zelltypen vorhanden und wird aktiviert, wenn Zellen Stress oder Schäden, zum Beispiel durch Strahlen, Chemikalien oder Umweltfaktoren erfahren. In Folge aktiviert p53 die Expression von Genen, die für die DNA-Reparatur verantwortlich sind. Nicht nur die Behebung von Schäden, sondern die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität der Zelle ist hierbei Ziel. Sind die DNA-Schäden allerdings zu gravierend und irreparabel, so kann p53 eine Apoptose auslösen. Dieser programmierte Zelltod ist wichtig, damit beschädigte Zellen nicht weiter wachsen und sich teilen, was potentiell zu genetischen Mutationen und Krebs führen kann (33).

Verschiedene Faktoren können die komplexe Regulation von p53 beeinflussen und somit zu einer Funktionsstörung von p53 führen, beispielweise eine Mutation im TP53-Gen. Ein mögliches Resultat wäre eine erhöhte Anfälligkeit für Krebs. Dies kann sich durch einen kompletten Verlust des p53 Proteins, aber auch durch eine Funktionseinschränkung mit konsekutiver Überexpression des defekten Proteins, ausdrücken.

Eine Studie von Liebl et al. zeigt, dass in bis zu 43% der untersuchten kolorektalen Karzinome eine Mutation von TP53 vorliegt und auch in den übrigen Tumoren p53 oftmals eine Fehlfunktion aufweist (33).

Auch beim Pankreaskarzinom wurden bereits verschiedene p53-Mutationen identifiziert, die zu einer Fehlfunktion oder dem Verlust von p53 führen können und somit die Tumorsuppressor-Funktionen von p53 nicht mehr ausgeübt werden können (34,35).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund seiner Aggressivität und seiner schlechten Prognose ist das Pankreaskarzinom trotz etablierter chirurgischer und konservativer Therapien eine Herausforderung für Arzt und Patient.

Umso wichtiger ist es, bessere Behandlungs- und Diagnosemöglichkeiten zu entwickeln. Die Bedeutung von NUCKS1 und p53 beim Pankreaskarzinom ist hierbei ein wichtiger Ansatzpunkt für die weitere Erforschung von Immuntherapien und personalisierter Medizin. Ob NUCKS1 im Pankreaskarzinom über- oder

unterexprimiert ist und womöglich als prognostischer Marker genutzt werden kann, ist bisher noch nicht ausreichend erforscht.

Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein, die Expression von NUCKS1 und p53 in Gewebeproben von Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) immunhistochemisch in verschiedenen Tumorkompartimenten und Lymphknoten zu untersuchen und einen Zusammenhang zu klinischen Variablen und Überlebensdaten zu prüfen. Hierbei ist die Hypothese, dass NUCKS1 in fortgeschrittenen PDAC überexprimiert ist und NUCKS1, basierend auf Arbeiten in anderen Entitäten, als Marker für ein schlechteres Überleben dienen könnte. Des Weiteren wird die Korrelation von NUCKS1 und p53, einem schon etablierten Marker, untersucht.

1.7 Ethikvotum

Ein Ethikantrag mit der Studiennummer 4664 zur Verwendung von FFPE-Gewebe und klinischen Daten zur Erstellung und Auswertung von TMAs liegt vor und wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität am 09. Mai 2014 genehmigt.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Zum Kollektiv zählen 240 Patienten, die zwischen September 2003 und Januar 2017 in der Universitätsklinik Düsseldorf eine radikale partielle oder totale Pankreatektomie auf Grund eines PDAC erhalten haben. Zu den Ausschlusskriterien zählen eine postoperative 20-Tage-Mortalität, Tumore, die histologisch nicht einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas entsprachen, fehlendes Follow-Up und unzureichendes Probematerial. Als unzureichendes Probematerial galten hierbei kompletter Verlust von Gewebe sowie Verlust von maximal 2 von insgesamt 3 Tumorstanzen auf den untersuchten Tissue Micro Arrays (TMA). Folglich konnten die Gewebeproben von 192 Patienten verwendet werden.

Die Tumorklassifikation erfolgte anhand der 8. Ausgabe der UICC TNM-Klassifikation. Dazu wurden aus den originalen pathologischen Berichten retrospektiv Informationen zur Größe des Tumors, zur Invasion umliegender Gefäße, Lymphknoten, Differenzierungsgrad und Fernmetastasen entnommen. Weiterhin erfolgte die Überprüfung klinischer Daten mit Patientenalter, Geschlecht, Gesamtüberleben und

Ergebnissen von Folgeuntersuchungen. Für die Ermittlung des Gesamtüberlebens (Overall Survival) wurden die Daten der Patienten im Rahmen der klinischen Qualitätskontrolle regelmäßig in den Einwohnermeldeämtern abgefragt.

2.2 Laborgeräte, Chemikalien und Einmalartikel

Mikropipetten	Eppendorf
Pipetboy	Integra Biosciences
Glass-/ Plastikwaren	Firma Costar, Falcon, Starlab, Eppendorf
Antibody Diluent	Zytomed Systems
Aqua dest.	Gibco
DAB Substrate Kit High Contrast	Zytomed Systems
DPBS	Gibco
Ethanol	VWR Chemicals
Liquid Blocker Super Pap Pen	MBT Brand
Mayers Hämalaun	Merck
PBS-Tabletten	MBT Brand
Tween 20	Gibco
Xylol	Merck
DAB-Substrat	Fünf Tropfen DAB Chromogen in eine Flasche DAB-Substrat
Retrieval Solution	10 mM Natrium-Citrat-Puffer (3 mg Tri-Natriumcitrat-Dihydrat auf 1l Aqua dest.)
Counterstain 1	Firma Vector
Bluing Reagent	SczTek Laboratories
Bloxall	Vector Laboratories
ABC-Kit	(biotinyliert, Firma Vector, Vectastain Elite ABC-Kit, #PK4001) anti-rabbit
Corbit (Corbit-Balsam)	Hecht, Kiel-Hassee. Eukitt®
Fettstift	Super Pap Pen Mini
Pankreas Carcinom FFPE-Gewebe	3µm, 20 min, 70°C, dann 2h 56°C

NUCKS1

#HPA 062351 Sigma, rabbit (-20°C)
Nuclear Casein Kinase, Verdünnung
1:300.

2.3 Tissue Microarray (TMA)

In der vorliegenden Arbeit wurden Schnitte von zuvor in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie erstellten TMAs des hier behandelten PDAC-Kollektivs verwendet. Hierzu wurden nach mikroskopischer Markierung von Tumorkompartimenten, Lymphknoten und Normalgewebe gezielt Stenzen aus den jeweiligen Bereichen der FFPE-Blöcke entnommen. Die FFPE-Gewebeproben wurden vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Für die Tissue Microarrays wurden, sofern verfügbar, drei repräsentative Gewebestanden des Primärtumors entnommen, wovon zwei aus dem Tumorzentrum und eine aus der Tumorperipherie stammt. Zwei Stenzen wurden aus Lymphknoten-Metastasen entnommen (soweit vorhanden) und eine Stanze aus tumorfreiem, normalem Pankreasgewebe. Folglich lassen sich jedem Patienten bis zu sechs Stanzzyylinder von 1,0 mm Durchmesser zuordnen. Die Stanzzyylinder wurden mit 0,5 mm Abstand in neue Paraffinblöcke gebettet, die dann mit einer Dicke von 3 µm für das Tissue Microarray geschnitten wurden.

2.4 P53-Färbung

2.4.1 Antikörper

Zur Durchführung der p53 Färbung wurde p53 Klon DO-1/mouse Antikörper (LOT-Nummer 2920413), Konzentration 1:200, von der Firma Calbiochem zur Durchführung einer Immunhistochemischen (IHC) Färbung verwendet.

2.4.2 Färbeprotokoll

Zur Durchführung der p53 Färbung wurde das folgende Protokoll verwendet. Die Schnitte wurden zuerst zwecks Entparaffinierung auf 72 °C erhitzt. Danach erfolgte

eine Hitzevorbehandlung mittels ULTRA Conditioner auf 95°C für 8 Minuten. Hiernach erfolgten weitere „Cell Conditioner Nr.1“ Sequenzen für jeweils 20, 36, 52 und 64 Minuten. Die Objektträger wurden auf 37°C Temperatur gebracht und 4 Minuten inkubiert. Hiernach erfolgte die Auftragung des Antikörpers (1 Tropfen von „PREP KIT 64“), danach wurde LCS („Liquid Coverslip“) aufgetragen und eine Inkubation für 28 Minuten durchgeführt. Es erfolgte eine Gegenfärbung mit 1 Tropfen „Counterstain“ für 4 Minuten nach einer erneuten Auftragung von LCS. Zum Schluss wurde eine Gegenfärbung durchgeführt. Diese erfolgte mittels 1 Tropfen „Bluing Reagent“ und erneute Auftragung von LCS mit einer 4 Minuten Inkubation.

2.4.3 Auswertung der p53 Färbung

Mithilfe der Mikroskop-Software Leica Aperio Imagescope (Firma Leica, Deutschland, Version 12.4.0) wurden die mikroskopischen Bilder bei 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Interpretation erfolgte durch zwei verblindete und unabhängige Untersucher: Dr. med. L. Häberle, Oberärztin des Instituts für Pathologie, und Doctor Medic R.C. Bobe, Facharzt für Viszeralchirurgie, beide zu dem Zeitpunkt am Universitätsklinikum Düsseldorf tätig. Nach Abschluss der Auswertungen wurden die Diskrepanzen gemeinsam besprochen und die Resultate dokumentiert. Die Patientenkohorte wurde nach p53 Färbung in zwei Gruppen geteilt. Eine Gruppe wies eine normale Expression (zwischen 1% und 75% positive Färbung) (n=81), die andere Gruppe eine aberrante Expression von p53 auf (entweder Überexpression mit mehr als 75% positiv gefärbten Kernen oder kompletter Verlust mit unter 1% positiver Färbung) (n=111) (Abbildung 1).

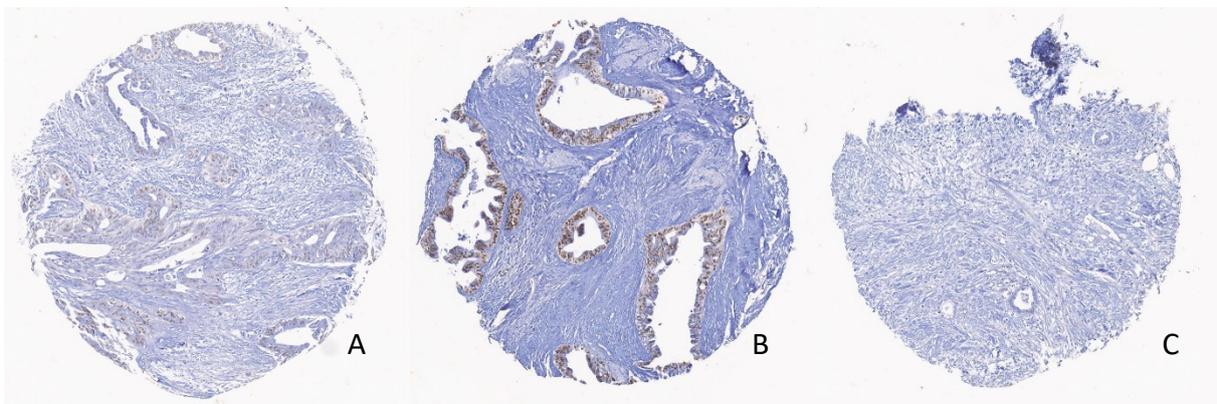


Abbildung 1 - p53 Färbung: Normale Expression (A), Überexpression (B), kompletter Verlust (C)

2.5 NUCKS1-Färbung

2.5.1 Antikörper

Für die Färbungen des Gewebes wurde der Primärantikörper NUCKS1 (Firma Sigma-Aldrich; Anti-NUCKS1; Produktnummer: HPA062351; LOT-Nummer R86908) in der Verdünnung 1:300 verwendet.

2.5.2 Färbeprotokoll

Die Gewebeschnitte (3 µm) wurden 20 Minuten lang bei 70°C, dann 2 Stunden lang bei 56°C inkubiert. Es erfolgte eine Entparaffinierung mittels Xylol (dreimal für 10 Minuten), anschließend eine Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (Ethanollösung 99,5% für zweimal 5 Minuten, 96% für zweimal 5 Minuten, 80% für zweimal 5 Minuten, 70% für einmal 5 Minuten). Abschließend wurden die Proben für 5 Minuten in destilliertem Wasser rehydriert.

