

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Direktor: Prof. Dr. Christoph Röcken -

VALIDIERUNG DIFFERENZIELLER GENEXPRESSION IM
DUKTALEN PANKREASKARZINOM

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
KATJA GOJAK
aus München

Kiel, 2010

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Stefan Schreiber

Referent: Prof. Dr. Bence Sipos

Koreferent: Prof. Dr. Hendrik Ungefroren

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Vorkommen, Epidemiologie und Ätiologie	6
1.2	Pathogenese	6
1.3	Diagnostik, Therapie und Prognose	8
1.4	Hintergründe dieser Arbeit	9
1.5	Ziel der Arbeit	11
2	Material und Methoden	16
2.1	Probenkollektiv	16
2.2	Auswahlkriterien und histologische Klassifizierung	17
2.3	Gewebe- <i>Microarrays</i>	17
2.4	Methoden	19
2.5	Immunhistochemie	20
2.6	Avidin-Biotin-Methode	20
2.7	Durchführung der immunhistochemischen Färbung nach der ABC-Methode	21
2.8	Antikörper-Inkubation	23
2.9	Mikroskopische Auswertung der Immunhistochemie	24
3	Ergebnisse	26
3.1	Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung und statistischen Analyse	26
3.1.1	Ergebnisse der statistischen Auswertung für Annexin A2	26
3.1.2	Ergebnisse der statistischen Auswertung für KLK-10	30
3.1.3	Ergebnisse der statistischen Auswertung für MCM 2	35
3.1.4	Ergebnisse der statistischen Auswertung für MCM 7	39
3.1.5	Ergebnisse der statistischen Auswertung für MMP-11 (Klon SL3.05)	43
3.1.6	Ergebnisse der statistischen Auswertung für MMP-11 (Klon SPM199)	46
3.1.7	Ergebnisse der statistischen Auswertung für TMPRSS4	49

4	Diskussion	53
4.1	Immunhistochemische Analyse unterschiedlich exprimierter Gene im Pankreaskarzinom mittels Gewebe- <i>Microarray</i> Technik	54
4.1.1	Annexin A2	54
4.1.2	KLK-10	55
4.1.3	MCM 2 und MCM 7	56
4.1.4	MMP-11	58
4.1.5	TMPRSS4	59
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	63
7	Abbildungsverzeichnis	73
8	Tabellenverzeichnis	74
9	Abkürzungsverzeichnis	76
10	Anhang	77
11	Danksagung	78
12	Lebenslauf	79

1 Einleitung

1.1 Vorkommen, Epidemiologie und Ätiologie

Das Pankreaskarzinom ist nach dem Kolon- und Magenkarzinom der dritthäufigste Tumor des Verdauungstraktes. In Deutschland ist es die vierthäufigste Todesursache beim Mann und die fünfhäufigste Todesursache bei der Frau in der Krebstodesursachenstatistik. Jährlich erkranken in Deutschland etwa 10.000 Menschen an einem Krebs der Bauchspeicheldrüse [Lüttges, 2005].

Typischerweise tritt das Pankreaskarzinom im sechsten bis siebten Lebensjahrzehnt auf. Vor dem 40. Lebensjahr ist dieser Tumor extrem selten [Lowenfels, 2004].

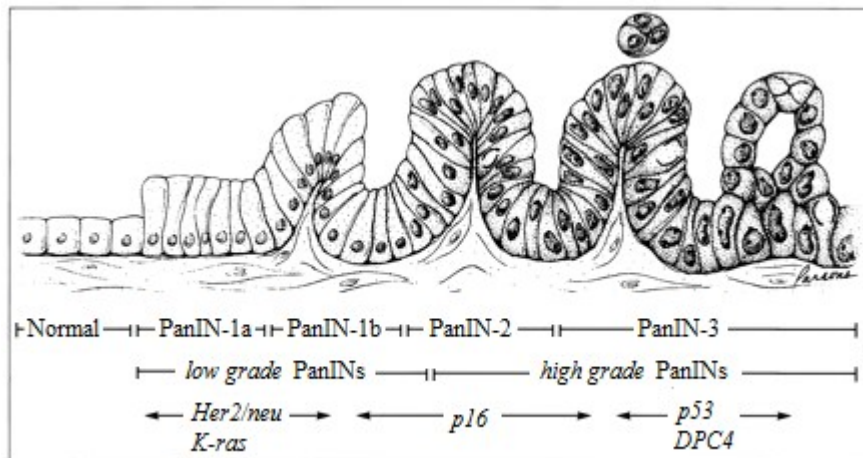
Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist bis heute unbekannt, allerdings gibt es für die Entstehung dieser Krebsart eine Reihe von gut dokumentierten Risikofaktoren. An erster Stelle ist das Alter zu nennen. An zweiter Stelle folgt das Zigarettenrauchen mit einem zwei- bis dreifach erhöhtem Risiko. Die chronische Pankreatitis unterschiedlicher Genese ist ein weiterer, wichtiger Risikofaktor [Lowenfels, 2004; Michaud, 2004]. Ausserdem sind eine lipidreiche Ernährung, übermäßiger Alkoholkonsum, Diabetes mellitus und Adipositas zu nennen [Klöppel, 1997; Michaud, 2004; Lowenfels, 2004]. Genetische Faktoren oder hereditäre Syndrome, wie das familiäre Pankreaskarzinom, sind beschrieben, jedoch sehr selten [Klöppel, 1997].

1.2 Pathogenese

In über 90% der Fälle handelt es sich beim Pankreaskarzinom um ein Adenokarzinom, welches sich aus dem Epithel der Pankreasgänge entwickelt. Diese Neoplasie wird folglich duktales Adenokarzinom (DAC) oder pankreatisches duktales Adenokarzinom (PDAC) genannt. Am häufigsten ist dieser Tumor im Pankreaskopf lokalisiert.

Die Karzinogenese des DAC ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, dass verschiedene Tumorsuppressorgene u.a. *p53*, *p16*, *dpc4* und Onkogene wie *K-ras*, *Her2/neu* an der Tumorentstehung dieses Tumors beteiligt sind [Hruban, 2000; Lüttges, 2001; Garcea, 2005]. Seit einigen Jahren ist ein Tumorprogressionsmodell bekannt, welches eine Progression vom normalen Pankreasgangepithel über verschiedene Vorläuferläsionen bis zum invasiven Adenokarzinom beschreibt. In diesem Modell von Hruban et al. aus dem Jahre 2000 wird eine kontinuierliche Häufung an Mutationen, Verlust an Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von Onkogenen beschrieben (Siehe Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell von Hruban et al. 2000).

Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell von Hruban et al. 2000



Zeichnung von Jennifer Parsons-Brumbaugh. Mit Genehmigung von R.Hruban.

Verändert nach Hruban et al. 2000; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Im Jahr 1999 entstand eine neue Nomenklatur, um die pankreatischen Vorläuferläsionen besser klassifizieren zu können [Hruban, 2001]. Es wird zwischen normalem Pankreasgangepithel und drei Gruppen von **pankreatischen, intraepithelialen Neoplasien** (PanIN) unterschieden. Die Nomenklatur unterscheidet zwischen normalen Pankreasgängen, PanIN-1a, PanIN-1b, PanIN-2 und PanIN-3 Läsionen. Die Läsionen zeigen mikroskopisch eine kontinuierliche Progression des Atypie - bzw. Dysplasiegrades [Hruban, 2000; Takaori, 2004; Zhang, 2007]. Korrelierend finden sich auch mit dem zunehmenden Dysplasiegrad vermehrt Genmutationen [Slebos, 2000, Lüttges, 2001] (Siehe Abbildung 1). Im Fall von *K-ras*-Mutationen finden sich 36% in PanIN-1a Läsionen, 44% in PanIN-1b und bis zu 87% Mutationen in PanIN-2 und PanIN-3 Läsionen [Löhr, 2005].

Das normale Pankreasgangepithel ist mit einem kubischen bis flachen Zylinderepithel ausgekleidet. Es finden sich weder muzinöses Zytoplasma noch Kernatypien. In den PanIN-1a Veränderungen werden flache epitheliale Läsionen bis hoch aufgebaute Zylinderepithelläsionen, im Sinne einer Hypertrophie, beschrieben. Hier finden sich wie im normalen Epithel keine Kernatypien. Die Zellkerne sind klein und oval bis rund geformt. Apikal findet sich häufig reichlich Muzin. Die PanIN-1b Läsionen zeigen papilläre Proliferationen und Hyperplasien. Ansonsten sind sie den PanIN-1a Veränderungen sehr ähnlich. Als PanIN-2 Läsionen werden Epithelveränderungen, die sowohl flach als auch papillärer Natur sein können, genannt. Kernaberrationen sind laut Definition immer vorhanden, jedoch selten Mitosen. PanIN-3 Fälle weisen hochgradige Dysplasien auf, häufig

papilläre Proliferationen und Mitosen. Die Kernpolarität ist aufgehoben und die Zellkerne erscheinen vergrößert. Zusätzlich sind Nekrosen und Zellausstülpungen zu beobachten [Hruban, 2001].

PanIN-1a und -1b Läsionen werden unter dem Begriff *low grade* PanINs zusammengefasst, und PanIN-2 und PanIN-3 Läsionen hingegen unter dem Begriff *high grade* PanINs.

Der Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Vorläuferläsionen und der Entwicklung eines invasiven Karzinoms ist bis heute nicht vollständig geklärt. Mehrere Studien unterstützen dieses Tumorprogressionsmodell [Lüttges, 2001; Garcea, 2005]. Sie beschreiben ein gehäuftes Vorkommen an Mutationen in PanIN-2 und PanIN-3 Läsionen, sowie kaum genetische Veränderungen in PanIN-1a und PanIN-1b Läsionen.

1.3 Diagnostik, Therapie und Prognose

Das Pankreaskarzinom ist durch das Fehlen von Frühsymptomen gekennzeichnet. Die häufigsten Symptome dieses Tumors sind ein schmerzloser Ikterus und Gewichtsverlust. Der Ikterus ist oft durch die Kompression oder direkte Tumordinfiltration des intrapankreatisch gelegenen Ductus choledochus bedingt. Der Gewichtsverlust erklärt sich infolge der katabolen Wirkung des Tumors. Das Auftreten von Schmerzen, oft gürtelförmig und besonders im Oberbauch, signalisiert häufig ein fortgeschrittenes Stadium. Diese besondere Schmerzsymptomatik ergibt sich aus der Eigenschaft des Pankreas, sich bevorzugt perineural auszubreiten. Das klinische Erscheinungsbild wird durch die Lokalisation, die Invasivität und die Größe des Tumors bestimmt. Aufgrund der retroperitonealen Lage des Pankreas und der spät auftretenden, unspezifischen Symptome wird das Karzinom oftmals erst in sehr fortgeschrittenen Stadien erkannt, was die Therapie verzögert. Wegen der frühen, lymphogenen und hämatogenen Metastasierungsneigung des Pankreaskarzinoms bestehen zum Diagnosezeitpunkt in bis zu 70 % der Fälle Lymphknotenmetastasen [Klöppel, 1997].