Bei 770 Watt und 96°C in der Mikrowelle wurden die Proben zunächst in Antigen-Retrieval (10 mM Natrium-Citrat di Hydrat, pH6) mit 0,05% Tween 20 erhitzt und im Retrieval wieder auf 21°C abgekühlt. Mit einem Fettstift (Super Pap Pen Mini) wurde das Gewebematerial umrandet. Dreimal wurden die Gewebeproben für 3 Minuten in PBS gewaschen. Es folgte eine Blockierung bei Raumtemperatur für eine Stunde (10% normal goat serum in 5% BSA). Um die endogene Peroxidase zu inhibieren, wurden die Schnitte 10 Minuten lang bei Raumtemperatur in Bloxall inkubiert. Nach einem kurzen Eintauchen in PBS wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper NUCKS1 für 12h bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert (Ansatz 300µl: 1µl AK + 299µl PBS).

Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal für 3 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 10% normal Goat Serum in 5% BSA behandelt. Für eine Stunde erfolgte eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper aus dem ABC-Kit (biotinyliert, Firma Vector, Vectastain Elite ABC-Kit, PK4001) mit dem Ansatz 500µl: 2,5µl AK + 497,5µl PBS. Nach 25 Minuten Inkubation folgte das ABC-Reagenz (1ml: 1 Tropfen A + 1 Tropfen B + 1ml PBS). Die Schnitte wurden danach einmalig für 3 Minuten erneut mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur mit ABC-Reagenz für 30 Minuten, danach erneut

für 3 Minute eine Waschung mit PBS. Weiterhin wurden die Schnitte für 10min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit DAB inkubiert (#K3468 Dako; 1ml Substratpuffer 1,5 Tropfen DAB-Chromogen). Es folgten zwei Waschvorgänge, davon einmal mit Leitungswasser für 3 Minuten und einmal 3 Minuten mit PBS. Die Gegenfärbung wurde mittels Meyers Hämalan 2 Minuten durchgeführt. Am Ende wurden die Präparate für 5 Minuten in Leitungswasser gespült.

Zum Schluss wurden die Schnitte entwässert und eingedeckelt mittels folgender Standardprozedur:

1*1min 70% EtOH

1*1min 80% EtOH

1*1min 99,5% EtOH

1*1min Xylol

Eindeckeln mit Corbit

2.5.3 Auswertung der NUCKS1 Färbung

Ein kompletter Scan der TMAs bei 400x Vergrößerung mithilfe der Software Leica Aperio Imagescope (Firma Leica, Deutschland, Version 12.4.0) wurde durchgeführt. Diese TMAs wurden für die Auswertung genutzt. Um die Farbintensität relativ zum prozentualen Anteil an positiver Zytoplasma- und Kernfärbung zu analysieren, wurde die Interpretation durch zwei verblindete und unabhängige Untersucher (Dr. med. L. Häberle, Oberärztin des Instituts für Pathologie, und Doctor Medic R.C. Bobe, Facharzt für Viszeralchirurgie), durchgeführt. Die Auswertung wurde im Konsens mit Hilfe des immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner in leicht modifizierter Version realisiert (36). Die Kerne und das Zytoplasma wurden für jede TMA-Stanze ausgewertet. Hierbei wurden die verschiedenen Lokalisationen der Stenzen unterschieden in: Tumor zentral 1, Tumor zentral 2, Tumor peripher, Lymphknoten 1, Lymphknoten 2, Normalgewebe. Es wurde ausgewertet, wie viel Prozent von Kernen beziehungsweise Zytoplasma keine positive Färbung nachgewiesen haben (Intensität 0) und wieviel Prozent der Kerne beziehungsweise Zytoplasma in welcher Intensität positiv gefärbt wurden (Intensität 1= leichte Färbung, 2= intermediäre Färbung oder 3= starke Färbung) (Abbildung 2,3).

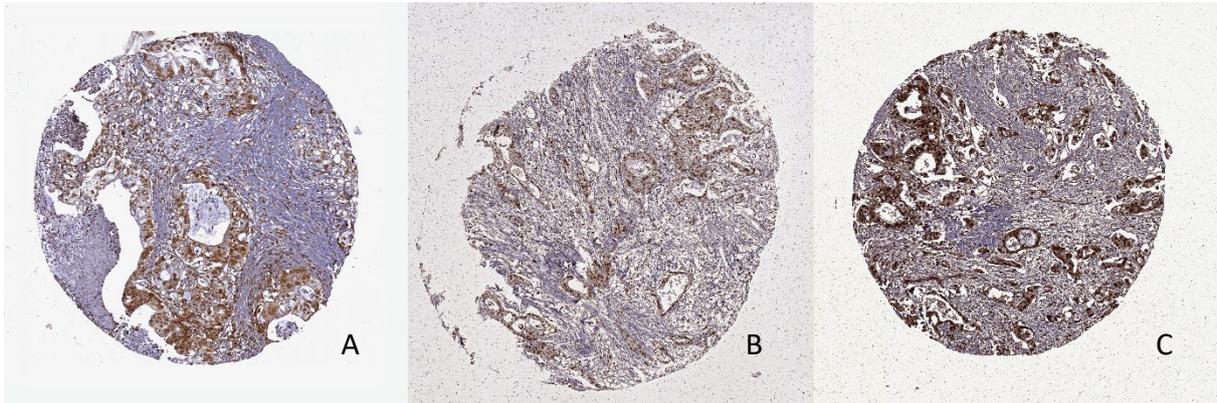


Abbildung 2 - NUCKS1 Färbung: leichte Färbung der Kerne (A), intermediäre Färbung der Kerne (B), starke Färbung der Kerne (C)

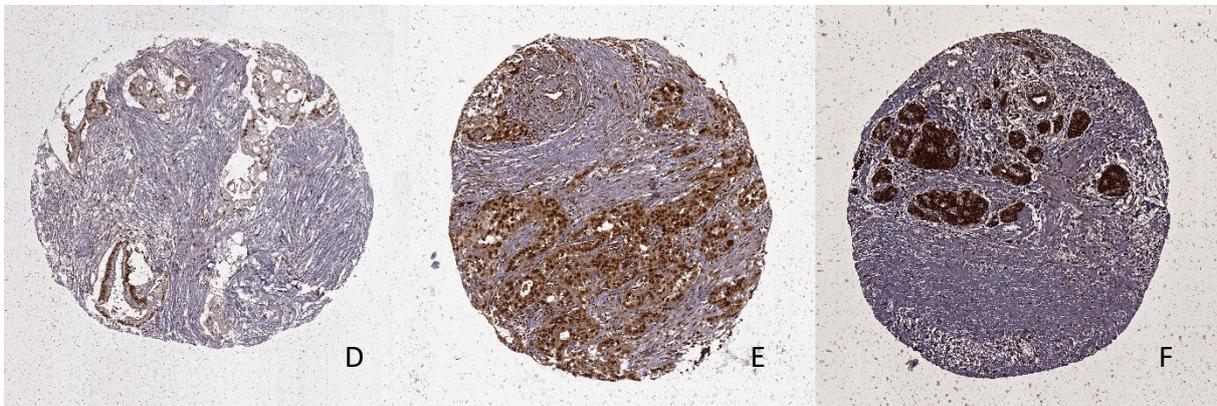


Abbildung 3 - NUCKS1 Färbung: leichte Färbung des Zytoplasmas (D), intermediäre Färbung des Zytoplasmas (E), starke Färbung des Zytoplasmas (F)

Anhand dieser Auswertung wurde der Menge positiver Zellen in Prozent ein fester Wert zugeordnet (Tabelle 6).

Anzahl Positive Zellen	
Keine pos. Kerne Nachweisbar	0
weniger als 10%	1
10 - 50%	2
51 - 80%	3
mehr als 80%	4

Tabelle 6 - Anzahl der Kerne NUCKS Färbung

Anhand der Färbeintensität und der Menge positiver Zellen je Intensität wurde der IRS berechnet nach der Formel:

IRS = Prozent-Anzahl positive Zellen umkodiert nach Tabelle 6 (Werte: 0-4) x Intensität der Färbung nach Abbildung 2 und 3 (Werte: 1, 2 oder 3).

Hiervon wurde das beste Ergebnis (höchster erreichter IRS) für jede Stanze des TMA, einmal für den Kern und einmal für das Zytoplasma erhoben; das maximale Ergebnis war hierbei ein IRS von 12 Punkten (Prozentzahl 4 x Intensität 3). Hiernach wurde für die multiplen Stenzen des Tumors der Durchschnittswert errechnet. Ebenso wurde der Durchschnitt der Punkte der zwei Lymphknotenstanzen berechnet, sodass sich am Ende aus 12 Stenzen pro TMA 8 Resultate (Kern und Zytoplasma getrennt) in der Auswertung ergeben (Tabelle 7).

NUCKS1 Auswertung Stenzen Bestand IRS
Durchschnitt IRS Tumor Zentral – Kerne (aus 2 Stenzen)
Durchschnitt IRS Tumor Zentral – Zytoplasma (aus 2 Stenzen)
IRS Tumor Peripher - Kerne
IRS Tumor Peripher - Zytoplasma
Durchschnitt IRS Lymphknoten – Kerne (aus 2 Stenzen)
Durchschnitt IRS Lymphknoten – Zytoplasma (aus 2 Stenzen)
IRS Normalgewebe - Kerne
IRS Normalgewebe - Zytoplasma

Tabelle 7 - Endergebnis NUCKS1 Auswertung

2.6 Statistische Auswertung

Für die Durchführung der statistischen Analysen wurde SPSS Statistics für Windows (Version 25.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) von der Firma IBM verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Unterschiede in den IRS, Medianwerten der Expression von NUCKS1 in den Tumorstanzen, Lymphknotenmetastasen und Normalgeweben wurden anhand des Wilcoxon-Tests für abhängige Stichproben verglichen. Der Fischer-Freeman-Halton Exact Test wurde für den Vergleich der Mediane von zwei Gruppen verwendet.

Das Gesamtüberleben wurde definiert als der Zeitraum zwischen der Operation und dem letzten Follow-Up oder Tod. Das krankheitsfreie Überleben wurde definiert als der Zeitraum zwischen der Operation und der Diagnose von Metastasen oder lokalem

Rezidiv. Zusätzlich wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt und ein Log-Rank (Mantel Cox) -Test durchgeführt. Die Hazard Ratio (HR) wurde bei 95% Konfidenzintervall (CI) definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Datenanalyse

Nach Anwendung der Ausschlusskriterien wurden aus der Gesamtkohorte von zunächst 240 Patienten die Gewebeproben von 192 Patienten analysiert. 48% (n=93) dieser Patienten waren weiblich, 52% (n=99) dieser Patienten waren männlich (Abbildung 4).

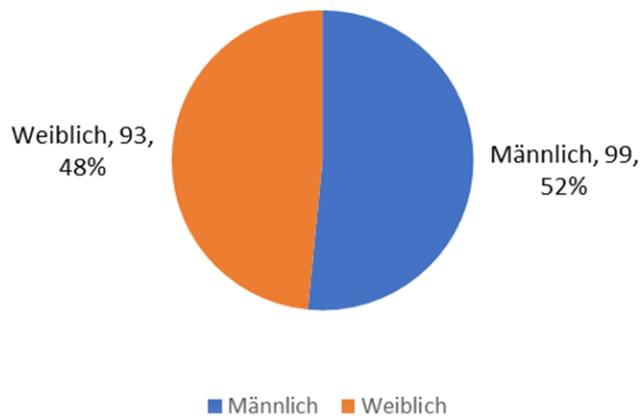


Abbildung 4 - Verteilung nach Geschlecht

Das mediane Alter der untersuchten Patienten betrug zum Zeitpunkt der Operation 68 Jahre (Spannweite 41- 95 Jahre). 48% waren unter dem medianen Alter von 68 Jahren, 52% darüber (Abbildung 5).

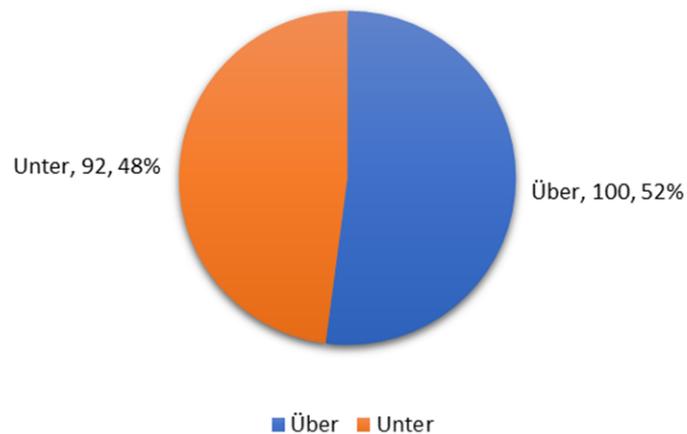


Abbildung 5 - Alter über oder unter Mediane

Die meisten Patienten waren in der 7. Altersdekade (Abbildung 6). Die Gesamtüberlebensdauer lag im Durchschnitt bei 21 Monaten (Spannweite 1 Monat – 128 Monate).