Um die Therapie festlegen und Prognose bestimmen zu können, muss das Tumorstadium ermittelt werden. Hierfür verwendet man die TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 31 und 32 im Anhang). Die Therapiemöglichkeiten beim Pankreaskarzinom sind jedoch nicht nur vom Tumorstadium abhängig, sondern entscheidend sind auch das Alter und der allgemeine Gesundheitszustand des Patienten. Die zur Zeit einzige mögliche kurative Therapie ist die operative Entfernung des Tumors. Chemotherapie und Strahlentherapie werden nur in Form einer adjuvanten oder neoadjuvanten Therapie durchgeführt. Als neoadjuvante Therapien werden präoperative Verfahren bezeichnet, die vor einer Operation eine Tumorverkleinerung

erreichen sollen. Als adjuvante Therapien werden Therapieformen bezeichnet, die nach der Operation angewandt werden, beispielsweise in Form einer Chemo- oder Hormontherapie. Zusätzlich stehen zur Verbesserung der Lebensqualität der Erkrankten, im Sinne einer palliativen Therapie, endoskopische Verfahren zur Verfügung, wie zum Beispiel das Einsetzen von Stents, um den weiteren Gallensaftabgang zu gewährleisten. Eine Indikation zur kurativen Operation wird bei Tumoren im Stadium I (und in Ausnahmefällen auch im Stadium II oder III) sowie bei Papillenkarzinomen gestellt. Die Operation der Wahl ist die partielle Pankreatektomie. Nur 10-20 % der Patienten kommen überhaupt für eine chirurgische Resektion in Frage [Logsdon, 2003; Neoptolemos, 2004; Wray, 2005; Garcea, 2005]. Diese radikale Operation hat eine operative Letalität von 5-10 %, was als relativ hoch einzuschätzen ist [Koopmann, 2004]. Die Letalität des duktales Adenokarzinoms liegt somit im ersten Jahr nach Diagnosestellung bei über 90 %. Die fünf-Jahres-Überlebenszeit beträgt seit mehreren Jahren unter 5 % [Wray, 2005]. Bei palliativen Maßnahmen beträgt die mittlere Überlebenszeit sechs bis neun Monate. Betroffene, die keine Lymphknotenmetastasen vorwiesen und bei denen eine R0-Resektion möglich war, haben eine mittlere Überlebenszeit von ca. 32 Monaten, die fünf-Jahres-Überlebenszeit steigt dann auf bis zu 40 % [Yeo, 1995]. Inzidenz und Mortalität sind beim Pankreaskarzinom demzufolge nahezu identisch [Lowenfels, 2004].

1.4 Hintergründe dieser Arbeit

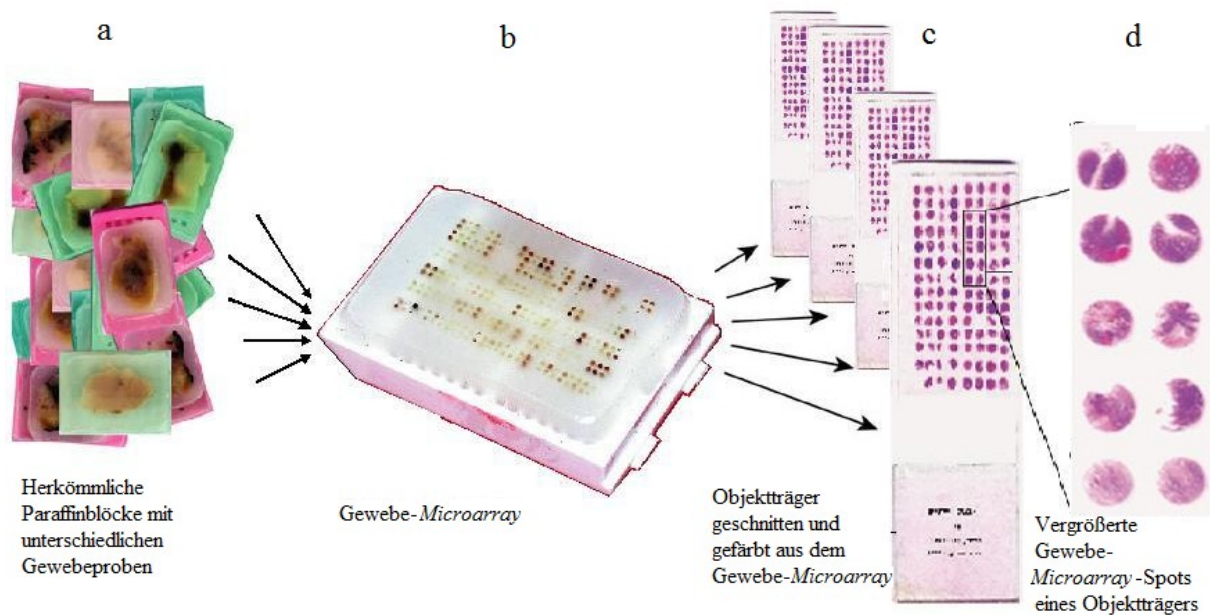
Diese Arbeit basiert auf einem Verbundprojekt zwischen dem Universitätsklinikum Carl Gustav Carus in Dresden und dem Universitätsklinikum Schleswig-Holstein. Aus diesem Verbundprojekt wurde im Jahr 2004 von Grützmann et al. die Arbeit: „*Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays*“ (Genexpressionsanalyse aus mikrodisezierten pankreatisch duktales Adenokarzinomen, die mit Hilfe der DNA-Microarray Technologie untersucht wurden) publiziert. Das Ziel dieser Arbeit war es, Genexpressionsprofile aus mikrodiseziertem Pankreasgewebe an Hand der Gewebe *Microarray* Technologie zu untersuchen. Grützmann et al. 2004 publizierten mittels dieser Arbeit eine Liste mit über 600 unterschiedlich exprimierten Gene für das duktales Pankreaskarzinom. Die Mikrodisektion der duktales Pankreaskarzinome war für die Gewinnung von reinen DNA/RNA-Proben aus Tumorzellen notwendig, da das Pankreaskarzinom einen sehr hohen Anteil an Fibroblasten, Entzündungszellen und Resten von normalem Gewebe hat. Mit Hilfe dieser spezifischen Probengewinnung wurde gewährleistet, dass nur normale duktales Zellen und Karzinomzellen

der Bauchspeicheldrüse untersucht wurden. Aus der gewonnenen RNA wurde ein Expressionsprofil der enthaltenen Gene erstellt.

Ein *Microarray* ist ein Glas- oder Silikon-Träger, auf dem man bis zu eine Million Proben, gitterförmig und punktgenau, aufbringen kann. Diese Technologie ermöglicht es, in einer Untersuchung zeitgleich multiple Analysen aus verschiedenen Proben durchzuführen. Zu den unterschiedlichen Array Arten gehören DNA-, Protein-, und Gewebe-Arrays.

Durch die parallele Untersuchungsmöglichkeit sind *DNA-Microarrays* zu einer der wichtigsten Werkzeuge in der Genomanalyse für die Erforschung von Genexpressionsprofilen geworden. Bei den Protein-Arrays wird das gleiche Prinzip angewandt. Auf einem Trägermaterial werden ausgewählte Proteinmengen gitterförmig und punktgenau aufgebracht (gespottet). Daraufhin wird entweder ein gereinigtes Protein, wie beispielsweise ein Antikörper, ein Proteinmix, DNA oder RNA auf die Probe gebracht. Die Testfelder, in denen keine Interaktion stattfindet, bleiben nach dem Waschen leer. Mit dieser Methode werden Protein-Protein-, Protein-DNA-, Protein-Medikamenten- und Rezeptor-Liganden-Interaktionen getestet. Protein-Arrays werden unter anderem zu diagnostischen Zwecken genutzt, wie zum Beispiel für die Erkennung von Antigenen und Antikörpern in Blutproben. Ferner können mit dieser Technik Serumprofile und Proteinexpressionsprofile erstellt werden. Bei den *Gewebe-Microarrays* werden Gewebeproben aus herkömmlichen Paraffinblöcke ausgestanzt (Abbildung 2, Siehe a) und in einem Paraffinblock zusammengesetzt (Siehe Abbildung 2: b). Dieser Paraffinblock (Abbildung 2: b) kann dann mittels konventioneller Methoden geschnitten und gefärbt werden (Abbildung 2: c und d). In Abbildung 2 ist schematisch die Entstehung eines *Gewebe Microarrays* dargestellt.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Herstellung eines Gewebe *Microarrays*



Verändert nach Kallioniemi et al, 2001

Anwendung findet diese Technik vor allem in den Bereichen der Immunhistochemie, der in situ DNA oder m-RNA Hybridisation, der Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH) und der in situ PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Polymerase Kettenreaktion) [Laboratories 2005].

Im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden kann so in einem Arbeitsschritt eine viel größere Anzahl an Proben getestet werden. Aus dem resultierenden Zeitgewinn ergibt sich der erste große Vorteil dieser Technik. Weitere Vorteile dieser relativ neuen Methode sind geringere Probenmengen, weniger Materialverbrauch, eine absolut gleiche Behandlung der gesamten Probe und eine gute Standardisierbarkeit. Von Nachteil ist, dass nur der ausgestanzte Bereich analysiert werden kann und dass die ausgestanzte Probe nicht unbedingt repräsentativ für das gesamte Gewebe sein muss.

Mit Hilfe von Gewebe-*Microarrays* ist eine effiziente Analyse auf Proteinebene möglich, was für die Suche nach tumorspezifischen molekularen Markern von großer Bedeutung ist [Kononen, 1998; Orchekowski, 2005].

1.5 Ziel der Arbeit

Die derzeit verfügbaren Tumormarker für das Pankreaskarzinom, wie zum Beispiel das CA19-9 (*Carbohydrate-Antigen 19-9*), bieten weder die Möglichkeit der Früherkennung, noch der sicheren Differentialdiagnose zur chronischen Pankreatitis oder anderen

gastrointestinalen Karzinomen [Koopmann, 2004]. Falsch erhöhte Werte treten beispielsweise bei Cholestase auf. Da es beim Pankreaskarzinom häufig durch den Tumor selbst zu einer Kompression der Gallengänge kommt, ist dieser Tumormarker zwar hinweisend für einen Gallestau, doch in keinem Fall spezifisch für das Pankreaskarzinom. Es wird deutlich, wie dringend der Bedarf für neue sensitive und spezifische Marker ist, um bessere Therapieerfolge und eine frühere Diagnosestellung beim duktalem Pankreaskarzinom zu ermöglichen.

Die Entwicklung der Genexpressionsanalyse macht es möglich, unterschiedlich exprimierte Gene in einem Gewebe zu finden. Die Identifizierung von diesen unterschiedlich exprimierten Genen ist der erste wichtige Schritt für die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten. Der zweite wichtige Schritt für die Erforschung neuer Therapieziele ist die Validierung dieser Genexpression. Das ist wichtig, weil der Nachweis eines Transkripts nicht unbedingt mit der Protein-Expression korrelieren muss. Die Instrumente, die eine solche Analyse ermöglichen, sind Antikörper. Eine dafür verwendbare Technik ist die Immunhistochemie.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, basierend auf der von Grützmann et al. 2004 publizierten Liste von über 600 unterschiedlich exprimiert beschriebenen Genen, sechs überexprimierte Gene anhand der Gewebe-*Microarray*-Technik und der Immunhistochemie zu untersuchen, um deren Expression während der Progression des Pankreaskarzinoms auf Proteinebene zu validieren.

Die Auswahl der Kandidaten erfolgte an Hand verschiedener Kriterien. Zum einen wurden als überexprimiert beschriebene Gene des Pankreaskarzinoms ausgesucht, weil hochregulierte Gene sich als Therapieziele eignen. Ausserdem war von entscheidender Bedeutung, dass die dafür nötigen Antikörper zur Anwendung in Formalin-fixiertem Gewebe verfügbar waren. Diese Voraussetzungen wurden von sechs Kandidaten: *anxa-2* (Annexin A2), *hk-10* (*Kallikrein-related peptidase 10*), *mcm2* (*Minichromosom maintenance deficient 2*), *mcm7* (*Minichromosom maintenance deficient 7*), *mmp11* (*Matrix Metalloproteinase 11*), *tmprss4* (*Transmembrane protease, Serine 4*) erfüllt (Siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der ausgewählten Gene aus der Arbeit von Grützmann et al. 2004: „Genexpressionsanalyse aus mikrodisezierten pankreatisch duktalem Adenokarzinomen, die mit Hilfe der high-density DNA-Microarray Technologie untersucht wurden“.

Gen Symbol	Gen Name	Regulation bei Grützmann et al.
<i>anxa2</i>	Annexin A2	Überreguliert
<i>hk10</i>	<i>Kallikrein-related peptidase 10</i>	Überreguliert
<i>mcm2</i>	<i>Minichromosome maintenance complex component 2</i>	Überreguliert
<i>mcm7</i>	<i>Minichromosome maintenance complex component 7</i>	Überreguliert
<i>mmp11</i>	<i>Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)</i>	Überreguliert
<i>tmprss4</i>	<i>Transmembrane protease, Serine 4</i>	Überreguliert

Diese sechs Kandidatengene wurden in dieser Arbeit auf Gewebe-Microarrays mit Hilfe von Antikörpern weiter analysiert, um herauszufinden, ob sich die veränderte Genexpression auf Proteinebene nachweisen lässt. Die Wichtigkeit dieser Prüfung besteht darin, dass bei einer spezifischen Expression auf Proteinebene neue diagnostische Marker oder Therapieangriffspunkte für das Pankreaskarzinom entwickelt werden könnten.

Anxa-2 ist ein Gen, das sich auf dem Chromosom 15 (15q21-q22) befindet [Richard, 1994]. Es kodiert für ein gleichnamiges Protein: Annexin A2. Annexine gehören zu einer calciumabhängigen, phospholipidbindenden Proteinfamilie. Sie spielen eine Rolle in der Regulierung des Zellwachstums, in Signaltransduktionswegen und bei der Regulation des Membrantransports zwischen intrazellulären Kompartimenten der Zelle [Gerke, 2002]. Annexin A2 ist zusätzlich im Zellkern für die DNA-Synthese und Zellproliferation mitverantwortlich. Das Protein Annexin A2 kommt membrangebunden in der Plasmamembran oder in endosomalen Membranen vor [Liu, 2003]. In calciumabhängigen Membrantransportprozessen, wie der Endo- und Exozytose ist Annexin A2 für die Initiation verantwortlich [Emoto, 2001]. Somit wird Annexin A2 sowohl im extra- als auch im intrazellulär Raum angetroffen. Die höchste Expression von Annexin A2 wird in epithelialen Zellen gefunden [Huang, 1986].

Hk-10 (*Kallikrein-related peptidase 10*) ist ein Gen, das sich auf dem Chromosom 19 (19q13.3-4) befindet [Polikoff, 1997]. Zur Kallikreinfamilie gehören 15 Kallikreine, die für Serinproteasen kodieren. Sie haben diverse physiologische Funktionen. Kallikreine überführen Hormone in deren aktive Form und sind in der Regulation der Blut-, Wasser- und Elektrolyt - Homöostase von Bedeutung. Eine weitere wichtige Funktion ist die Aktivierung

von Wachstumsfaktoren und Proteasen [Luo, 2003]. Kallikreine werden in verschiedenen Drüsen des Körpers sezerniert, darunter auch in der Bauchspeicheldrüse [Luo, 2003; Paliouras, 2007]. Die proteolytische Aktivität dieser Proteine wird mit der Tumordinvasion und Metastasierungsfähigkeit von Karzinomen in Verbindung gebracht [Paliouras, 2007; Emami, 2007]. Das kodierte Protein Kallikrein 10 (KLK-10) wird überwiegend zytoplasmatisch exprimiert [Borgono, 2004]. Versuche zeigen, dass Kallikrein 10 in der Kontrolle des Zellwachstums involviert ist und dass es möglicherweise als Tumorsuppressor agiert [Petraki, 2002].

An der DNA-Replikation ist der MCM-Komplex (*Mini Chromosome Maintenance complex*) beteiligt [Stoeber, 2001]. Zur MCM-Familie gehören sechs Polypeptide (MCM 2 bis MCM 7). Diese Proteine gewährleisten durch Bindung an den Chromatiden, dass jeweils nur eine DNA-Replikation pro Zellzyklus ablaufen kann [Dimitrova, 2002]. *Minichromosome maintenance deficient 2 (mcm2)* ist ein Gen, welches sich auf Chromosom 3 (3q21) befindet. Das kodierte Protein von *mcm2* (MCM 2, auch CDCL1 und BM28 genannt) ist an der Initiation der DNA-Replikation beteiligt [Mincheva, 1994]. *Mcm7 (minichromosome maintenance complex component 7)* ist ein Gen, welches sich auf dem Chromosom 7 (7q21.3-q22.1) befindet und gemeinsam mit *mcm2* in der Initiation der DNA-Replikation involviert ist [Nakatsuru, 1995]. MCM Proteine sind für den DNA-Replikationszyklus essentiell und somit im Zellkern anzutreffen [Meng, 2001]. Die Präsenz der MCM-Proteine in proliferierenden Zellen und deren Abwesenheit in differenzierten Zellen deuten auf eine Rolle als Proliferationsmarker hin [Meng, 2001].

Mmp-11 (Matrix metalloproteinase-11) befindet sich auf Chromosom 22 (22q11.2) [Levy, 1992]. Die Proteine der Matrix Metalloproteinasen (MMP) gehören zu einer Familie von proteolytischen, zinkhaltigen Enzymen. Bisher sind etwa 20 verschiedene MMP bekannt [Jones, 2004]. Aufzufinden sind diese Proteine entweder in der Zellmembran oder in der extrazellulären Matrix. In die extrazelluläre Matrix gelangen sie durch Sekretion. Hier sind sie in den Ab- und Umbau der Matrix involviert [Thierry-Mieg, 2006].

Die Proteinasen sind in der Lage, die Aktivität verschiedener Zytokine, Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren zu regulieren. Sie beeinflussen somit verschiedene physiologische Prozesse wie die Embryogenese, Proliferation und Gewebe-Remodelierung. Ausserdem wird den MMP eine Rolle in pathologischen degenerativen Prozessen beispielsweise bei Arthritis, Tumorerneuerung, Zellmigration, Zellinvasion und Apoptose zugeschrieben. Bei einer Genmutation oder Gen-Inaktivierung kann es zu einem Verlust der

strengen MMP-Kontrolle über die extrazelluläre Matrix kommen. Dieser Kontrollverlust wird für die Destruktion der extrazellulären Matrix, für die Neoangiogenese und die Tumorstreuung im neoplastischen Gewebe verantwortlich gemacht. MMP-11 Proteine sind im Zytoplasma lokalisiert [Levy, 1992].

Das humane Gen *tmprss4* (*Transmembrane Protease, Serin 4*) befindet sich auf Chromosom 11 (11q23.3) und kodiert eine Serin Protease. Das kodierte Protein ist Membran gebunden [Wallrapp, 2000]. Serinproteasen, auch Endopeptidasen genannt, sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie beispielsweise an der Gerinnung, Entzündungsprozessen und der Verdauung beteiligt. In der Tumorneogenese sind Serin Endopeptidasen und andere Proteasen für die proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix wichtig. Der enzymatischer Abbau der extrazellulären Matrix ist für die Tumorinvasion und die damit verbundene Metastasierungsfähigkeit vieler Karzinome essentiell [Wallrapp, 2000; Jones, 2008].

2 Material und Methoden

2.1 Probenkollektiv

Das Ziel dieser Arbeit war es, normales Pankreasgewebe, pankreatische intraepitheliale Neoplasien und duktale Pankreasadenokarzinome zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Pankreasresektate von 140 Patienten untersucht. Die normalen Pankreasgeweberesektate stammen aus Operationspräparaten der chirurgischen Klinik der Universitätsklinik Kiel und aus gerichtsmedizinisch gewonnenen Pankreata aus Suizidfällen, die freundlicherweise aus dem gerichtsmedizinischen Institut der Semmelweis Universität Budapest zur Verfügung gestellt wurden. Die PanIN Fälle wurden aus der Umgebung von resezierten PDAC in Pankreasresektaten aus Kiel, Budapest und aus dem pathologischen Institut des Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden gewonnen. Die PDAC Fälle stammen aus Operationspräparaten der chirurgischen Klinik der Universitätsklinik Kiel, die im Zeitraum von 1999 - 2004 gewonnen wurden und aus vier Konsilfällen aus dem Archiv von Prof. Dr. med. Günter Klöppel. Von den 58 PDAC Fällen stammen 33 von Männern und 25 von Frauen. Das Durchschnittsalter betrug 62,2 Jahre Die Informationen zu dem Resektionsrand (R), TNM und Grading (G) wurden aus den entsprechenden Histopathologischen- und Operationsberichten entnommen. Tabelle 2 bietet eine Übersicht zum PDAC-Patientenkollektiv dieser Arbeit.

Tabelle 2: Übersicht des Tumor- und Nodalstatus, Resektionsrand und Grading des DAC-Patientenkollektives dieser Arbeit

Tumorstadium (T) n = 54		Nodalstatus (N) n = 48		Resektionsrand (R) n = 52		Differenzierungsgrad (G) n = 58	
T1	1					G1	16
T2	1	N0	15	R0	42	G2	25
T3	45	N1	33	R1	10	G3	17
T4	7						

n = Anzahl; **T1** = Tumor auf den Pankreas beschränkt < 2 cm; **T2** = Tumor auf den Pankreas beschränkt > 2 cm; **T3** = Tumorausdehnung jenseits des Pankreas, ohne Infiltration des Tr. coeliacus oder A.mes.sup; **T4** = Tumorinfiltration des Tr. coeliacus oder jenseits der A.mes.sup.; **N0** = Keine regionären Lymphknoten Metastasen; **N1** = Regionäre Lymphknoten Metastasen; **R0** = Resektionsgrenzen sind histologisch tumorfrei; **R1** = Resektionsrand ist histologisch tumortragend; **G1** = gut differenziertes Karzinom; **G2** = mäßig differenziertes Karzinom; **G3** = schlecht differenziertes Karzinom.

Alle Pankreasresektate wurden im Institut für Pathologie des Uniklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel nach den Routineverfahren zugeschnitten. Die Resektionspräparate wurden routinemäßig in 10%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus den

Paraffinblöcken wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte standardgemäß mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

2.2 Auswahlkriterien und histologische Klassifizierung

Für die Erstellung der Gewebearrays wurden die HE-gefärbten Präparate gemäß der WHO-Klassifikation und an Hand der Arbeit von Lüttges et al. 2000 in gut (G1), mäßig (G2) und schlecht (G3) differenzierte duktale Adenokarzinome eingeteilt. Die PanINs wurden nach der Arbeit von Hruban et al. 2001 in Präparate mit normalen Pankreasepithelien, PanIN-1a, PanIN-1b, PanIN-2 und PanIN-3 Läsionen klassifiziert.

Von den 140 Patienten-HE-Schnitten wurden n = 102 Fälle für die Herstellung von Gewebe-*Microarrays* mit normalem Pankreasgewebe und PanINs ausgewählt. Für die Fertigung der Karzinom-Gewebearrays aus dukталen Pankreaskarzinomen wurden n = 48 Patienten mit einem guten, mäßig oder schlecht differenzierten Karzinom gefunden. In 20 Fällen wurde ein Paraffinblock, der sowohl PanINs Pankreasgänge als auch ein Karzinom enthielt, ausgewählt. Zusätzlich wurden nachträglich 60 Großflächenschnitte von elf weiteren unterschiedlichen Patienten (davon zehn zusätzliche Patienten), wegen der geringen Anzahl an PanIN-3 Läsionen für vier Antikörper (Annexin A2, KLK-10, MMP-11 und TMPRSS4) angefertigt. Diese zusätzlichen Schnitte stammen von ausgewählten Patienten-Pankreata, wo gehäuft PanIN-3 Läsionen anzutreffen waren.

In den HE-Schnitten wurden die Areale markiert, wo sich die ausgewählte Läsion befand, die in Folge ausgestanzt werden sollte.