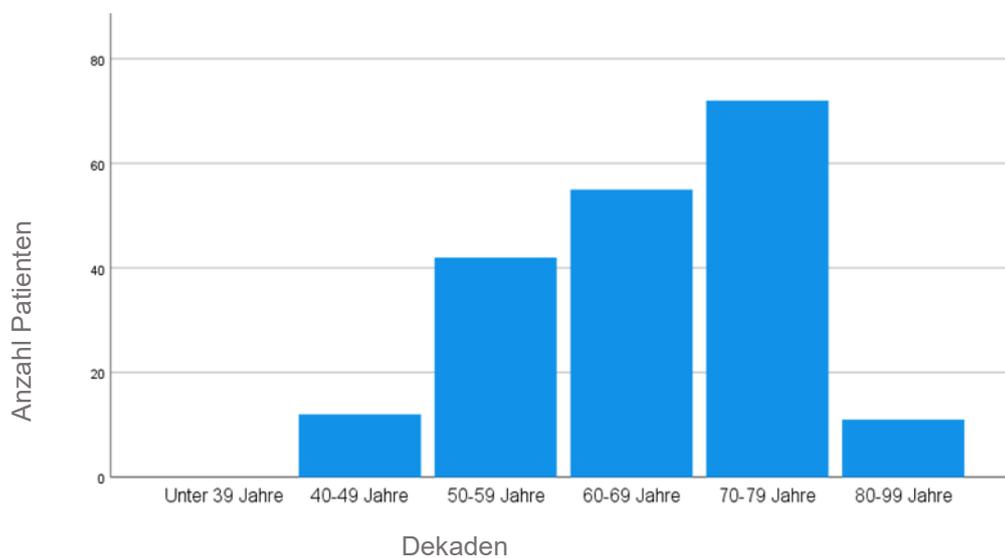


Abbildung 6 - Alter nach Dekaden

Die meisten Patienten befanden sich im Stadium IIb (nach UICC) (n=136) und meisten litten an einem Tumorstadium T3 (n=175) (Abbildung 7 und 8).

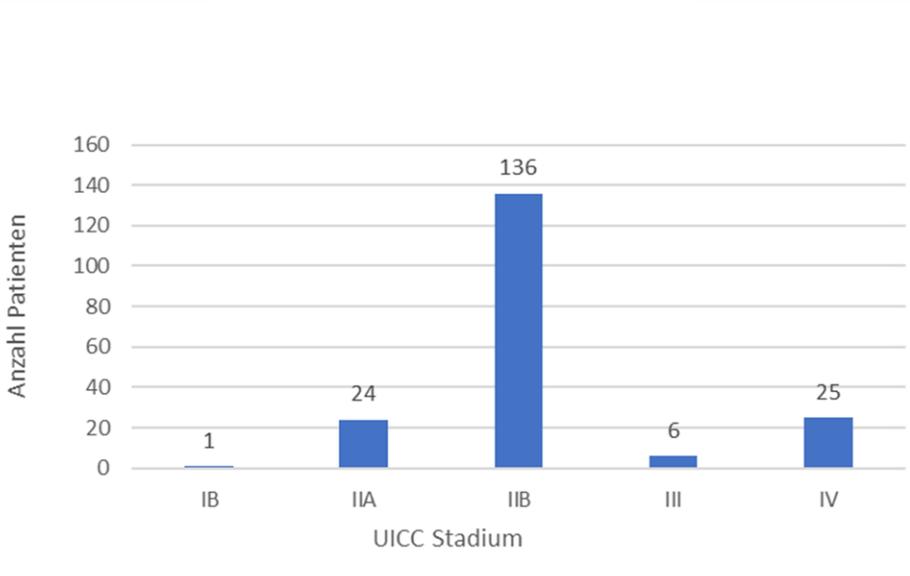


Abbildung 7 – UICC (IIA=0, IIB01, III=2, IV=3, IB=4)

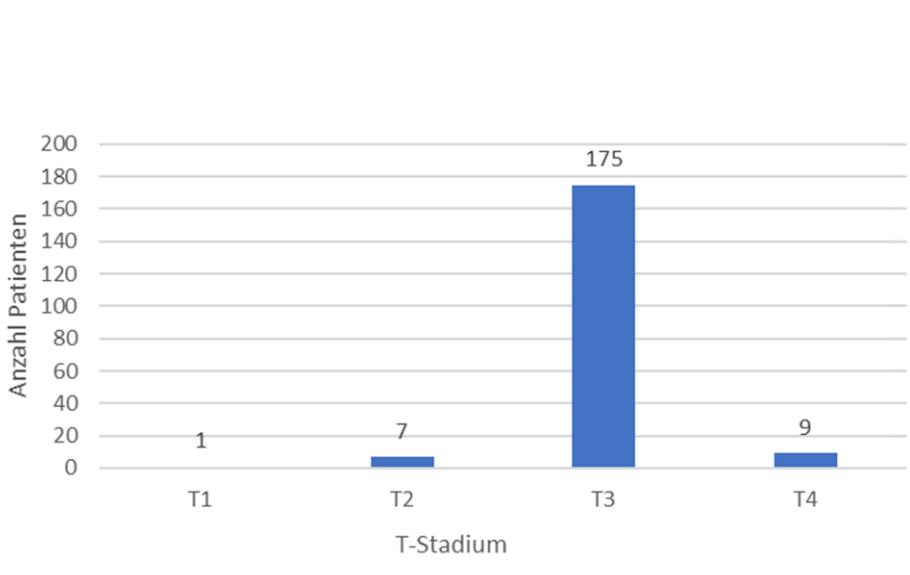


Abbildung 8 - Verteilung nach T-Stadium

Die meisten Patienten wiesen tumorbefallene Lymphknoten auf (Abbildung 9).

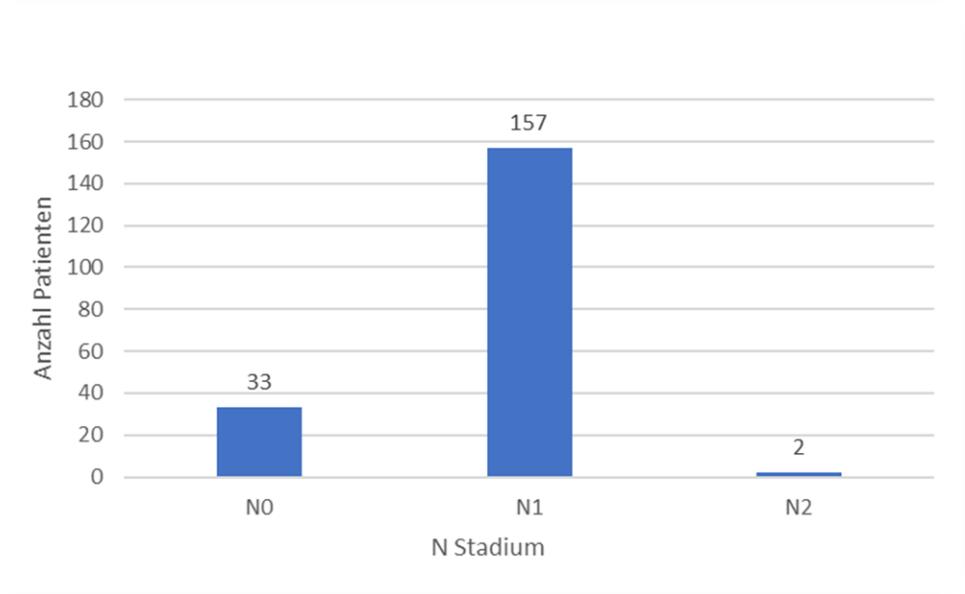


Abbildung 9 - Verteilung nach N-Stadium

Fernmetastasen waren in 14% der Fälle (27 Patienten) vorhanden (Abbildung 10).

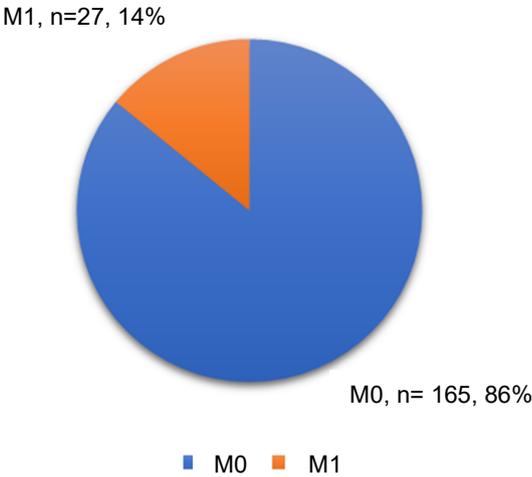


Abbildung 10 - Metastasierung

Eine vollständige operative Tumorentfernung (Resektionsstadium R0) wurde bei 150 Patienten erreicht (Abbildung 11).

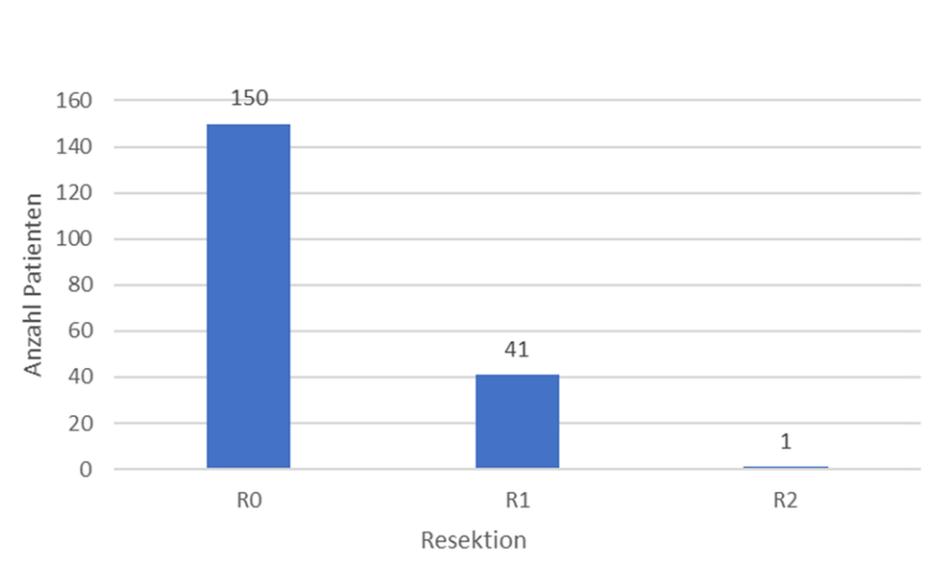


Abbildung 11 – erreichte Resektion

3.2 Explorative Datenanalyse

3.2.1 NUCKS1 Expression

Zunächst wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen geteilt. Die Aufteilung erfolgte anhand des Medianwerts des IRS der NUCKS1 Färbung in „hohe Expression“ und „niedrige Expression“. So entstanden 2 Gruppen pro TMA.

Weiter habe ich untersucht, ob es signifikante Unterschiede in der TNM-Klassifikation zwischen den zwei Gruppen von NUCKS1 Expression gab.

Der Medianwert des IRS für Zellkerne der Tumorzelle lag bei 10,5, sodass eine „hohe Expression“ mit einem IRS gleich oder über 10,5 definiert wurde und eine „niedrige Expression“ im Tumor-Zellkern mit einem IRS unter 10,5. Innerhalb dieser zwei definierten Gruppen wurde dann untersucht, ob sich signifikante Unterschiede je nach T-, N-, M-, R-, G-Stadium ergeben (Tabellen 8-12).

	T1	T2	T3	T4	Total
niedrige Expression	0	5	85	4	94
hohe Expression	1	2	90	5	98
Total	1	7	175	9	192

Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.471

Tabelle 8 - NUCKS1 Expression nach T Stadium im Tumor-TMA-Kern

	N0	N1	N2	Total
niedrige Expression	19	73	2	94
hohe Expression	14	84	0	98
Total	33	157	2	192

Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.169

Tabelle 9 - NUCKS1 Expression nach N Stadium im Tumor-TMA-Kern

	M0	M1	Total
niedrige Expression	81	13	94
hohe Expression	84	14	98
Total	165	27	192

Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 1.000

Tabelle 10 - NUCKS1 Expression nach M Stadium im Tumor-TMA-Kern

	R0	R1	R2	Total
niedrige Expression	77	16	1	94
hohe Expression	73	25	0	98
Total	150	41	1	192
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.188				

Tabelle 11 - NUCKS1 Expression nach R Stadium im Tumor-TMA-Kern

	G2	G3	Total
niedrige Expression	46	48	94
hohe Expression	50	45	95
Total	96	93	189
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.663			

Tabelle 12 - NUCKS1 Expression nach G Stadium im Tumor-TMA-Kern

Bei der NUCKS1 Färbung im Tumorkern wurden in keinem der TNM-Stadien signifikante Unterschiede zwischen den zwei Gruppen „niedrige Expression“ und „hohe Expression“ nachgewiesen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich das 5-Jahres-Überleben der Patienten in den beiden Gruppen „niedrige Expression“ und „hohe Expression“ unterscheidet, zunächst im Zellkern des Tumors (Tabelle 13 und Abbildung 12). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt.