2.3 Gewebe-*Microarrays*

Von dem vorhandenen Patientenkollektiv wurden sechs Gewebe-*Microarray* (GMA) Modelle erstellt. Vier GMA mit Gewebestanzungen von normalen Pankreasgängen, PanIN-1a, PanIN-1b, PanIN-2, und PanIN-3 Läsionen und zwei weitere GMA mit Stanzen aus dukталen Adenokarzinomen. Insgesamt wurden pro Gewebe-*Microarray* Serie (GMA-1 bis GMA-6) 290 Gewebestanzungen verwendet. Tabelle 3 bietet eine Übersicht der untersuchten Gewebe-*Microarray*-Modelle.

Tabelle 3: Übersicht der Gewebe-*Microarray*-Modelle (GMA-1 bis 6) mit der jeweiligen Anzahl und dem jeweiligen Dysplasiegrad der enthaltenen Gewebestanzten

GMA-1	GMA-2	GMA-3	GMA-4	GMA-5	GMA-6
60 Stanzen	60 Stanzen	37 Stanzen	37 Stanzen	56 Stanzen	40 Stanzen
n = 20 norm.P. n = 20 PanIN-1a n = 20 PanIN-1b	n = 20 norm.P. n = 14 PanIN-1a n = 26 PanIN-1b	n = 3 PanIN-1b n = 20 PanIN-2 n = 14 PanIN-3	N = 3 PanIN-1b n = 20 PanIN-2 n = 14 PanIN-3	n = 28 G1 n = 28 G3	n = 40 G2

GMA = Gewebe-*Microarray* ; **n** = Anzahl; **norm.P.** = normales Pankreasgewebe ; **PanIN** = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie; **G1** = gut differenziertes Karzinom; **G2** = mäßig differenziertes Karzinom; **G3** = schlecht differenziertes Karzinom.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden somit insgesamt für alle sieben Antikörper 2030 Gewebestanzten beurteilt. Im Einzelnen waren es für die normalen Pankreasgänge n = 280, für die PanIN-1a Läsionen n = 238, für die PanIN-1b Läsionen n = 364, für die PanIN-2 Läsionen n = 280, für die PanIN-3 Läsionen n = 196 und für das DAC n = 672. Durch das Schneiden der Paraffinblöcke für die Herstellung der einzelnen Gewebe-*Microarrays* kam es, durch die daraus resultierenden unterschiedlichen Schnittebenen, zu einem Verlust von Gewebestanzten (Array-Spots). Im Fall der PanINs variierte somit die Anzahl der tatsächlich ausgewerteten und klassifizierten Fälle. Diese Abweichung ergab sich, da sich im jeweiligen Spot entweder kein relevantes Gewebe durch Abschwimmen der Proben befand oder mehrere unterschiedlich klassifizierbare Pankreasgänge in einem Array-Spot oder ein Pankreasgang einer höheren oder niedrigeren PanIN Gruppe befanden. Zur Verdeutlichung folgendes Beispiel: In einem Spot befanden sich eine PanIN-1a und eine PanIN-1b Läsion, dann wurden beide Immunreaktiven Scores (IRS) jeweils getrennt gewertet und dokumentiert.

Diese Gegebenheit führte im Fall der PanINs und des normalen Pankreasgewebes zu einer Schwankung der Gesamtanzahl und somit der ausgewerteten Spots.

Aufgrund der mangelnden PanIN-3 Fälle für Annexin A2, KLK-10, MMP-11 und TMPRSS4 kamen 60 zusätzliche Pankreasschnitte dazu. Diese Änderungen wirkten sich, wie in der Tabelle 4 aufgezeichnet, innerhalb der untersuchten Gruppen aus.

Tabelle 4: Gesamtanzahl (n = 1254) der ausgewerteten Gewebestanzten dieser Arbeit pro Dysplasiegrad Gruppe

Normalgänge	PanIN-1a	PanIN-1b	PanIN-2	PanIN-3	DAC
n = 231	n = 219	n = 306	n = 119	n = 48	n = 331

n = Anzahl; **DAC** = duktales Adenokarzinom; **PanIN** = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Im Vergleich zu den PanINs und normalen Pankreasgewebe kam es im Fall der PDAC zu einem geringeren Verlust an brauchbaren, auszuwertenden Gewebestanzungen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Adenokarzinome zu haben, wurden pro Fall (Patient) jeweils zwei Stanzungen angefertigt, sodass es bei 48 Patienten dementsprechend 96 Gewebestanzungen gab. Für die statistische Auswertung musste deswegen der Mittelwert beider zugehörigen Gewebestanzungen pro Patient ermittelt werden. Im Falle von einem ungültigen Immunreaktivitäts-Score (IRS) wie z.B. IRS = 5, der sich bei einem Mittelwert bei einem IRS 4 und IRS 6 ergeben würde, wurde der IRS aufgerundet. In diesem Beispiel dann IRS = 6. Insgesamt wurden 336 Gewebestanzungen aus duktalem Adenokarzinomen in die statistische Auswertung eingebracht.

2.4 Methoden

Um die Gewebe-*Microarray* Paraffinblöcke herzustellen, wurde ein *Manual Tissue Arrayer*, MTA-1 (Beecher Instruments) benutzt. Zunächst wird ein leerer Paraffinblock im MTA-1 positioniert. Aus diesem Paraffinblock werden nach dem festgelegten GMA-Modell mit genau definierten Koordinaten Stanzungen entnommen, sodass er später als Empfängerblock genutzt werden kann. Diese Prozedur wurde an sechs leeren Paraffinblöcken für jedes der sechs GMA-Modelle wiederholt.

Im nächsten Schritt wird einer der ausgesuchten tumortragenden Pankreas-Paraffinblöcke im MTA-1 befestigt. Das dazugehörige HE-Präparat wird auf dem befestigten Paraffinblock genau überlappend aufgelegt. So kann aus dem zuvor markierten Areal des HE-Präparates die Stanzposition mit Hilfe der Mikrometerschraube exakt justiert werden. Das HE-Präparat wird als nächstes entfernt, um aus dem tumortragenden Paraffinblock in der justierten Position, eine Stanze zu entnehmen. Diese Stanze wird dann in die vorgegebene Position des entsprechenden Empfängerblocks eingefügt.

Diese Prozedur wird für jedes Präparat wiederholt. Der fertige GMA-Paraffinblock kann nun wie üblich weiterverarbeitet werden.

Diese Technik ist ursprünglich 1987 von Wan, Fortuna und Furmanski im '*Journal of Immunological Methods*' beschrieben worden [Wan, 1987]. Jedoch wurde diese Technologie erst durch die Aktivitäten von Kononen und Mitarbeitern nach ihrer Publikation 1998 in '*Nature Medicine*' bekannt [Kononen, 1998].

2.5 Immunhistochemie

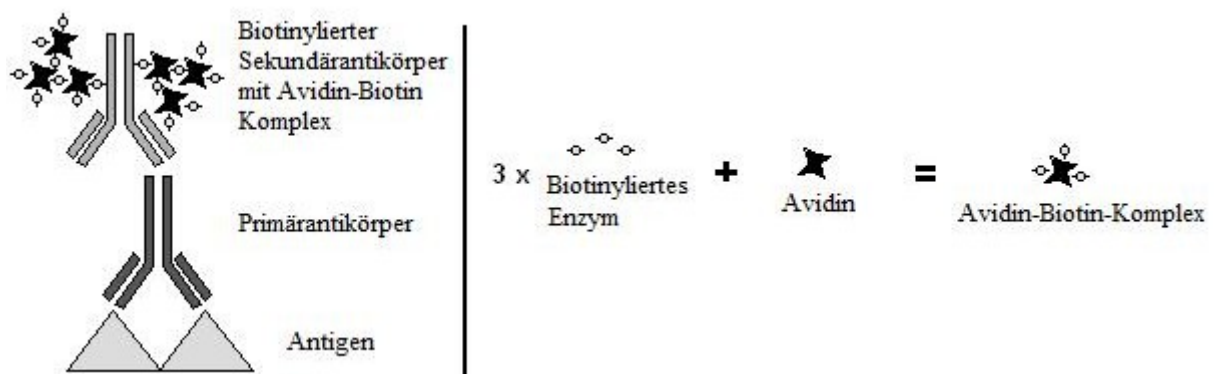
Für diese Arbeit wurde die Immunhistochemie als Färbetechnik ausgewählt. Die Immunhistochemie beruht auf der Fähigkeit von Antikörpern an bestimmte Gewebemoleküle (Epitope) zu binden. Epitope sind Moleküle, wie zum Beispiel Proteine, die wenn sie mit dem komplementären Protein auf dem Antikörper (Paratop) in Kontakt kommen, zu einer spezifischen Bindung führen. Es entsteht die Antigen-Antikörper-Bindung. Diese Bindungsreaktion wird in der Immunhistochemie mittels zusätzlicher Färbereaktionen sichtbar gemacht.

Für diese Arbeit wurden polyklonale und monoklonale Antikörper benutzt. Polyklonale Antikörper binden an verschiedene Epitope eines Antigens. Monoklonale Antikörper binden nur an ein einzelnes Epitop eines Antigens.

2.6 Avidin-Biotin-Methode

Für die immunhistochemische Färbung wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) angewandt. Im ersten Schritt kommt es nach Zugabe eines Primärantikörpers zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem komplementären Antigen determinanten des Gewebeschnittes. An den Primärantikörper bindet dann ein biotinylierter Sekundärantikörper, welcher spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Auf dem biotinylierten Antikörper binden wiederum Avidin-Biotin Komplexe. Eine im ABC enthaltene Peroxidase, reagiert mit einem Chromogensubstrat (Diaminobenzidin) zu einem bräunlichen Komplex. In der Abbildung 3 ist diese Methode graphisch dargestellt.

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Avidin-Biotin-Komplexes



Verändert nach Boenisch, 2003

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs Primärantikörper für die immunhistochemische Färbung angewandt: Annexin A2, KLK-10, MCM 2, MCM 7, MMP-11 und TMPRSS4. Aus der Tabelle 5 können Daten zur Herkunft, Bestellnummer, Klon und Klonalität der jeweiligen Antikörper und des Peptids entnommen werden.

Die Färbung mit dem Antikörper MMP-11 wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern durchgeführt, da die Färbeargebnisse nicht mit der Literatur übereinstimmten.

Im Fall von KLK-10 wurde zur Spezifitätskontrolle eine Peptidkompetition durchgeführt. Durch die Inkubation mit einem Peptid, das spezifisch gegen den Antikörper KLK-10 gerichtet ist, wird die Bindungsstelle für das Antigen im Gewebe blockiert, so dass keine Färbung erfolgen kann. Die KLK-10 Färbung galt demnach als spezifisch, wenn die Peptid-Kontrollfärbung keine Farbreaktion zeigte.

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Firma	Bestell-Nr.	Klon	Klonalität
Annexin A2	Santa Cruz	sc-9061 (H-50)		Kaninchen polyklonal
KLK10 G-15	Santa Cruz	Sc-20386 (G-15)		Ziege polyklonal
KLK10- Peptid	Santa Cruz	sc-20386P (G-15)		
MCM 2	Novocastra	NCL-MCM2	CRCT2.1	Maus monoklonal
MCM 7	Abcam	Ab2360	47DC141	Maus monoklonal
MMP-11	Diagnostic Biosystems / Bioscience	Mob 393	SL3.05	Maus mooklonal
MMP-11	AnaSpec	53669	SPM199	Maus monoklonal
TMPRSS4	Atlas Antibodies	HPA 6238		Kaninchen polyklonal

2.7 Durchführung der immunhistochemischen Färbung nach der ABC-Methode

Für die Immunhistochemie wurden aus den Gewebe-Array-Paraffinblöcken 3 µm dicke Schnitte mit Hilfe eines Rotationsmikrotom (LEICA RM2145) hergestellt. Nach Ausdehnung und Glättung der Schnitte in einem Wasserbad bei Raumtemperatur wurden die Schnitte auf beschichtete SuperFrost®Plus Objektträger (Artikelnummer (AN): J1800AMNZ, Menzel-Gläser, Deutschland) aufgezogen. Daraufhin wurden die Präparate über Nacht in einem Wärmeschrank (Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach) bei 60°C getrocknet.

Zur Entparaffisierung wurden die Schnitte zwei Mal für 15 Minuten in Xylol gelassen. Die Präparate wurden dann durch eine absteigende Alkoholreihe mit 100 % - 96 % - 96 % - 70 % - 70 % rehydriert und abschließend mit destilliertem Wasser und einem TBS – Waschpuffer (9 g TRIZMA-Base (AN: T1503, Sigma), 68,5 g TRIZMA-Hydrochloride (AN: T3253, Sigma), 87,8 g Natriumchlorid (AN: 0278, J.T.Backer) und 10 Liter destilliertem Wasser) gewaschen.

Eine Antigen-Demaskierung erfolgte im Dampfkochtopf (Fissler GmbH, Idar-Oberstein) in einer 1000 ml TEC-Lösung (0,25 g **T**RIZMA-Base (AN: T1503, Sigma), 0,5 g **E**DTA (Titriplex, AN: 1.08418.1000, Merck), 0,32 g Tri-Natrium**c**itrat-Dihydrat (AN: 1.06448.0500, Merck, 1000 ml destilliertem Wasser bei einem pH-Wert von 7,8) bei kochender Lösung für 3-10 Minuten.

Die Erhitzung der Präparate im Kochtopf bewirkt eine Demaskierung der Antigene, sodass das Färbeergebnis optimiert wird.

Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser abgekühlt. Danach wurden sie durch eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum 96%igem Alkohol geführt und somit dehydriert.

Um eine Reaktion der physiologisch im Gewebe vorkommenden Peroxidase mit dem DAB-Substratkit (3,3'-**D**i-**A**mino**b**enzidine) zu vermeiden, wurden die Schnitte für 15 Minuten in 200 ml Methanol (AN: 8045, J.T.Backer) mit 4 ml 30%igem Wasserstoffperoxid (Perlhdyrol, AN: 1.07210.0250, Merck) inkubiert. So wird die endogene Peroxidase geblockt und es entstehen keine Hintergrundfärbungen.

Anschließend wurden die Präparate durch die absteigende Alkoholreihe geführt und letztlich drei Mal mit frischem TBS-Waschpuffer gewaschen.

Um unspezifische Reaktionen sowie Kreuzreaktionen zu vermeiden, wurden die Schnitte im nächsten Schritt mit dem Normalserum des Tieres, aus welchem die Sekundärantikörper stammen, inkubiert. Die jeweiligen Maus-Primärantikörper wurden für 20 Minuten in 4%igem Milchpulver (AN: T145.1, Roth) mit 15 µl je ml des entsprechenden Normalserums (Bestandteil des Vectastain Standard ABC-Kit (AN: 8P-2001, Vector) inkubiert. Im Falle der Primärantikörper, die aus der Ziege stammen, wurden diese mit PBS (**P**hosphat **B**uffered **S**aline, AN: L182-10, Biochrom AG) und 4%igem **D**onkey-**N**ormal-**S**erum (DNS; AN: 017-000-121, Jackson Immuno Research) mit 40 µl DNS je ml inkubiert.

Die Inkubation des Serums sowie alle weiteren Schritten erfolgten immer in einer feuchten Kammer. Das überschüssige Serum wurde nach der Inkubationszeit abgeklopft.

2.8 Antikörper-Inkubation

Im nächsten Schritt konnte die Inkubation mit dem Primärantikörper beginnen. Für 45 Minuten wurde der zuvor mit 2%-igem Milchpulver gemischte Primärantikörper in der jeweiligen Konzentration inkubiert. Bei der ABC-Färbung (Avidin-Biotin-Complex-Färbung) für Ziegen-Antikörper wurde der Primärantikörper in 2 % Donkey-Normal-Serum, mit 20 µl DNS je ml, für 45 Minuten inkubiert. Die restliche Lösung wurde nach Ablauf der Zeit abgeklopft. Die jeweiligen Konzentrationen der Antikörper sowie die Verdünnung sind aus der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Vorbehandlung, Verdünnung, Färbemethode und Konzentration der verwendeten Antikörper

Antikörper	Vorbehandlung	Verdünnung	Konzentration	Färbemethode	Positiv Kontrolle
Annexin A2	KT 10 Min.	1:100	2 µg/ml	ABC mit PBS	Pankreas Normal
KLK-10 G-15	KT 3 Min.	1:300	0,6 µg/ml	ABC mit Vectastain	Plattenepithel - CA Mund
KLK-10 Peptid	KT 10 Min.	1:20	10 µg/ml	ABC mit PBS	Pankreas Normal
MCM 2	KT 3 Min.	1:10	-	ABC mit Vectastain	Tonsille
MCM 7	KT 3 Min.	1:50	2 µg/ml	ABC mit Vectastain	Mamma-CA
MMP-11	KT 3 Min.	1:50	-	ABC mit Vectastain	Plazenta
MMP-11	KT 3 Min.	1:50	-	ABC mit Vectastain	DAC
TMPRSS4	KT 3 Min.	1:60	3,3 µg/ml	ABC mit Vectastain	DAC

„ - “ = Konzentration von der Firma nicht angegeben; **ABC** = Avidin-Biotin-Komplex Methode; **CA** = Karzinom; **DAC** = duktales Adenokarzinom des Pankreas; **KT** = Kochtopf; **Min.** = Minuten; **PBS** = *Phosphat Buffered Saline*

Die Sekundärantikörper anti-Maus IgG (AN: PK-6102, Vector) und anti-Kaninchen IgG (AN: PK-6101, Vector) wurden in 2%-igem Milchpulver mit 5 µl Sekundärantikörper je ml mit dem Vectastain Standard ABC-Kit detektiert. Im Falle der ABC-Färbung mit Ziegen-Antikörper, wurde der Sekundärantikörper mit 2%-igem DNS mit 5 µl *Donkey Anti-Goat* (AN: 705-065-147, Jackson Immuno Research) je ml für jeweils 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die verbleibende Lösung von den Objektträgern abgeklopft.

Nach einer halben Stunde Vorinkubation wurden je 10 µl pro ml ABC (Elite, AN: PK-6100, Vector) in jeweils 2%-igem Milchpulver oder PBS-Lösung, für jeweils 30 Minuten auf die

Präparate gebracht. Im nächsten Schritt wurde vom DAB-Substratkit (AN: 8K-4100, Vector) je 20 µl pro ml destilliertes Wasser für 7 Minuten auf die Proben gebracht. Zunächst wurde vom vorher gemischten DAB-Substratkit der Puffer, dann das DAB und zum Schluss die Hydrogen-Peroxidase benutzt. Im vorletzten Schritt erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun (AN: 1.09249.0500, Merck), 1:4 verdünnt.

Abschließend wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol geführt und mit Pertex (AN: PER40000 medite) eingedeckelt.

2.9 Mikroskopische Auswertung der Immunhistochemie

Alle Gewebe-*Microarrays* wurden mit einem Olympus BH-2 Mikroskop in vierhundertfacher Vergrößerung ausgewertet. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte qualitativ auf das Vorhandensein von immunreaktiven Zellen. Als positiv galten die Zellen, welche eine ausreichende und gleichmäßige Färbung des Zytoplasmas oder Zellkerns, je nach Antikörper zeigten. Die Beurteilung der Präparate erfolgte immer mit Berücksichtigung der histologischen Klassifizierung für PanINs und des pankreatischen duktales Adenokarzinoms nach den Arbeiten von Hruban et al. 2001 und Lüttges et al. 2000. Zur Bewertung des Färbeergebnisses wurde der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner benutzt. Für jeden Spot wurde die Farbintensität (schwach, mittel oder stark) und der Anteil an positiv gefärbten Zellen ermittelt. Ein IRS wurde bei einer positiven Farbreaktion des Zytoplasmas oder des Zellkerns, je nach Antikörper, nur für PanINs oder für das duktales Adenokarzinom ermittelt. Bei zusätzlichen Beobachtungen, wie zum Beispiel Farbreaktionen der Azinuszellen oder des Stromas, wurden diese sorgfältig notiert, ein IRS wurde jedoch nicht vergeben. Nach Ermittlung der Farbeintensität für die ausgewählten Zellregionen einer Stanze wurde für die Bezeichnung „schwach“ ein IRS = 1 vergeben, bei einer mäßigen Farbreaktion ein IRS = 2 und bei einer starken Anfärbung der Zellen ein IRS = 3. Für den Anteil an immunreaktiven Zellen wurde prozentual ein IRS von <10 % ein IRS = 1, zwischen 11-50 % ein IRS = 2, zwischen 51-80 % an reaktiven Zellen wurde ein IRS = 3 und bei über 81 % an reaktiven Zellen ein IRS = 4 vergeben. Die Punktevergabe für Farbintensität und Anteil an positiven Zellen ist in Tabelle 7, schematisch dargestellt. Für die Ermittlung des IRS wird dann die Farbeintensität, mit einem Score zwischen 0 und maximal 3, mit dem Anteil an positiv gefärbten Zellen, mit einem Score zwischen 0 und 4, multipliziert. Es resultiert ein Immunreaktiver Score von 0 bis 12.

Tabelle 7: Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner

Punkte	Färbeintensität	Anteil positiver Zellen
0	Keine Anfärbung	0%
1	Schwach	< 10%
2	Mäßig	11-50%
3	Stark	51-80%
4	-	81%-100%

Während der Auswertung wurden mit der Digitalkamera Leica DFC 280 Aufnahmen zu Dokumentationszwecken angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung und statistischen Analyse

Von insgesamt 140 Patienten wurde ein Kollektiv von 290 Stenzen pro Gewebe-*Microarray*-Serie ausgewertet. Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden für die Antikörper Annexin A2, KLK-10, MCM 2, MCM 7, MMP-11 und TMPRSS4 der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) für die jeweiligen Spannweiten (SPW) pro Gruppe ermittelt.