	Anzahl Fälle	Anzahl Ereignisse	Zensierte Fälle	Prozent Zensierte Fälle
niedrige Expression	94	82	12	12,8%
hohe Expression	98	93	5	5,1%
Total	192	175	17	8,9%
Log Rank (Mantel-Cox Chi-Square) = 0,875; p-Wert = 0,350				

Tabelle 13 - 5-Jahres-Überleben nach Expression im Zellkern des Tumors

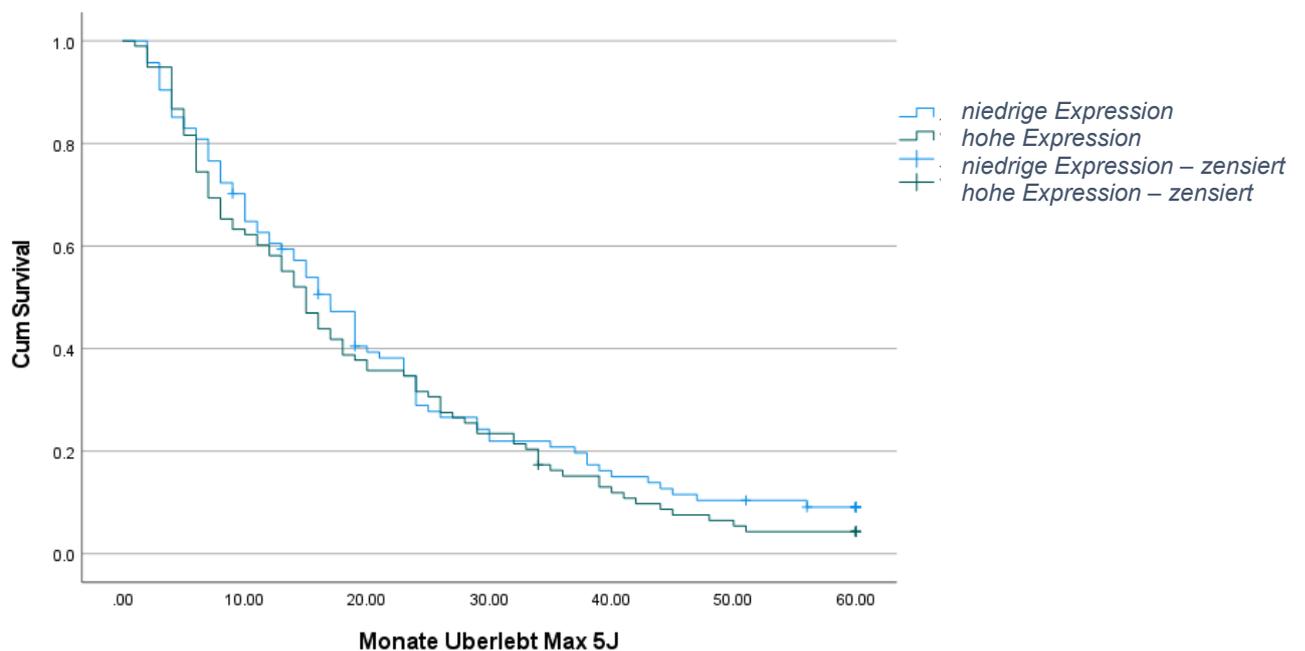


Abbildung 12 - 5 Jahres Überleben für die Gruppen "niedrige Expression" vs. "hohe Expression" in Zellkern des Tumors

Nach gleichem Prinzip wurde der Medianwert des IRS für das Zytoplasma der Tumorzellen berechnet. Eine „hohe Expression“ wurde für Werte gleich oder über dem Medianwert von 6,67 angenommen, eine „niedrige Expression“ darunter. Auch hier wurde dann untersucht, ob es signifikante Unterschiede bei der NUCKS1-Färbung je nach T-, N-, M-, R- und G-Stadien gibt (Tabellen 14-18).

	T1	T2	T3	T4	Total
niedrige Expression	0	4	99	5	108
hohe Expression	1	3	76	4	84
Total	1	7	175	9	192

Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.918

Tabelle 14 - NUCKS1 Expression nach T Stadium im Tumor-TMA-Zytoplasma

	N0	N1	N2	Total
niedrige Expression	17	89	2	108
hohe Expression	16	68	0	84
Total	33	157	2	192

Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.533

Tabelle 15 - NUCKS1 Expression nach N Stadium im Tumor-TMA-Zytoplasma

	M0	M1	Total
niedrige Expression	93	15	108
hohe Expression	72	12	84
Total	165	27	192
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 1.000			

Tabelle 16 - NUCKS1 Expression nach M Stadium im Tumor-TMA-Zytoplasma

	R0	R1	R2	Total
niedrige Expression	79	28	1	108
hohe Expression	71	13	0	84
Total	150	41	1	192
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.092				

Tabelle 17 - NUCKS1 Expression nach R Stadium im Tumor-TMA-Zytoplasma

	G2	G3	Total
niedrige Expression	44	62	106
hohe Expression	52	31	83
Total	96	93	189
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.005			

Tabelle 18 - NUCKS1 Expression nach G Stadium im Tumor-TMA-Zytoplasma

Das G-Stadium unterschied sich in den beiden Gruppen „niedrige NUCKS1 Expression“ und „hohe NUCKS1 Expression“ im Zytoplasma signifikant ($p=0,005$) voneinander. Die G3 Tumoren wiesen signifikant häufiger eine niedrige NUCKS1 Expression im Zytoplasma auf als die G2 Tumoren.

Auch hier wurde untersucht, wie das 5-Jahres-Gesamtüberleben sich zwischen den Gruppen mit einer hohen bzw. niedrigen Expression von NUCKS1 im Zytoplasma der Tumorzelle verhielt (Tabelle 19 und Abbildung 13). Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, wenn auch ein Trend ($p=0,051$) zu einem schlechteren Überleben in der NUCKS1 niedrigen Gruppe vorlag.

	Anzahl Fälle	Anzahl Ereignisse	Zensierte Fälle	Prozent Zensierte Fälle
niedrige Expression	108	100	8	7,4%
hohe Expression	84	75	9	10,7%
Total	192	175	17	8,9%
Log Rank (Mantel-Cox Chi-Square) = 3,815; p-Wert = 0,051				

Tabelle 19 - 5-Jahres-Überleben nach Expression im Zytoplasma des Tumors

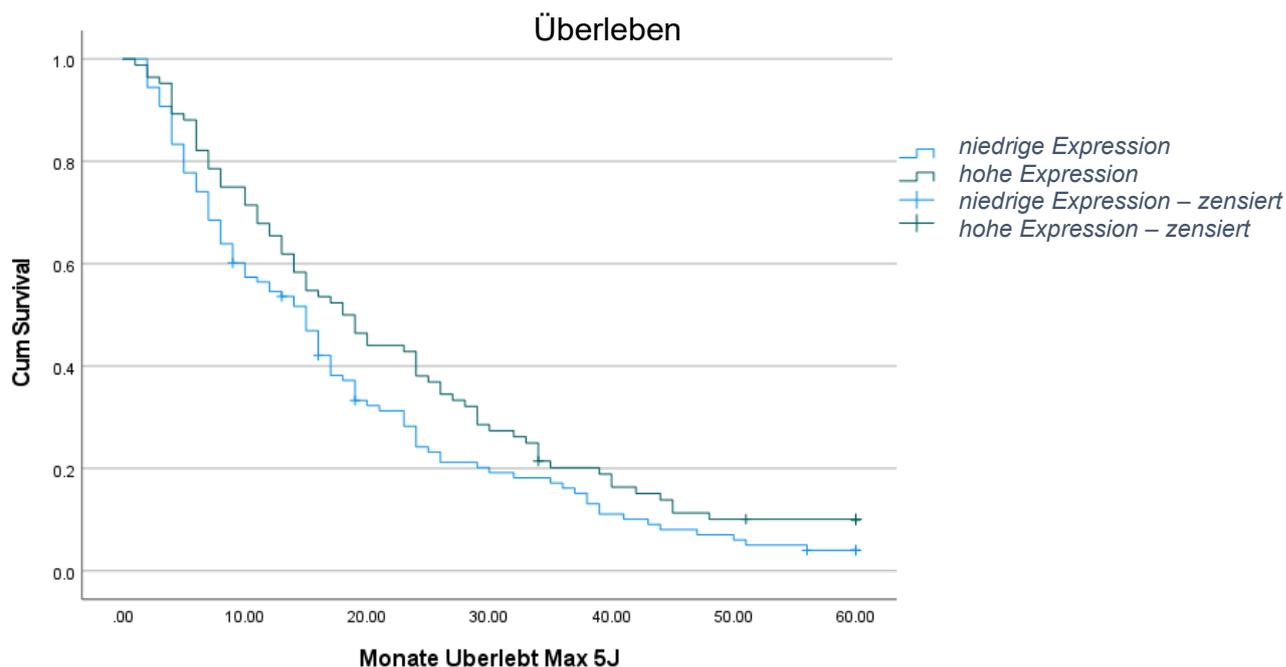


Abbildung 13 - 5 Jahres Überleben für die Gruppen "niedrige Expression" vs. "hohe Expression" in Tumor Zytoplasma

Bei den Lymphknoten lag der Medianwert des IRS im Zellkern bei 12, sodass eine „hohe Expression“ für Werte von 12 definiert wurde und eine „niedrige Expression“ darunter. Anschließend wurde hier untersucht, ob anhand der NUCKS1-Färbung im Lymphknoten-Zellkern signifikante Unterschiede je nach T-, N-, M-, R- und G-Stadien feststellbar waren (Tabellen 20-24).

	T1	T2	T3	Total
niedrige Expression	0	1	32	33
hohe Expression	1	2	69	72
Total	1	3	101	105

Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 1.000

Tabelle 20 - NUCKS1 Expression nach T Stadium im Lymphknoten-TMA-Kern

	N0	N1	N2	Total
niedrige Expression	2	30	1	33
hohe Expression	0	71	1	72
Total	2	101	2	105

Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.091

Tabelle 21 - NUCKS1 Expression nach N Stadium im Lymphknoten-TMA-Kern

	M0	M1	Total
niedrige Expression	24	9	33
hohe Expression	66	6	72
Total	90	15	105
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.016			

Tabelle 22 - NUCKS1 Expression nach M Stadium im Lymphknoten-TMA-Kern

	R0	R1	R2	Total
niedrige Expression	25	7	1	33
hohe Expression	57	15	0	72
Total	82	22	1	105
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.449				

Tabelle 23 - NUCKS1 Expression nach R Stadium im Lymphknoten-TMA-Kern

	G2	G3	Total
niedrige Expression	16	16	32
hohe Expression	35	36	71
Total	51	52	103
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 1.000			

Tabelle 24 - NUCKS1 Expression nach G Stadium im Lymphknoten-TMA-Kern

Anhand der NUCKS1 Färbung im Lymphknoten-Kern zeigte sich beim M-Stadium ein signifikanter Unterschied ($p=0,016$) zwischen den zwei Gruppen „niedrige Expression“ und „hohe Expression“. Die M0 Patienten exprimierten signifikant mehr NUCKS1 im Lymphknoten-Zellkern, die M1 Patienten signifikant weniger.

Ebenso wurde untersucht, ob sich das 5-Jahres-Gesamtüberleben in den beiden Gruppen „hohe Expression“ und „niedrige Expression“ im Zellkern der Lymphknoten unterscheidet. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt (Tabelle 25 und Abbildung 14).