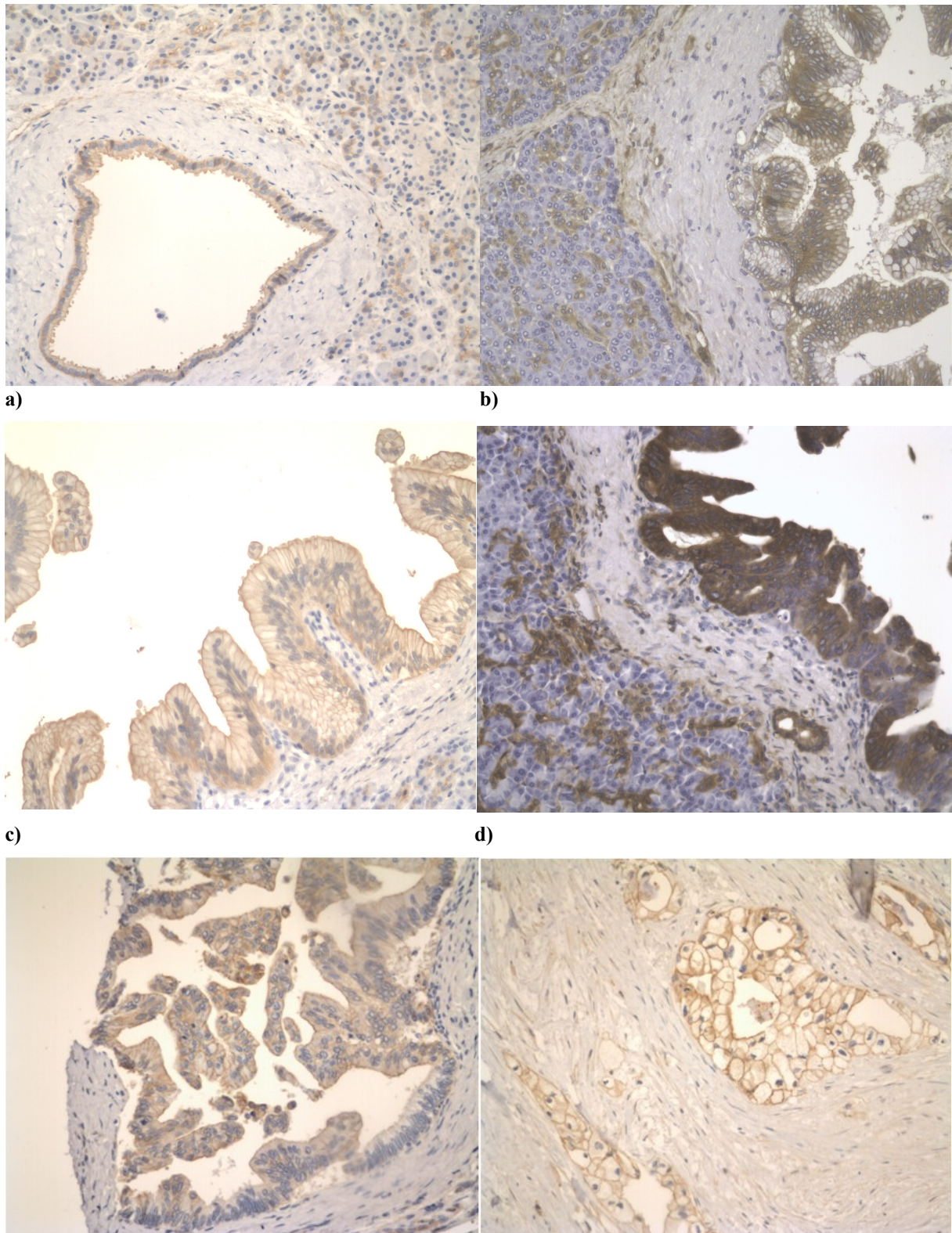
Für die statistische Auswertung wurde Software von Microsoft Excel 2002 und SPSS (Statistical Package for the Social Sciences for Windows, Version 12.0) zu Hilfe genommen. Bei der Auswahl der Testverfahren wurde berücksichtigt, dass der Typ der Verteilung nicht bekannt ist und dass eine Normalverteilung der Daten wahrscheinlich nicht gegeben ist, sodass zwei nicht-parametrische Testverfahren, der Kruskal-Wallis (H-Test) und Mann-Whitney Test (U-Test), angewandt wurden. Beide Testverfahren basieren auf der Bildung von Rangsummen. Hierfür werden alle Originaldaten nach der Größe geordnet und Rangreihen gebildet. Anschließend wird diese Rangreihenliste wieder der zugehörigen Stichprobe zugeteilt. Mit dem Mann-Whitney-Test kann die Signifikanz der Übereinstimmung von zwei unabhängigen Verteilungen überprüft werden. Mit dem Kruskal-Wallis-Test können mehrere verschiedene, unabhängige, nicht-normalverteilte Stichproben, die sich bezüglich einer ordinalskalierten Variablen unterscheiden, verglichen werden.

Die Ergebnisse wurden als signifikant bezeichnet, wenn der resultierende p-Wert des angewandten Tests kleiner oder gleich 0,001 war.

3.1.1 Ergebnisse der statistischen Auswertung für Annexin A2

Die immunhistochemische Lokalisation von Annexin A2 wurde in sechs Gewebe-*Microarrays* und zwölf Pankreas Paraffinschnitte untersucht. Für die Auswertung bestand eine Gesamtanzahl von 171 Gewebestanden (siehe Tabelle 8). Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung für die normalen Pankreasgängen, PanIN-1 bis PanIN-3 und das duktales Adenokarzinom sind in Tabelle 9 und Abbildung 5 graphisch dargestellt. Annexin A2 zeigte eine vorwiegend intrazytoplasmatische und teilweise membrangebundene Färbung. Azinuszellen zeigten vereinzelt, Fibroblasten oder Langerhansinseln zeigten keine positive Farbreaktion (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Ausgewählte Gewebe-Microarray-Ausschnitte gefärbt mit dem Antikörper Annexin A2



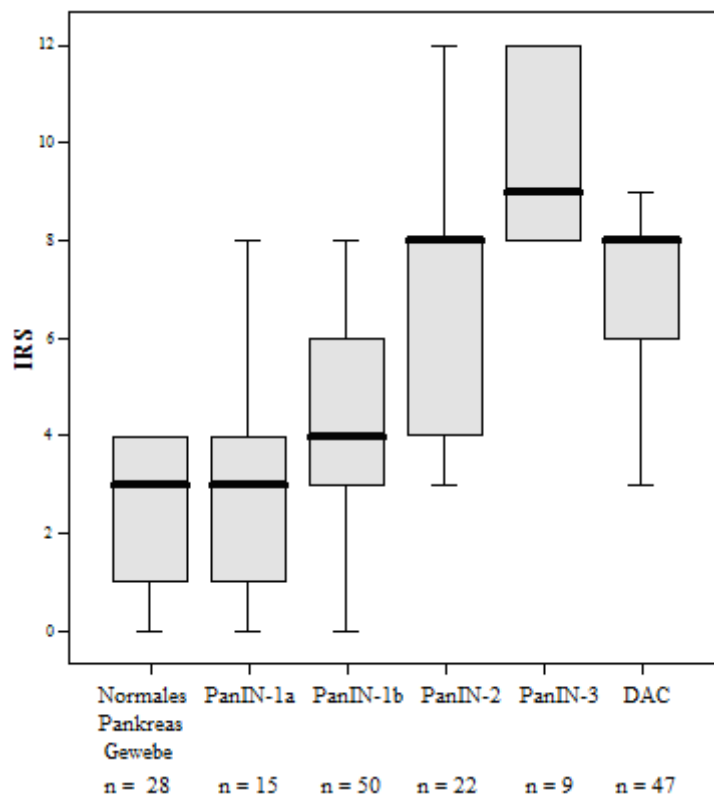
a) Normales Pankreasgewebe, **b)** PanIN-1a mit Übergang in PanIN-1b. Schwache Expression in den Pankreas-Gangzellen und mäßig starke Expression in den Azinuszellen (100fache Vergrößerung). **c)** PanIN-1b, schwache Expression in den Gangzellen (400fache Vergrößerung). **d)** PanIN-2 in 400facher Vergrößerung. Starke Expression in den Gangzellen. **e)** PanIN-3. Schwache, vereinzelt starke Expression von Annexin A2 in den Gangzellen (100fache Vergrößerung). **f)** Duktales Pankreasadenokarzinom in 400facher Vergrößerung. Membranständige mittelstarke Anfärbung, vereinzelt positive Farbexpression in Fibroblasten.

Tabelle 8: Detailansicht der Anzahl von untersuchten *Microarray* Gewebestanzeln für die verschiedenen Gruppen die mit Annexin A2 gefärbt wurden

Gruppen	Anzahl
Normale Pankreasgänge	28
PanIN-1a	15
PanIN-1b	50
PanIN-2	22
PanIN-3	9
DAC	47
Gesamt Anzahl	171

DAC = duktales Adenokarzinom, PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Abbildung 5: Immunreaktiver Score für die unterschiedlichen Gruppen gefärbt mit Annexin A2



DAC= duktales Pankreas Adenokarzinom, IRS = Immunreaktiver Score,

n = Anzahl, PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Bei der mikroskopischen Auswertung ergab der Immunreaktive Score (IRS) für Annexin A2 im normalen Pankreasgewebe einen Mittelwert von 4,96 (SPW: IRS 0 bis 4; SD = 1,57). Für die PanIN-1a Läsionen einen Mittelwert von 2,86 (SPW: IRS 0 bis 8; SD = 2,09). Die PanIN-

1b Läsionen ergaben einen Mittelwert von 4,5 (SPW: IRS 0 bis 8; SD = 2,4). Für PanIN-2 einen Mittelwert von 6,77 (SPW: IRS 3 bis 12; SD = 2,24). Die PanIN-3 Läsionen ergaben einen Mittelwert von 9,55 (SPW: IRS 8 bis 12; SD = 1,77). Für das DAC errechnete sich ein Mittelwert von 7,12 (SPW: IRS 2 bis 12; SD = 2,48). (Siehe Abbildung 5).

Die Abbildung 5 zeigt eine unterschiedliche Varianz des IRS für die unterschiedlichen Gruppen. Die Expression des Antigens war signifikant unterschiedlich im Kruskal-Wallis-Test mit $p < 0,001$ für die verschiedenen Gruppen (siehe Tabelle 9). Bei Betrachtung der Ränge wird deutlich, dass der mittlere Rang stetig zunimmt mit Ausnahme des DAC's (siehe Tabelle 9). Annexin A2 wurde in den *high grade* PanINs signifikant stärker exprimiert als in den normalen Pankreasgängen und den *low grade* PanINs, was im Mann-Whitney-U-Test mit einem $p < 0,001$ deutlich wird (siehe Tabelle 10). Der Vergleich zwischen dem duktalem Pankreas Adenokarzinom und den normalen Pankreasgängen zeigt im Mann-Whitney-U-Test ein $p < 0,001$, was einen starken signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen darlegt. Der Vergleich zwischen normalen Pankreasgängen und dem DAC ist in Tabelle 11 zu sehen.

Tabelle 9 : Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Test für Annexin A2

Kruskal Wallis Test – Annexin A2		
Gruppen	Anzahl	Mittlerer Rang
Normale Pankreasgänge	28	39,34
PanIN-1a	15	45,23
PanIN-1b	50	73,47
PanIN-2	22	111,70
PanIN-3	9	150,33
DAC	47	115,79
Gesamt	171	
p-Wert < 0,001		

DAC = duktales Adenokarzinom; **PanIN** = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Tabelle 10: Mann-Whitney-U-Test für Annexin A2: Normale Pankreasgänge und *low grade* PanINs versus *high grade* PanINs

Mann-Whitney-U-Test: Gruppe 1 vs. Gruppe 2		Anzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gruppe 1	Normale Gänge und <i>low grade</i> PanINs	93	51,11	4753
Gruppe 2	<i>high grade</i> PanINs	31	96,68	2997
		124		
p-Wert < 0,001				

vs.= versus, *low grade* PanINs = PanIN-1a und PanIN-1b, *high grade* PanINs = PanIN-2 und PanIN-3;

PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Tabelle 11: Mann-Whitney-U-Test für Annexin A2: Normale Pankreasgänge versus duktales Pankreaskarzinom

Mann-Whitney-U-Test Gruppe 1 vs. Gruppe 2		Anzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gruppe 1	Normale Pankreasgänge	28	17,48	489,5
Gruppe 2	DAC	47	50,22	2360,5
		75		
p-Wert < 0,001				

vs.= versus, DAC = duktales Adenokarzinom; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

3.1.2 Ergebnisse der statistischen Auswertung für KLK-10

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die immunhistochemische Lokalisation für Kallikrein-10 (KLK-10) in 162 Gewebestanden aus sechs Gewebe-*Microarrays* und zwölf Pankreas Paraffinschnitte ausgewertet. Die Antikörperfärbung mit KLK-10 wurde vorwiegend zytoplasmatisch in den Epithelzellen der Pankreasgänge beobachtet. Die Färbung des Antikörpers ist insgesamt als schwach zu bezeichnen. Langerhansinseln zeigten eine schwache aber konstante positive Farbreaktion. Azinuszellen sowie Stromazellen wurden nicht vom Antikörper gefärbt. Teilweise wurde eine membrangebundene Expression des Antikörpers beobachtet. Die Anzahl der unterschiedlichen Gruppen ist in Tabelle 12 und die Auswertung des immunreaktiven Score für KLK-10 in Abbildung 6 zu sehen. In keinem der normalen Pankreasgänge, PanIN-1a und PanIN-1b Läsionen wurde ein $IRS \geq 6$ beobachtet. In den dysplastischen PanIN-2 wurden in 2 von 12 Fällen (16,7 %), in den PanIN-3 in 3 von 8

Fällen (37,5 %) und im DAC in 27 von 47 Fällen (57,4%) ein IRS ≥ 6 beobachtet. (Siehe Abbildung 6).

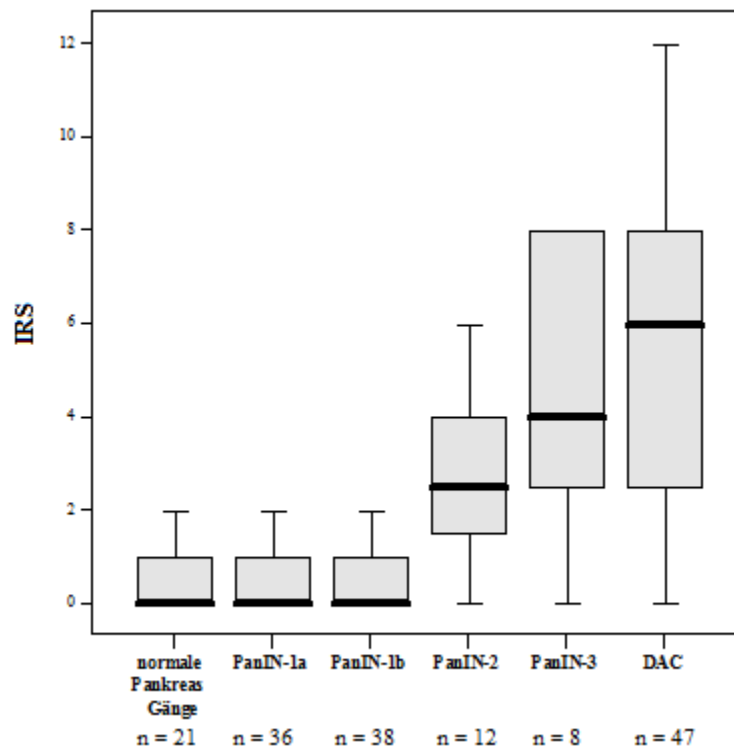
Nach der Peptidkompetition mit dem KLK-10 Peptid war kein Signal zu sehen, was auf eine spezifische Bindung des Antikörpers hinweist (siehe Abbildung 7).

Tabelle 12: Detailansicht der untersuchten *Microarray* Gewebestanzten für die verschiedenen Gruppen gefärbt mit KLK-10

Gruppen	Anzahl
Normale Pankreasgänge	21
PanIN-1a	36
PanIN-1b	38
PanIN-2	12
PanIN-3	8
DAC	47
Gesamt Anzahl	162

DAC = duktales Adenokarzinom; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

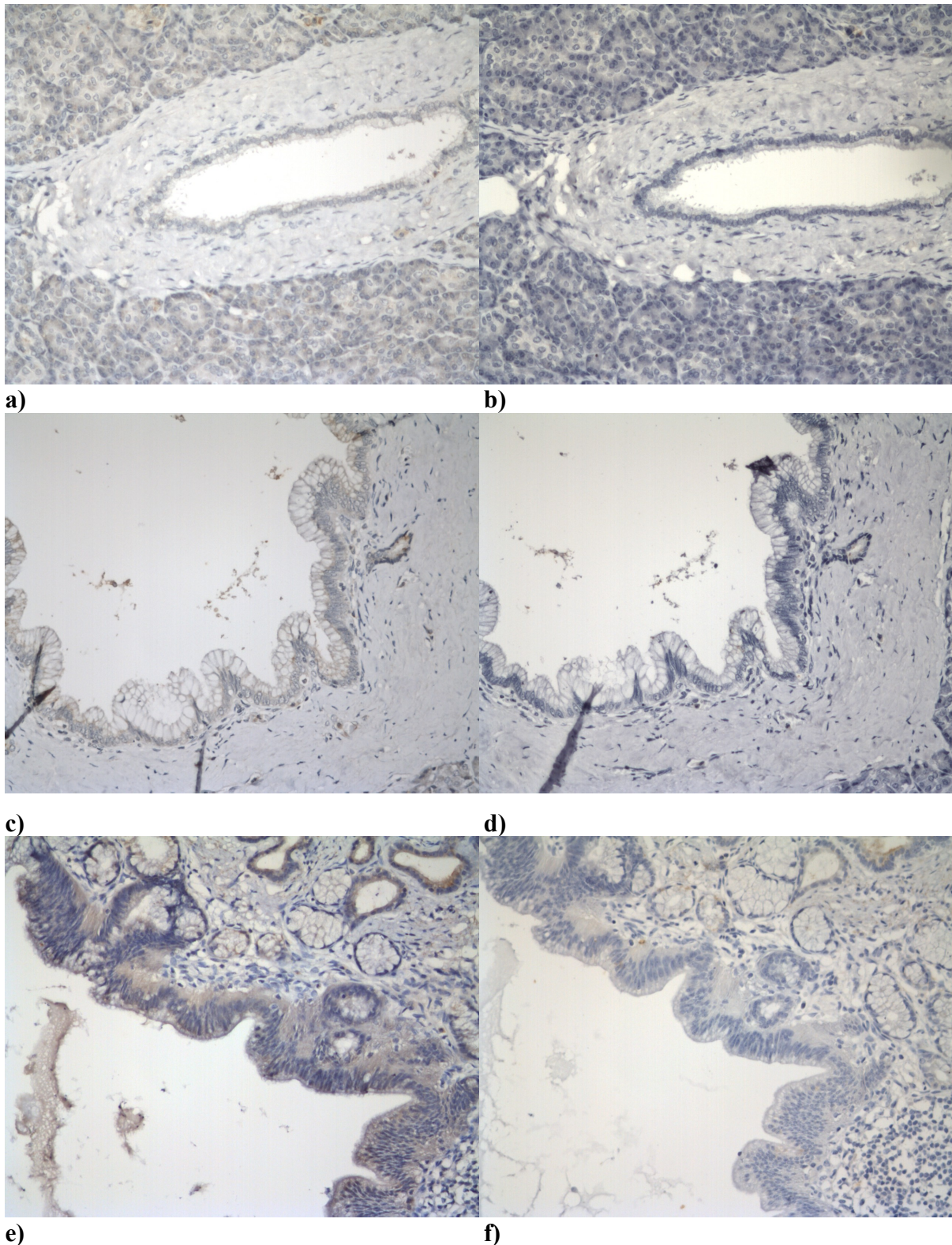
Abbildung 6: Immunreaktiver Score für die verschiedenen Gruppen für KLK-10



DAC= duktales Pankreas Adenokarzinom, IRS = Immunreaktiver Score,

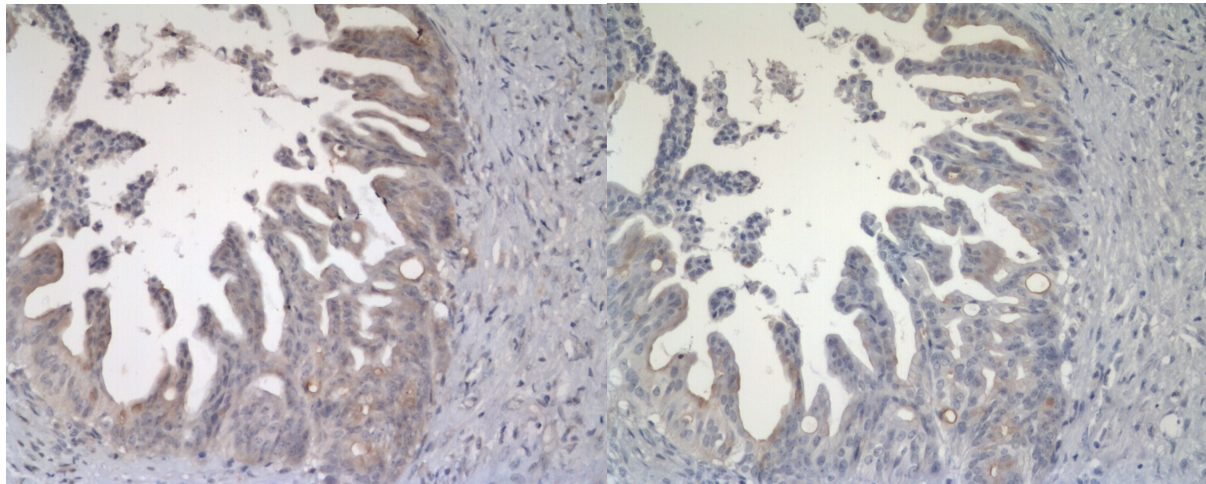
n = Anzahl; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Abbildung 7: Ausgewählte Gewebe-Microarray-Ausschnitte gefärbt mit KLK-10 und KLK-10-Peptid



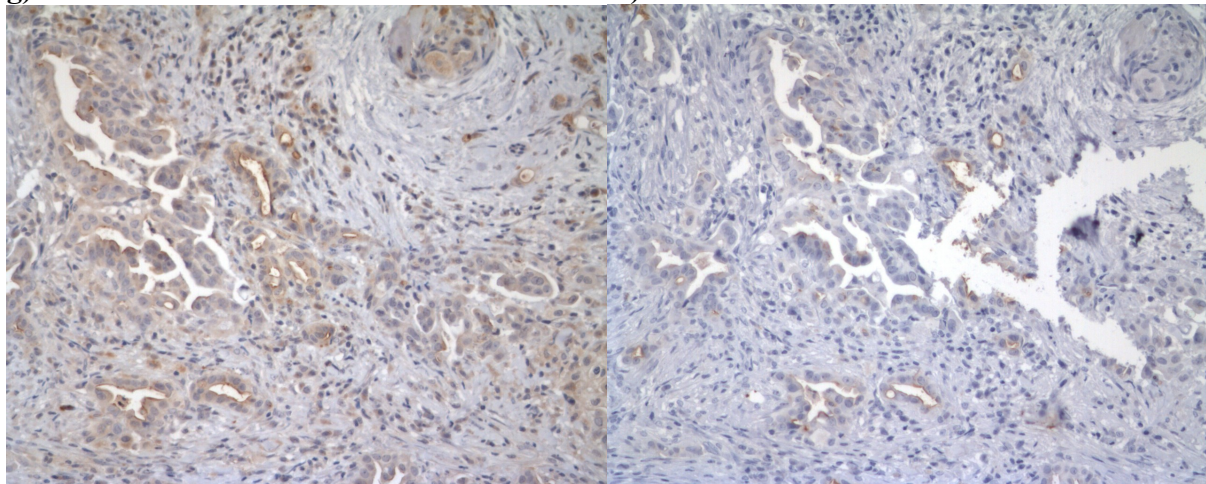
a) Normales Pankreasgewebe mit einem normalen Pankreasgang ohne Farbreaktion, umliegende Azinuszellen zeigen eine schwache Farbreaktion. In **b)** nach Peptidkompetition zeigt sich keine Farbreaktion mehr (100fache Vergrößerung). **c)** PanIN-1a in Übergang zu PanIN-1b. Schwache Farbreaktion in den Gangzellen (100fache Vergrößerung). **d)** Nach Peptidkompetition keine Farbreaktion mehr in den Gangzellen (100fache Vergrößerung). **e)** PanIN-1b Übergang in PanIN-2 schwache Farbreaktion in den Gangzellen, vereinzelt stark positiv gefärbte Zellen (100fache Vergrößerung). **f)** Ausschnitt nach Peptidkompetition. Es zeigen sich nur noch vereinzelt positiv gefärbte Zellen (100fache Vergrößerung).