	Anzahl Fälle	Anzahl Ereignisse	Zensierte Fälle	Prozent Zensierte Fälle
niedrige Expression	33	31	2	6,1%
hohe Expression	72	68	4	5,6%
Total	105	99	6	5,7%
Log Rank (Mantel-Cox Chi-Square) = 2,170; p-Wert = 0,141				

Tabelle 25 - 5-Jahres-Überleben nach Expression im Zell-Kern des Lymphknotens

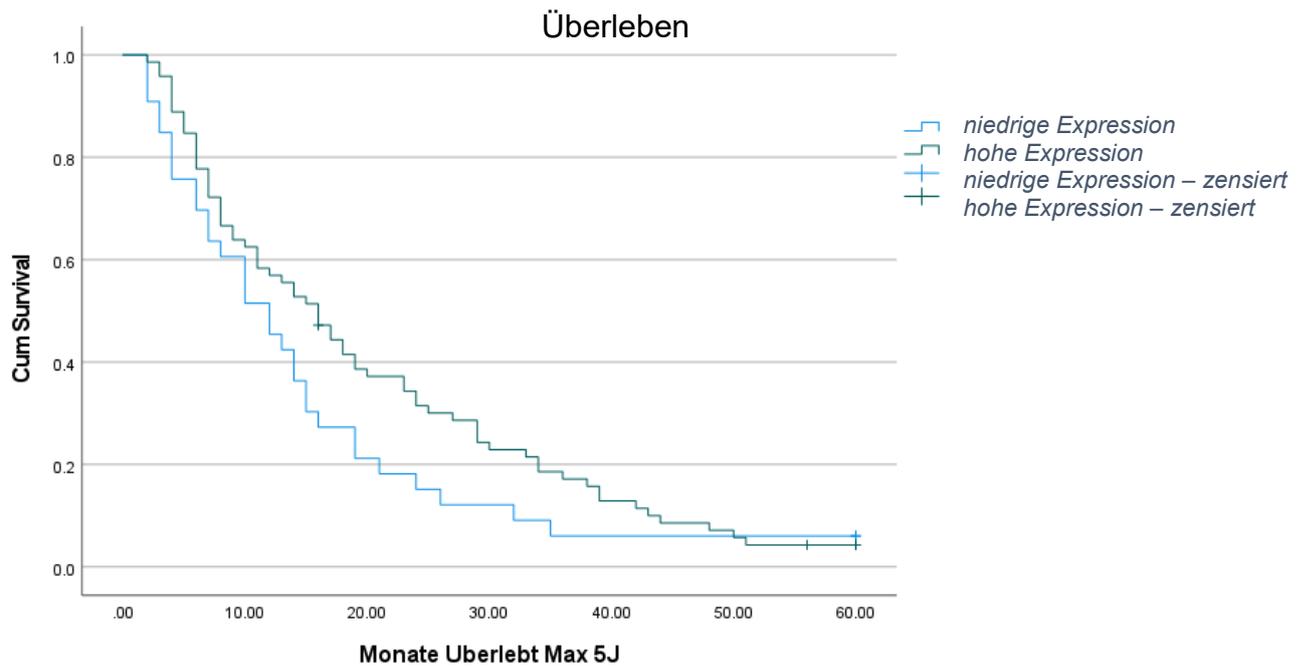


Abbildung 14 - 5 Jahres Überleben für die Gruppen "niedrige Expression" vs. "hohe Expression" in Zellkern des Lymphknotens

Im Zytoplasma der Lymphknoten lag der Medianwert IRS bei 8, sodass eine „hohe Expression“ für Werte gleich oder über 8 definiert wurde und eine „niedrige Expression“ darunter. Anschließend wurde auch hier untersucht, ob anhand der NUCKS1-Färbung im Lymphknoten-Zytoplasma signifikante Unterschiede je nach T-, N-, M-, R- und G-Stadien feststellbar waren (Tabellen 26-30).

	T1	T2	T3	Total
niedrige Expression	0	1	42	43
hohe Expression	1	2	59	62
Total	1	3	101	105

Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 1.000

Tabelle 26 - NUCKS1 Expression nach T Stadium im Lymphknoten-TMA-Zytoplasma

	N0	N1	N2	Total
niedrige Expression	2	40	1	43
hohe Expression	0	61	1	62
Total	2	101	2	105

Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.305

Tabelle 27 - NUCKS1 Expression nach N Stadium im Lymphknoten-TMA-Zytoplasma

	M0	M1	Total
niedrige Expression	37	6	43
hohe Expression	53	9	62
Total	90	15	105
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 1.000			

Tabelle 28 - NUCKS1 Expression nach M Stadium im Lymphknoten-TMA-Zytoplasma

	R0	R1	R2	Total
niedrige Expression	35	7	1	43
hohe Expression	47	15	0	62
Total	82	22	1	105
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.322				

Tabelle 29 - NUCKS1 Expression nach R Stadium im Lymphknoten-TMA-Zytoplasma

	G2	G3	Total
niedrige Expression	18	25	43
hohe Expression	33	27	60
Total	51	52	103
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.232			

Tabelle 30 - NUCKS1 Expression nach G Stadium im Lymphknoten-TMA-Zytoplasma

Bei der NUCKS1 Färbung wurde im Lymphknoten-Zytoplasma in keinem der untersuchten Faktoren ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen „niedrige Expression“ und „hohe Expression“ nachgewiesen.

Das Überleben über 5 Jahren wurde auch zwischen den Gruppen „niedrige Expression“ vs. „hohe Expression“ von NUCKS1 im Zytoplasma der Lymphknoten untersucht (Tabelle 31 und Abbildung 15). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt.

	Anzahl Fälle	Anzahl Ereignisse	Zensierte Fälle	Prozent Zensierte Fälle
niedrige Expression	43	42	1	2,3%
hohe Expression	62	57	5	8,1%
Total	105	99	6	5,7%

Log Rank (Mantel-Cox Chi-Square) = 2,053; p-Wert = 0,152

Tabelle 31 - 5-Jahres-Überleben nach Expression im Zytoplasma des Lymphknotens

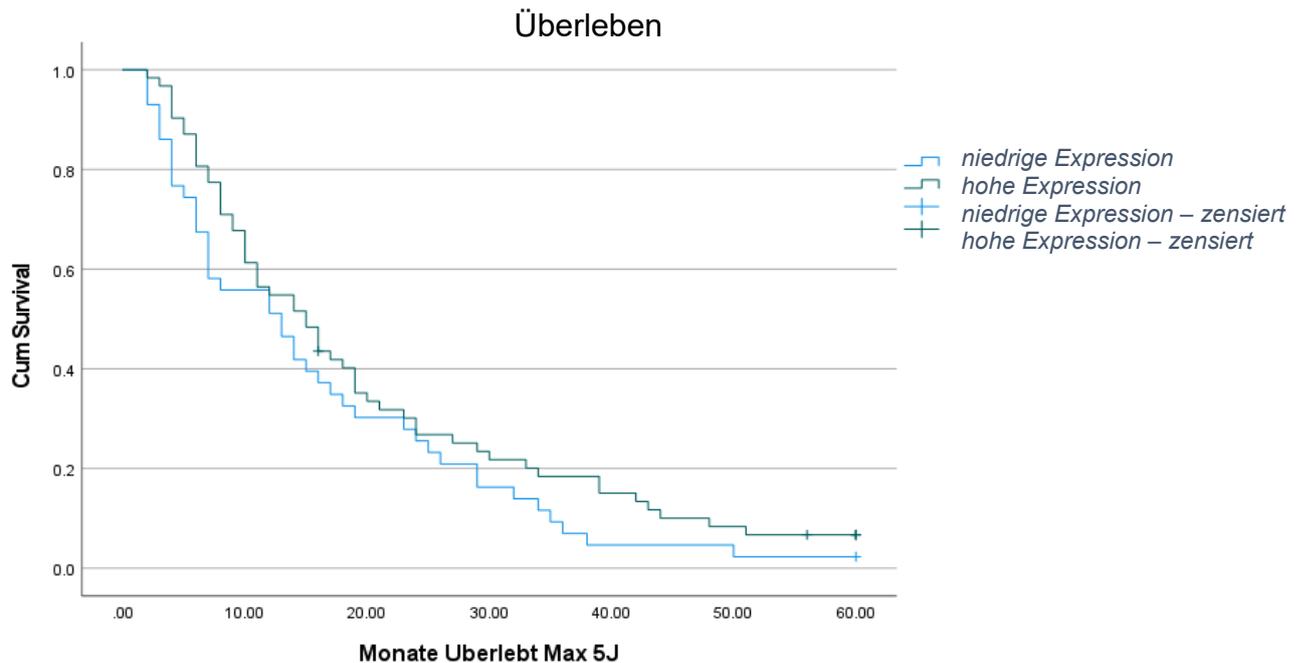


Abbildung 15 - 5 Jahres Überleben für die Gruppen "niedrige Expression" vs. "hohe Expression" in Zytoplasma des Lymphknotens

Gleichermaßen wurde beim Normalgewebe im Zellkern der Medianwert des IRS berechnet. Dieser lag bei 12, sodass wieder eine „hohe Expression“ gleich oder über dem Wert und eine „niedrige Expression“ unter dem Wert definiert wurde. Auch hier erfolgte eine Untersuchung bezüglich eines signifikanten Unterschiedes je nach T-, N-, M-, R- und G-Stadien der begleitenden Tumore (Tabellen 32-36).

	T1	T2	T3	T4	Total
niedrige Expression	1	2	49	3	55
hohe Expression	0	4	86	5	95
Total	1	6	135	8	150

Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.717

Tabelle 32 - NUCKS1 Expression nach T Stadium im Normalgewebe-TMA-Kern

	N0	N1	N2	Total
niedrige Expression	10	44	1	55
hohe Expression	17	78	0	95
Total	27	122	1	150
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.538				

Tabelle 33 - NUCKS1 Expression nach N Stadium im Normalgewebe-TMA-Kern

	M0	M1	Total
niedrige Expression	47	8	55
hohe Expression	84	11	95
Total	131	19	150
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.617			

Tabelle 34 - NUCKS1 Expression nach M Stadium im Normalgewebe-TMA-Kern

	R0	R1	R2	Total
niedrige Expression	41	13	1	55
hohe Expression	78	17	0	95
Total	119	30	1	150
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.233				

Tabelle 35 - NUCKS1 Expression nach R Stadium im Normalgewebe-TMA-Kern

	G2	G3	Total
niedrige Expression	23	32	55
hohe Expression	52	40	92
Total	75	72	147
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.091			

Tabelle 36 - NUCKS1 Expression nach G Stadium im Normalgewebe-TMA-Kern

Bei der NUCKS1 Färbung wurden im Normalgewebe-Zellkern in keinem der TNM-Stadien signifikante Unterschiede zwischen den zwei Gruppen „niedrige Expression“ und „hohe Expression“ nachgewiesen.

Das 5-Jahres-Gesamtüberleben wurde auch zwischen den Gruppen „niedrige Expression“ und „hohe Expression“ von NUCKS1 im Zellkern von Normalgewebe untersucht (Tabelle 37 und Abbildung 16). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt.

	Anzahl Fälle	Anzahl Ereignisse	Zensierte Fälle	Prozent Zensierte Fälle
niedrige Expression	55	51	4	7,3%
hohe Expression	95	84	11	11,6%
Total	150	135	15	10,0%

Log Rank (Mantel-Cox Chi-Square) = 0,940; p-Wert = 0,332

Tabelle 37 - 5-Jahres-Überleben nach Expression im Zell-Kern der Normalgewebe

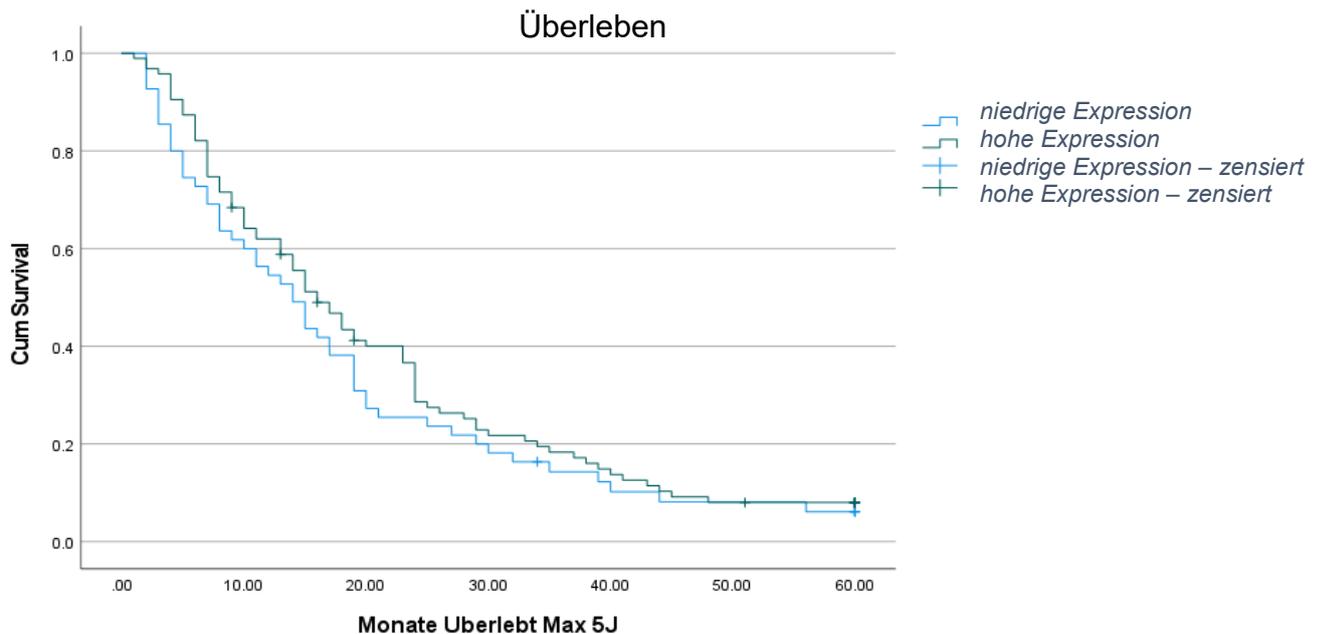


Abbildung 16 - 5 Jahres Überleben für die Gruppen "niedrige Expression" vs. "hohe Expression" im Zellkern der Normalgewebe

Beim Normalgewebe im Zytoplasma wurde der Medianwert der IRS auch berechnet. Dieser lag bei 8, sodass wieder eine „hohe Expression“ gleich oder über dem Wert und eine „niedrige Expression“ unter dem Wert definiert wurde. Auch hier erfolgte eine Untersuchung bezüglich eines signifikanten Unterschiedes je nach T-, N-, M-, G- und R-Stadien (Tabellen 38-42).

	T1	T2	T3	T4	Total
niedrige Expression	0	1	23	1	25
hohe Expression	1	5	112	7	125
Total	1	6	135	8	150
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 1.000					

Tabelle 38 - NUCKS1 Expression nach T Stadium im Normalgewebe-TMA-Zytoplasma

	N0	N1	N2	Total
niedrige Expression	7	18	0	25
hohe Expression	20	104	1	125
Total	27	122	1	150
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.304				

Tabelle 39 - NUCKS1 Expression nach N Stadium im Normalgewebe-TMA-Zytoplasma

	M0	M1	Total
niedrige Expression	18	7	25
hohe Expression	113	12	125
Total	131	19	150
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.020			

Tabelle 40 - NUCKS1 Expression nach M Stadium im Normalgewebe-TMA-Zytoplasma

	R0	R1	R2	Total
niedrige Expression	16	8	1	25
hohe Expression	103	22	0	125
Total	119	30	1	150
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.026				

Tabelle 41 - NUCKS1 Expression nach R Stadium im Normalgewebe-TMA-Zytoplasma

	G2	G3	Total
niedrige Expression	13	12	25
hohe Expression	62	60	122
Total	75	72	147
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 1.000			

Tabelle 42 - NUCKS1 Expression nach G Stadium im Normalgewebe-TMA-Zytoplasma

Bei der NUCKS1 Färbung wurde im Normalgewebe-Zytoplasma beim M-Stadium ein signifikanter Unterschied ($p=0,020$) zwischen den zwei Gruppen „niedrige Expression“ und „hohe Expression“ nachgewiesen. Die M0 Patienten haben signifikant mehr NUCKS1 im Normalgewebe-Zytoplasma exprimiert. Weiterhin wurde im Normalgewebe-Zytoplasma beim R-Stadium ein signifikanter Unterschied ($p=0,026$) zwischen den zwei Gruppen „niedrige Expression“ und „hohe Expression“

nachgewiesen. Die R0 resezierten Patienten hatten eine signifikant höhere NUCKS1 Färbung im Normalgewebe-Zytoplasma als die R1 oder R2 resezierten Patienten.

Auch hier wurde das 5-Jahres-Gesamtüberleben zwischen den Gruppen „niedrige Expression“ und „hohe Expression“ von NUCKS1 im Zytoplasma von Normalgewebe untersucht (Tabelle 43 und Abbildung 17). Es wurde jedoch erneut kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt.

	Anzahl Fälle	Anzahl Ereignisse	Zensierte Fälle	Prozent Zensierte Fälle
niedrige Expression	25	21	4	16,0%
hohe Expression	125	114	11	8,8%
Total	150	135	15	10,0%

Log Rank (Mantel-Cox Chi-Square) = 0,998; p-Wert = 0,318

Tabelle 43 - 5-Jahres-Überleben nach Expression im Zytoplasma der Normalgewebe

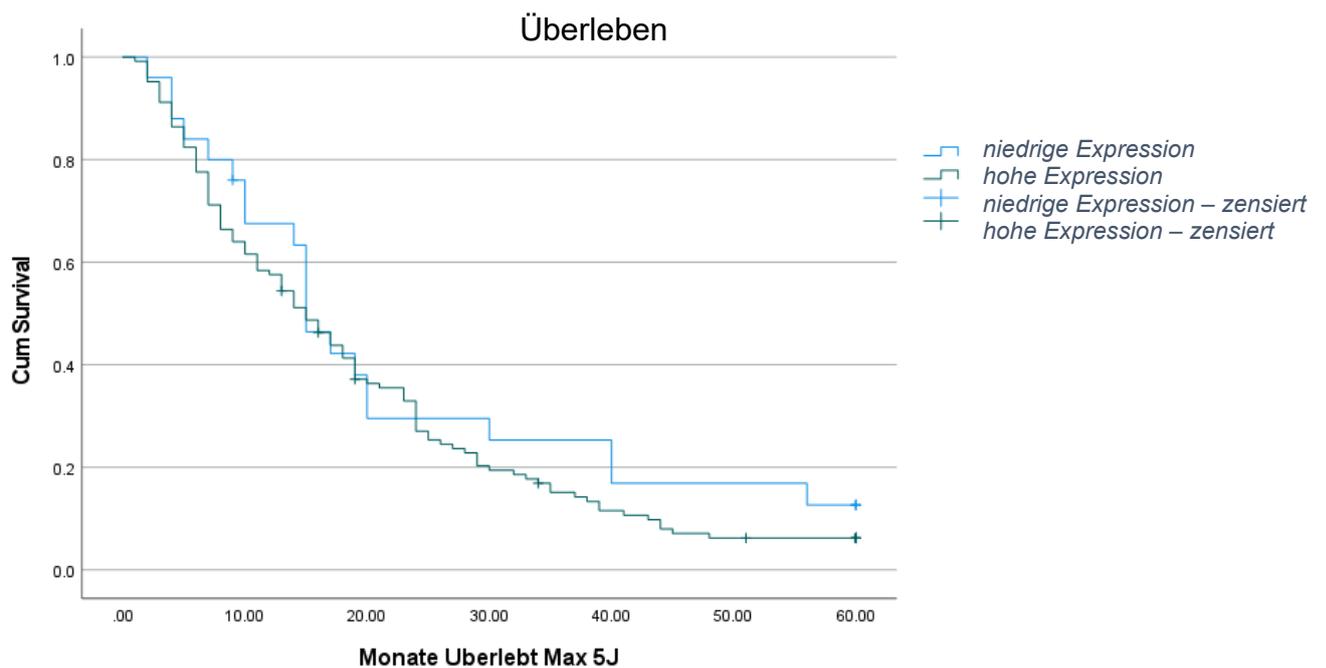


Abbildung 17 - 5 Jahres Überleben für die Gruppen "niedrige Expression" vs. "hohe Expression" im Zytoplasma der Normalgewebe

3.2.2 p53 Expression

Um einen Zusammenhang zwischen 5-Jahres-Überleben und p53-Expression zu untersuchen, wurden erneut zwei Gruppen definiert. Die erste Gruppe (n=81) exprimiert p53 in normalem Maß und die zweite Gruppe (n=111) wies eine aberrante p53 Expression, d.h. entweder eine Über- oder Unterexpression, auf. Dabei wurde festgestellt, dass es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des 5-Jahres Überlebens zwischen der Gruppe mit der normalen p53 Expression und der Gruppe mit der aberranten p53-Expression gibt (Tabelle 44 und Abbildung 18).

	Anzahl Fälle	Anzahl Ereignisse	Zensierte Fälle	Prozent Zensierte Fälle
normale Expression	81	74	7	8,6%
aberrante Expression	111	101	10	9,0%
Total	192	175	17	8,9%

Log Rank (Mantel-Cox Chi-Square) = 0,547; p-Wert =0,460

Tabelle 44 - 5-Jahres-Überleben nach p53 Expression

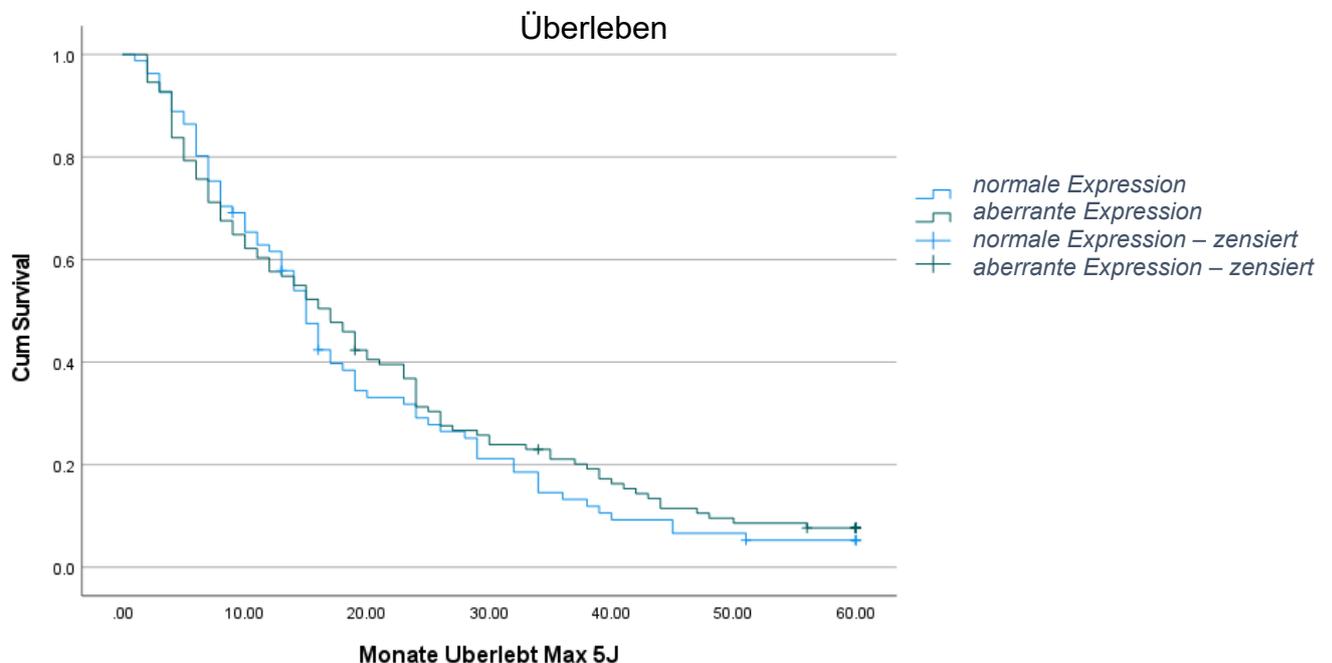


Abbildung 18 - 5-Jahres-Überleben für die Gruppen "normale Expression" vs. "aberrante Expression"

Der Fischer-Freeman-Halton „chi-square“ Test zeigte keinen signifikanten Unterschied in den T-, N-, M-, R-, G-Stadien abhängig von der p53 Expression (Tabellen 45-49).

	T1	T2	T3	T4	Total
p53 normale Expression	0	3	77	1	81
p53 aberrante Expression	1	4	98	8	111
Total	1	7	175	9	192
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.164					

Tabelle 45 - p53 Expression nach T Stadium im TMA - Gesamtscore

	N0	N1	N2	Total
p53 normale Expression	18	62	1	81
p53 aberrante Expression	15	95	1	111
Total	33	157	2	192
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.196				

Tabelle 46 - p53 Expression nach N Stadium im TMA – Gesamtscore

	M0	M1	Total
p53 normale Expression	69	12	81
p53 aberrante Expression	96	15	111
Total	165	27	192
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.835			

Tabelle 47 - p53 Expression nach M Stadium im TMA – Gesamtscore

	R0	R1	R2	Total
P53 normale Expression	61	20	0	81
p53 aberrante Expression	89	21	1	111
Total	150	41	1	192
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.468				

Tabelle 48 - p53 Expression nach R Stadium im TMA – Gesamtscore

	G2	G3	Total
P53 normale Expression	42	38	80
p53 aberrante Expression	54	55	109
Total	96	93	189
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.769			

Tabelle 49 - p53 Expression nach G Stadium im TMA – Gesamtscore

3.2.3 p53- und NUCKS1-Expression

Mit Hilfe des Mann Whitney Tests und des Fischer-Freeman-Halton Exact Tests wurde der Zusammenhang zwischen den beiden p53 Gruppen („normal“ vs. „aberrant“) und der NUCKS1 Färbung („niedrige Expression“ vs. „hohe Expression“) untersucht, jeweils im Zellkern der Tumore, im Zytoplasma der Tumore, im Zellkern der Lymphknoten, im Zytoplasma der Lymphknoten, im Zellkern des Normalgewebe und im Zytoplasma des Normalgewebes (Tabelle 50).

Durchschnitt NUCKS1	Zellkern Tumor	Zytoplasma Tumor	Zellkern Lymphknoten	Zytoplasma Lymphknoten	Zellkern Normalgewebe	Zytoplasma Normalgewebe
Asymp. Sig. (2-tailed) p-Wert	0,309	0,954	0,294	0,822	0,556	0,474
Variabel: p53 normale Expression (1) oder p53 aberrante Expression (2)						

Tabelle 50 - p53 und NUCKS1 Zusammenhang

Nach Einteilung der Patientenkohorte nach normaler und aberranter p53 Färbung wurde evaluiert, ob die Gruppen unterschiedliche NUCKS1 Färbeintensitäten aufwiesen.

Im Tumor-Zellkern ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der NUCKS1 Färbung zwischen den p53 Gruppen. Im Tumor-Zytoplasma und im Lymphknoten-Zellkern ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der NUCKS1 Färbung zwischen den beiden p53 Gruppen (Tabellen 51-53).

	NUCKS1 niedrige Expression Tumor Kerne	NUCKS1 hohe Expression Tumor Kerne	Total
p53 normale Expression	36	45	81
p53 aberrante Expression	58	53	111
Total	94	98	192
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.309			

Tabelle 51 - p53 Färbung in dem Gruppen niedrigen oder hoch exprimierten NUCKS1 Färbung im Tumor Kerne

	NUCKS1 niedrige Expression Tumor Zytoplasma	NUCKS1 hohe Expression Tumor Zytoplasma	Total
p53 normale Expression	46	35	81
p53 aberrante Expression	62	49	111
Total	108	84	192
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 1.000			

Tabelle 52 - p53 Färbung in dem Gruppen niedrigen oder hoch exprimierten NUCKS1 Färbung im Tumor Zytoplasma

	NUCKS1 niedrige Expression Lymphknoten Kerne	NUCKS1 hohe Expression Lymphknoten Kerne	Total
p53 normale Expression	17	32	49
p53 aberrante Expression	16	40	56
Total	33	72	105
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.533			

Tabelle 53 - p53 Färbung in dem Gruppen niedrigen oder hoch exprimierten NUCKS1 Färbung im Lymphknoten Kerne

Im Lymphknoten-Zytoplasma zeigte sich ein signifikanter Unterschied der NUCKS1 Färbung zwischen der Gruppe mit normaler p53 Expression und der Gruppe mit aberranter p53 Expression ($p=0,009$). Bei einer hohen NUCKS1 Expression wurde signifikant häufiger eine aberrante p53 Expression nachgewiesen; im Gegenzug wiesen Tumore mit niedriger NUCKS1 Expression in Zytoplasma des Lymphknotens signifikant häufiger eine normale p53 Expression auf (Tabelle 54).

	NUCSKS1 niedrige Expression Lymphknoten Zytoplasma	NUCSKS1 hohe Expression Lymphknoten Zytoplasma	Total
p53 normale Expression	27	22	49
p53 aberrante Expression	16	40	56
Total	43	62	105
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.009			

Tabelle 54 - p53 Färbung in dem Gruppen niedrigen oder hoch exprimierten NUCKS1 Färbung im Lymphknoten Zytoplasma

Im Normalgewebe ergaben sich weder im Zellkern noch im Zytoplasma signifikante Unterschiede der NUCKS1 Färbung zwischen der Gruppe mit normaler p53 Expression und der Gruppe mit aberranter p53 Expression (Tabellen 55 und 56).

	NUCSKS1 niedrige Expression Normalgewebe Kerne	NUCSKS1 hohe Expression Normalgewebe Kerne	Total
p53 normale Expression	27	40	67
p53 aberrante Expression	28	55	83
Total	55	95	150
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.496			

Tabelle 55 - p53 Färbung in dem Gruppen niedrigen oder hoch exprimierten NUCKS1 Färbung im Normalgewebe Kerne

	NUCSKS1 niedrige Expression Normalgewebe Zytoplasma	NUCSKS1 hohe Expression Normalgewebe Zytoplasma	Total
p53 normale Expression	10	57	67
p53 aberrante Expression	15	68	83
Total	25	125	150
Fischer-Freeman-Halton Exact Test p-Wert (Exact Sig. 2-sided) = 0.664			

Tabelle 56 - p53 Färbung in dem Gruppen niedrigen oder hoch exprimierten NUCKS1 Färbung im Normalgewebe Zytoplasma

4 Diskussion

4.1 NUCKS1 als Prognosemarker im Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom zählt zu den aggressivsten Tumorentitäten und ist trotz intensiver Forschung und einer Vielzahl moderner Chemotherapien schlecht behandelbar. Gleichzeitig wird das Pankreaskarzinom oftmals spät entdeckt, sodass bereits eine Metastasierung vorliegt. Umso wichtiger ist die Etablierung von Tumormarkern zur Prognoseeinschätzung, Therapieplanung und Nachkontrolle.

Wie bereits ausgeführt spielt NUCKS1 eine wichtige Rolle bei Zellwachstum, Proliferation und DNA-Reparatur, weshalb sich viele Studien bereits mit dem Zusammenhang zwischen NUCKS1 und Krebs beschäftigt haben.

Ziółkowski et al. fanden in 84,3% der Krebszellen beim invasiv duktalem Mammakarzinom einer hohe Expression von NUCKS1 (38).

Eine andere Studie von Shi et al. untersuchte die Expression von NUCKS1 beim serös-papillären Ovarialkarzinom, welches u.a. das Ovar, den Uterus und das Peritoneum befallen kann. Hierfür wurde mRNA von NUCKS1 gemessen, während ich für die vorliegenden Untersuchungen das Vorhandensein des NUCKS1 Proteins mit einer immunhistochemischen Färbung untersuchte. Diese wurde anschließend wie oben beschrieben semiquantitativ ausgewertet. Shi et al. fanden vor allem im Zellkern der Tumorzellen eine erhöhte NUCKS1 mRNA Expression, jedoch nur schwach bzw. selten im Zytoplasma (39).

Analog dazu untersuchte ich in der vorliegenden Arbeit daher das Vorhandensein von NUCKS1 nicht nur im Zellkern, sondern auch im Zytoplasma. Dabei war NUCKS1 im Zytoplasma häufiger niedrig exprimiert.

Shi et al. fanden bei ihrer Studie mit Ovarialkarzinomen eine signifikante Korrelation zwischen NUCKS1 Expression und Risikofaktoren wie Tumorstadium, Tumordifferenzierung, Lymphknotenmetastasen, Rezidivrisiko sowie Ansprechen auf Chemotherapie, die die Bedeutung von NUCKS1 als neuer, unabhängiger prognostischer Marker des serös-papillären Ovarialkarzinoms unterstreicht (39).

Symonowicz et al. fanden ebenfalls einen Zusammenhang zwischen NUCKS1 Expression und Tumorgrading, Lymphknotenmetastasen sowie Fernmetastasen im invasivem, nicht-spezifischem Brustkrebs gefunden, sodass die Autoren NUCKS1 als potentiellen prognostischen Marker dieser Tumorentität vorschlagen (37).

In dem von mir untersuchten Kollektiv zeigte sich stattdessen eine signifikant niedrigere NUCKS1 Expression in höhergradig aberranten (G3 vs. G2) Tumoren, was sich auch mit einem Trend zu einem kürzeren Überleben der „NUCKS1^{low}/G3 Tumoren“ ($p=0,051$, Log-Rank Test) widerspiegelte. NUCKS1 könnte im PDAC also eher ein protektiver Faktor sein, der vielleicht auf Grund der bekannten Funktion von NUCKS1 und der hohen Mutationslast im PDAC zu einer geringeren De-differenzierung und daher bei erhaltener NUCKS1 Expression zu einem weniger aggressiven Phänotyp führt. Eine Korrelation des mikroskopischen Phänotyps mit der Expression von NUCKS1 könnte in Zukunft diesen Zusammenhang untermauern, war allerdings nicht Teil meiner hier vorliegenden Arbeit.

Ähnlich gegensätzlich zu den oben genannten anderen Studien konnte in meiner Studie bei Patienten ohne Metastasen (M0) signifikant mehr NUCKS1 Expression im Lymphknoten-Zellkern festgestellt werden als bei Patienten mit Metastasen (M1). Auch im Zytoplasma des Normalgewebes bei den Pankreaskarzinom-Patienten dieser Kohorte wurde bei Patienten ohne Metastasen (M0) eine signifikant höhere NUCKS1-Expression gefunden als im Zytoplasma des Normalgewebes bei Patienten mit Metastasen (M1). Aggressive Tumore bilden in der Regel bei schnellerem Wachstum auch schneller Metastasen, sodass mein Ergebnis darauf hindeutet, dass eine hohe Expression von NUCKS1 Zeichen einer geringeren Aggressivität sein könnte.

Unterstützt wird diese Theorie auch von meiner Beobachtung, dass in der vorliegenden PDAC-Kohorte keine Überexpression von NUCKS1 in Tumorgewebe im Vergleich zum Pankreasnormalgewebe festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zum Normalgewebe der Mamma zeigte sich im tumornahen Normalgewebe in meiner Untersuchung eine ausgeprägte NUCKS1 Expression, die diese im Tumor übertraf. Dies deutet darauf hin, dass eine erhaltene NUCKS1 Expression für eine normale Gewebemöostase wichtig ist.

Im Gegensatz dazu zeigt jedoch die Studie von Shi et al. bei Patienten mit Ovarialkarzinomen eine graduelle Zunahme der NUCKS1 mRNA Expression von normalem Ovar, zu nicht metastasiertem Ovarialkarzinom, zu metastasiertem

Ovarialkarzinom und schließlich zu der Metastase selbst, sodass NUCKS1 dort als Marker für Tumorprogression vorgeschlagen wird (39).

Andere Studien zeigen eine niedrigere 5-Jahres-Überlebensrate bei hoher NUCKS1 Expression im Ovarialkarzinom, Endometriumkarzinom und Magenkarzinom, sodass laut der Autoren bei diesen Karzinomen NUCKS1 als prognostischer Marker diskutiert werden kann (39–41).

Ich konnte in der hier vorliegenden Arbeit keinen Unterschied im Überleben (5-Jahres overall survival) oder in der Verteilung der erfassten Tumorcharakteristika (TNM u.a.) abhängig von der NUCKS1 Expression im Zellkern der Tumorzellen feststellen. NUCKS1 Verlust zeigte in der vorliegenden Studie im PDAC in der 5-Jahres-Überlebensanalyse keinen signifikanten Einfluss.

4.2 p53 als Marker für Pankreaskarzinom

Dank einer Vielzahl vorangegangener Studien konnte bereits gezeigt werden, dass das Tumorsuppressor-Gen p53 in humanen Tumoren häufig mutiert ist, so auch in Pankreaskarzinomen (42,43). Um die Ausbreitung von Mutationen zu verhindern, kann p53, auch „Wächter des Genoms“ genannt, einen Wachstumstopp oder programmierten Zelltod induzieren, wenn DNA-Schädigungen detektiert wurden.

Ein unerwartetes Ergebnis der vorliegenden Arbeit war der fehlende Einfluss der aberranten p53 Expression auf das Überleben und die Ausprägung der Tumorcharakteristika im untersuchten Kollektiv. Weder zeigte sich eine aberrante p53 Expression im Tumor oder Lymphknotengewebe als negativer Prognosefaktor, noch konnte ich einen Zusammenhang zwischen fortgeschrittener Erkrankung und dem Verlust bzw. der Mutation von p53 feststellen.

Überraschenderweise konnte ich ebenso keine Korrelation zwischen p53 und NUCKS1 Expression im PDAC-Tumorgewebe feststellen. Da beide Proteine eng mit der korrekten DNA-Replikation und einer korrekten Zellteilung bzw. der Reparatur von DNA-Strangbrüchen verbunden sind, wäre eine Co-Expression nicht überraschend gewesen.

In Lymphknotenmetastasen zeigte sich als einziger signifikanter Zusammenhang zwischen p53 Expressionsmuster (normal vs. aberrant) und NUCKS1 Expression

(hoch vs. niedrig) eine inverse Korrelation. Wenn p53 aberrant im Tumor exprimiert wurde, lag signifikant häufiger eine hohe NUCKS1 Expression in den Lymphknotenmetastasen vor. Wenn p53 „normal“ Exprimiert wurde, war die NUCKS1 Expression signifikant häufiger niedrig. Dieser Zusammenhang könnte auf einen Kompensationsmechanismus der metastasierten, p53 aberranten Zellen im Lymphknoten hinweisen, die zur Etablierung einer Fernmetastase eine gewisse DNA-Replikation aufrechterhalten müssen bzw. durch diese Eigenschaft selektioniert werden könnten. Ein direkter, molekularbiologischer Zusammenhang ist auf Grund der verschiedenen Lokalisationen eher unwahrscheinlich und erklärt so auch, warum diese Korrelation nicht im Tumorgewebe nachvollzogen werden kann.

Ähnlich dazu zeigt eine Studie von Hume et al., dass die durch DNA-Schäden induzierte p53-Antwort zu einer Verminderung von NUCKS1, sowie zum Stillstand des Zellzyklus führen kann. Einige Krebszellen können in diesen Mechanismus eingreifen und u.a. die Menge an NUCKS1 durch eine p53 Mutation erhöhen und so trotz DNA-Schäden und fehlenden Mitogenen weiterhin Zellproliferation betreiben (29).

4.3 Limitationen

Bei der vorliegenden Studie wurde eine retrospektive Analyse durchgeführt. Dabei wurden nur immunhistochemische Analysen, nicht aber genetische oder funktionale Analysen durchgeführt. Alle Patienten wurden in einem Zentrum operiert und nachbehandelt, es handelt sich als lediglich um ein unizentrisches Kollektiv. Um die Farbtintensität zu analysieren, wurde der immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner in leicht modifizierter Version durchgeführt. Diese semiquantitative, subjektive Methode ist von der Erfahrung und der Genauigkeit der Untersucher abhängig. Um die Reproduzierbarkeit in der Vorliegenden Arbeit zu steigern, wurden die Färbungen anhand der kompletten Scans der TMAs ausgewertet, so dass beide Untersucher dieselben Bedingungen vorfanden. Eine menschliche Komponente ist jedoch nur durch eine, in Zukunft sicherlich routinemäßig einsetzbare, KI-basierte Auswertung zu gewährleisten. Diese war zu Beginn der vorliegenden Arbeit jedoch noch nicht ausgereift und die Analyse daher in der vorliegenden Form durchgeführt.

Die Nutzung von FFPE-Gewebeproben zur Erstellung von TMAs birgt eigene Risiken. Zum einen ist auf Grund der Stanzgröße ein Sampling-Error bei heterogenen

Zielgewebe nicht ausgeschlossen. Zum anderen sind die Lokalisationen (Tumorzentrum, Tumorperipherie) in einem dreidimensionalen, im Paraffin eingebetteten Tumorblock nicht in tiefere Schichten übertragbar. Es kann also zu einer Fehllokalisierung oder gar zu einer Fehlbenennung der Stanzproben in tieferen TMA-Schnitten kommen. Aus diesem Grund wurde die vorliegende Arbeit von einer ausgebildeten Pathologin begleitet und auf die getrennte Auswertung von verschiedenen Tumorlokalisationen (s.o.) verzichtet.

4.4 Schlussfolgerungen

Abschließend scheint die NUCKS1 Expression im Zytoplasma des PDAC, basierend auf der vorliegenden Arbeit, am ehesten protektiver Faktor zu sein. NUCKS1 zeigte im Normalgewebe des Pankreas eine hohe Expression, dies wurde im Tumor in vielen Fällen verloren. Einen Zusammenhang mit der korrekten Funktion von p53 konnte ich nicht zeigen, wobei die vorliegenden Untersuchungen auch nur ein indirektes Bild der Expression zeigt und keine funktionalen Analysen der p53 und NUCKS1 Funktion beinhaltet.

Diese Arbeit ist die Erste, die die Expression von NUCKS1 in verschiedenen Zellkompartimenten im PDAC, sowie in assoziierten Lymphknotenmetastasen und normalem Pankreasgewebe systematisch untersucht. Die Assoziation mit p53, die als Teil der Fragestellung erwartet wurden, konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Michael Schünke u. a. Prometheus. Innere Organe: 1352 Illustrationen, 121 Tabellen. 3., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2012. 486 S.
2. Graumann W, Herausgeber. CompactLehrbuch Anatomie. 3: Innere Organsysteme: 13 Tab. / mit Beitr. v. Walther Graumann. Stuttgart: Schattauer; 2004. 552 S.
3. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009. 644 S. (Taschenlehrbuch).
4. Behrends JC, Herausgeber. Physiologie: 93 Tabellen. Stuttgart: Thieme; 2010. 830 S. (Duale Reihe).
5. Nemoda Z, Sahin-Tóth M. CHYMOTRYPSIN C (CALDECRIN) STIMULATES AUTOACTIVATION OF HUMAN CATIONIC TRYPSINOGEN. J Biol Chem. 28. April 2006;281(17):11879–86.
6. Witt H. Physiologie und Embryologie des Pankreas. Pädiatr Gastroenterol Hepatol Ernähr. 2013;547–55.
7. Kleine B, Rossmanith WG. Hormone und Hormonsystem: Lehrbuch der Endokrinologie. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum; 2014. 469 S. (Lehrbuch).
8. Huber W, Schmid RM. Akute Pankreatitis: Evidenzbasierte Diagnostik und Therapie. Dtsch Ärztebl. 2007;12.
9. Siegenthaler W, Battegay E, Aeschlimann A, Herausgeber. Siegenthalers Differenzialdiagnose: innere Krankheiten - vom Symptom zur Diagnose. 20., komplett überarb. und aktualisierte Aufl. Stuttgart New York: Thieme; 2013. 1167 S.
10. Conwell DL, Lee LS, Yadav D, Longnecker DS, Miller FH, Mortele KJ, u. a. American Pancreatic Association Practice Guidelines in Chronic Pancreatitis: Evidence-Based Report on Diagnostic Guidelines. Pancreas. November 2014;43(8):1143–62.
11. Hart PA, Bellin MD, Andersen DK, Bradley D, Cruz-Monserrate Z, Forsmark CE, u. a. Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. Lancet Gastroenterol Hepatol. November 2016;1(3):226–37.
12. Onkopedia [Internet]. [zitiert 28. April 2022]. Pankreaskarzinom. Verfügbar unter: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/pankreaskarzinom>

13. Ormanns S, Esposito I, Siveke JT, Kirchner T, Neumann J. Pathologie und Molekularpathologie des Pankreaskarzinoms. 2014;6.
14. Krebs - Bauchspeicheldrüsenkrebs [Internet]. [zitiert 1. April 2024]. Verfügbar unter:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html
15. Matthaei H, Schulick RD, Hruban RH, Maitra A. Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. März 2011;8(3):141–50.
16. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, DePinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*. 15. Mai 2006;20(10):1218–49.
17. van Lier MGF, Wagner A, Mathus-Vliegen EMH, Kuipers EJ, Steyerberg EW, van Leerdam ME. High Cancer Risk in Peutz–Jeghers Syndrome: A Systematic Review and Surveillance Recommendations. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG*. Juni 2010;105(6):1258–64.
18. Patel J, Madan A, Gammon A, Sossenheimer M, Samadder NJ. Rare hereditary cause of chronic pancreatitis in a young male: SPINK1 mutation. *Pan Afr Med J*. 4. Oktober 2017;28:110.
19. Rosen MN, Goodwin RA, Vickers MM. BRCA mutated pancreatic cancer: A change is coming. *World J Gastroenterol*. 7. Mai 2021;27(17):1943–58.
20. Petersen GM. Familial Pancreatic Adenocarcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1. August 2015;29(4):641–53.
21. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. Deutsches Ärzteblatt. 2011 [zitiert 28. April 2022]. Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie des Pankreas. Verfügbar unter:
<https://www.aerzteblatt.de/archiv/113222/Intraduktale-papillaer-muzinoese-Neoplasie-des-Pankreas>
22. Pape UF, Böhmig M, Tiling N, Wiedenmann B. Diagnostik und Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumore aus internistischer Sicht. *Onkol*. 1. Juli 2000;6(7):624–33.
23. Prídavková D, Samoš M, Kyčina R, Adamicová K, Kalman M, Belicová M, u. a. Insulinoma presenting with postprandial hypoglycemia and a low body mass index: A case report. *World J Clin Cases*. 26. September 2020;8(18):4169–76.
24. Duan S, Rico K, Merchant JL. Gastrin: From Physiology to Gastrointestinal Malignancies. *Function*. 26. November 2021;3(1):zqab062.

25. Grundt K, Haga IV, Aleporou-Marinou V, Drosos Y, Wanvik B, Østvold AC. Characterisation of the NUCKS gene on human chromosome 1q32.1 and the presence of a homologous gene in different species. *Biochem Biophys Res Commun.* 22. Oktober 2004;323(3):796–801.
26. Østvold AC, Grundt K, Wiese C. NUCKS1 is a highly modified, chromatin-associated protein involved in a diverse set of biological and pathophysiological processes. *Biochem J.* 17. Juni 2022;479(11):1205–20.
27. Drosos Y, Kouloukoussa M, Østvold AC, Havaki S, Katsantoni E, Marinos E, u. a. Dynamic expression of the vertebrate-specific protein Nucks during rodent embryonic development. *Gene Expr Patterns.* 1. Januar 2014;14(1):19–29.
28. Huang P, Cai Y, Zhao B, Cui L. Roles of NUCKS1 in Diseases: Susceptibility, Potential Biomarker, and Regulatory Mechanisms. *BioMed Res Int.* 29. Januar 2018;2018:7969068.
29. Hume S, Grou CP, Lascaux P, D'Angiolella V, Legrand AJ, Ramadan K, u. a. The NUCKS1-SKP2-p21/p27 axis controls S phase entry. *Nat Commun.* 29. November 2021;12:6959.
30. Qiu B, Han W, Tergaonkar V. NUCKS: a potential biomarker in cancer and metabolic disease. *Clin Sci.* 10. März 2015;128(10):715–21.
31. Zheng S, Ji R, He H, Li N, Han C, Han J, u. a. NUCKS1, a LINC00629-upregulated gene, facilitated osteosarcoma progression and metastasis by elevating asparagine synthesis. *Cell Death Dis.* 1. August 2023;14(8):489.
32. Zhang X, Zhang X, Li X, Bao H, Li G, Li N, u. a. NUCKS1 Acts as a Promising Novel Biomarker for the Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm.* Dezember 2023;38(10):720–5.
33. Liebl MC, Hofmann TG. The Role of p53 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers.* 28. April 2021;13(9):2125.
34. Chen X, Zeh HJ, Kang R, Kroemer G, Tang D. Cell death in pancreatic cancer: from pathogenesis to therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* November 2021;18(11):804–23.
35. Mello SS, Flowers BM, Mazur PK, Lee JJ, Müller F, Denny SK, u. a. Multifaceted role for p53 in pancreatic cancer suppression. *Proc Natl Acad Sci.* 7. März 2023;120(10):e2211937120.

36. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathol. Mai* 1987;8(3):138–40.
37. Symonowicz K, Duś-Szachniewicz K, Woźniak M, Murawski M, Kołodziej P, Osiecka B, u. a. Immunohistochemical study of nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1 in invasive breast carcinoma of no special type. *Exp Ther Med.* 1. Oktober 2014;8(4):1039–46.
38. Ziółkowski P, Gamian E, Osiecka B, Zougman A, Wiśniewski JR. Immunohistochemical and proteomic evaluation of nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate in invasive ductal carcinoma of the breast. *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:919645.
39. Shi C, Qin L, Gao H, Gu L, Yang C, Liu H, u. a. NUCKS nuclear elevated expression indicates progression and prognosis of ovarian cancer. *Tumor Biol.* 1. September 2017;39(9):1010428317714631.
40. Gu L, Xia B, Zhong L, Ma Y, Liu L, Yang L, u. a. NUCKS1 overexpression is a novel biomarker for recurrence-free survival in cervical squamous cell carcinoma. *Tumor Biol.* 1. August 2014;35(8):7831–6.
41. Yang M, Wang X, Zhao Q, Liu T, Yao G, Chen W, u. a. Combined evaluation of the expression of NUCKS and Ki-67 proteins as independent prognostic factors for patients with gastric adenocarcinoma. *Tumor Biol.* August 2014;35(8):7505–12.
42. Voutsadakis IA. Mutations of p53 associated with pancreatic cancer and therapeutic implications. *Ann Hepato-Biliary-Pancreat Surg.* 31. August 2021;25(3):315–27.
43. Wenning AS, Ryser CO, Andreou A, Gloor B, Berger MD. Neues zur Therapie des Pankreaskarzinoms: Hoffnung am Horizont? *Schweiz Gastroenterol.* 1. Dezember 2021;2(4):138–47.