Fortsetzung Abbildung 7: KLK-10 und KLK-10-Peptid



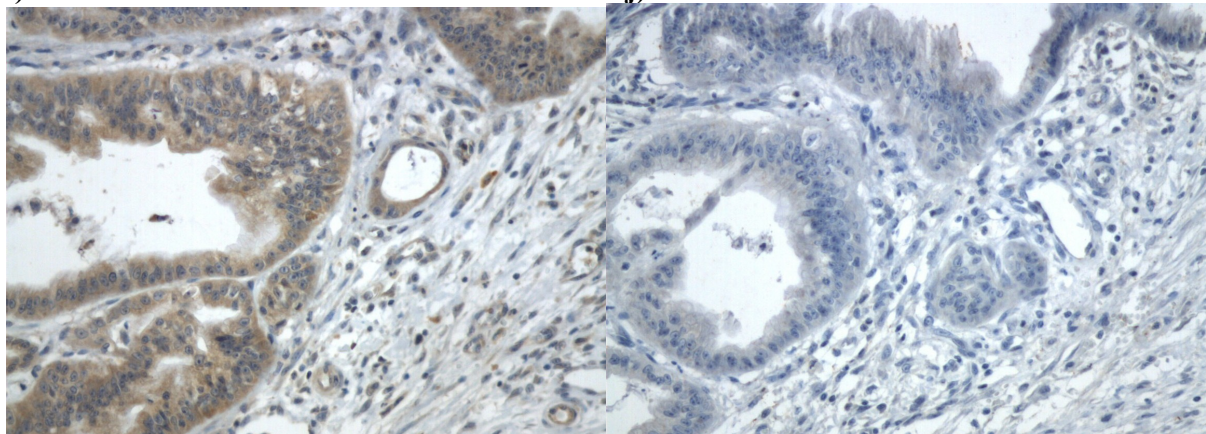
g)

h)



i)

j)



k)

l)

g) PanIN-3 (100fache Vergrößerung) mittelstarke Farbreaktion in den Gangzellen. Nach Peptidkompetition in **h)** vereinzelt positive Farbsignale. **i)** PDAC mit mittelstarker Farbreaktion in den Tumorzellen (100fache Vergrößerung). Nach der Peptidkompetition **j)** vereinzelt positives Farbsignal in Tumorzellen (100fache Vergrößerung). **k)** Mittelstarke Farbreaktion in einem Ausschnitt eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas (400fache Vergrößerung) Stromazellen zeigen vereinzelt eine schwach positive Farbreaktion. Nach Peptidkompetition **l)** zeigt sich kein Farbsignal mehr, weder in den Tumorzellen noch im Stroma (400fache Vergrößerung).

Für KLK-10 ergab sich anhand des IRS im normalen Pankreasgewebe ein Mittelwert von 0,52 (SPW: IRS 0 bis 2; SD = 0,87). Für die PanIN-1a Läsionen ergab sich ein Mittelwert von 0,63 (SPW: IRS 0 bis 4; SD = 1,17). Für die PanIN-1b Läsionen ergab sich ein Mittelwert von 0,81 (SPW: IRS 0 bis 4; SD = 1,15). Für die PanIN-2 Läsionen ergab sich ein Mittelwert von 3 (SPW: IRS 0 bis 8; SD = 2,25). Die Läsionen PanIN-3 zeigten einen Mittelwert von 1,66 (SPW: IRS 0 bis 4; SD = 2,08). Im DAC ergab der IRS einen Mittelwert von 5,55 (SPW: IRS 0 bis 12; SD = 3,54). (Siehe Abbildung 6).

Die Expression des Antikörpers war signifikant unterschiedlich für die verschiedenen Gruppen im Kruskal-Wallis-Test mit einem $p < 0,001$ (siehe Tabelle 13). KLK-10 wurde in den *high grade* PanINs signifikant stärker exprimiert als in den normalen Pankreasgängen und in den *low grade* PanINs, was im Mann-Whitney-U-Test mit einem $p < 0,001$ belegt wird (siehe Tabelle 14). Ein signifikanter Unterschied ergab auch der Vergleich von normalen Pankreasgängen mit dem duktalem Pankreas Adenokarzinom mit einem $p < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test (siehe Tabelle 15).

Tabelle 13: Kruskal-Wallis-Test für KLK-10

Kruskal Wallis Test – KLK-10		
Gruppen	Anzahl	Mittlerer Rang
Normale Pankreasgänge	21	51,33
PanIN-1a	36	53,03
PanIN-1b	38	60,03
PanIN-2	12	103,38
PanIN-3	8	116,19
DAC	47	122,66
Anzahl	162	
p-Wert < 0,001		

DAC = duktales Adenokarzinom; **PanIN** = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Tabelle 14: Mann-Whitney-U-Test für KLK-10: Normale Pankreasgänge und *low grade* PanINs versus *high grade* PanINs

Mann-Whitney-U-Test: Gruppe 1 vs. Gruppe 2		Anzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gruppe 1	Normale Gänge und <i>low grade</i> PanINs	95	50,85	4831
Gruppe 2	<i>high grade</i> PanINs	20	91,95	1839
		115		
p-Wert < 0,001				

vs.= versus, *low grade* PanINs = PanIN-1a und PanIN-1b, *high grade* PanINs = PanIN-2 und PanIN-3; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Tabelle 15: Mann-Whitney-U-Test für KLK-10: Normale Pankreasgänge versus duktales Pankreaskarzinom

Mann-Whitney-U-Test Gruppe 1 vs. Gruppe 2		Anzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gruppe 1	Normale Pankreasgänge	21	14,95	314
Gruppe 2	DAC	47	43,23	2032
		68		
p-Wert < 0,001				

vs.= versus, DAC = duktales Adenokarzinom; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

3.1.3 Ergebnisse der statistischen Auswertung für MCM 2

Für MCM 2 wurde die immunhistochemische Lokalisation in sechs Gewebe-*Microarrays* untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte in einer Gesamtanzahl von 191 Gewebestanden, die mit dem Antikörper MCM 2 gefärbt wurden. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung sind in Abbildung 8 für die normalen Pankreasgänge, PanIN-1 bis PanIN-3 und dem duktales Adenokarzinom (DAC) zu sehen. Tabelle 16 bietet eine Übersicht über die Anzahl der unterschiedlichen Gruppen, die für MCM 2 ausgewertet wurden. Der Antikörper zeigt eine nukleäre Anfärbung und eine unregelmäßige Färbung in Azinuszellen. Das Stroma um die Pankreasgänge zeigte keine Färbung. In der Abbildung 9 ist die immunhistochemische Expression von MCM 2 für die verschiedenen Gruppen zu sehen. Für das normale Pankreasgewebe ergab der IRS für MCM 2 einen Mittelwert von 0,14 (SPW: IRS 0 bis 2; SD = 0,46). Für die PanIN-1a Läsionen ergab sich ein Mittelwert von 0,75 (SPW: IRS 0 bis 4; SD = 1,19). Die PanIN-1b Läsionen ergaben einen Mittelwert von 0,63 (SPW:

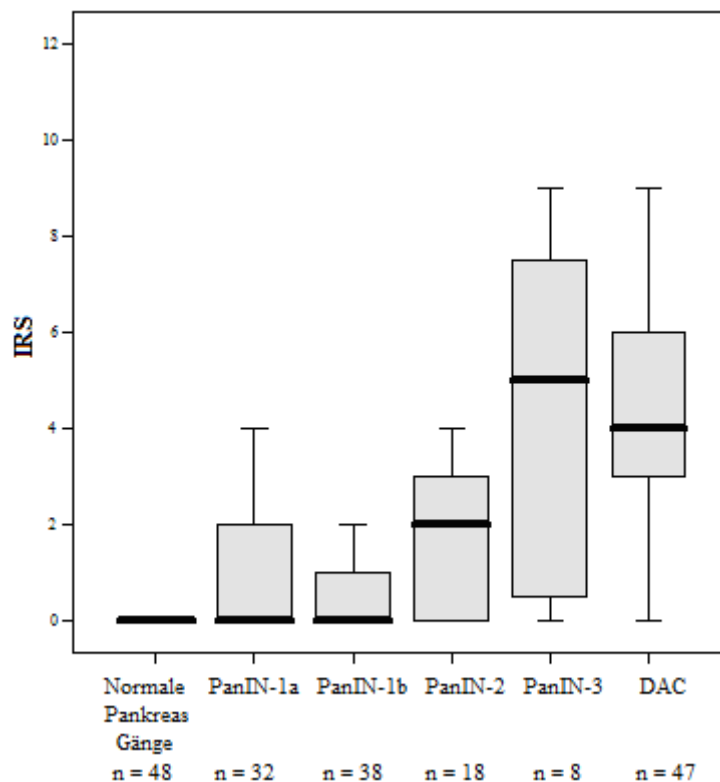
IRS 0 bis 4; SD = 0,99). Die PanIN-2 Läsionen ergaben einen Mittelwert von 2,16 (SPW: IRS 0 bis 12; SD = 2,85). Für die PanIN-3 Läsionen wurde ein Mittelwert von 4,37 (SPW: IRS 0 bis 9; SD = 3,73) berechnet. Für das DAC ergab sich ein Mittelwert von 5 (SPW: IRS 0 bis 12; SD = 2,73). (Siehe Abbildung 8).

Tabelle 16: Detailansicht der untersuchten Gruppen gefärbt mit MCM 2

Gruppen	Anzahl
Normale Pankreasgänge	48
PanIN-1a	32
PanIN-1b	38
PanIN-2	18
PanIN-3	8
DAC	47
Gesamt Anzahl	191

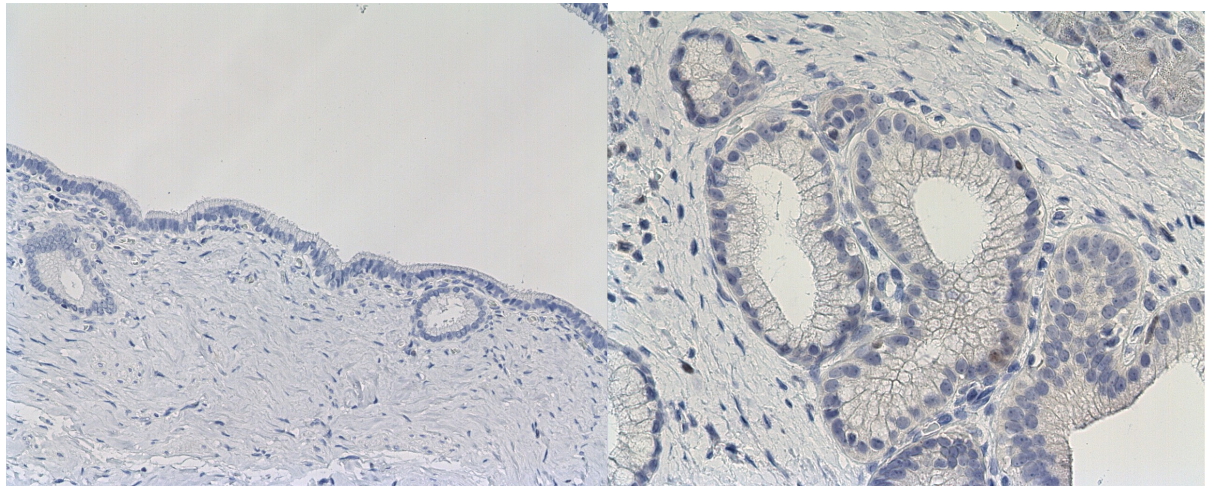
DAC = duktales Adenokarzinom, **PanIN** = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Abbildung 8: Immunreaktiver Score für die unterschiedlichen Gruppen von MCM 2



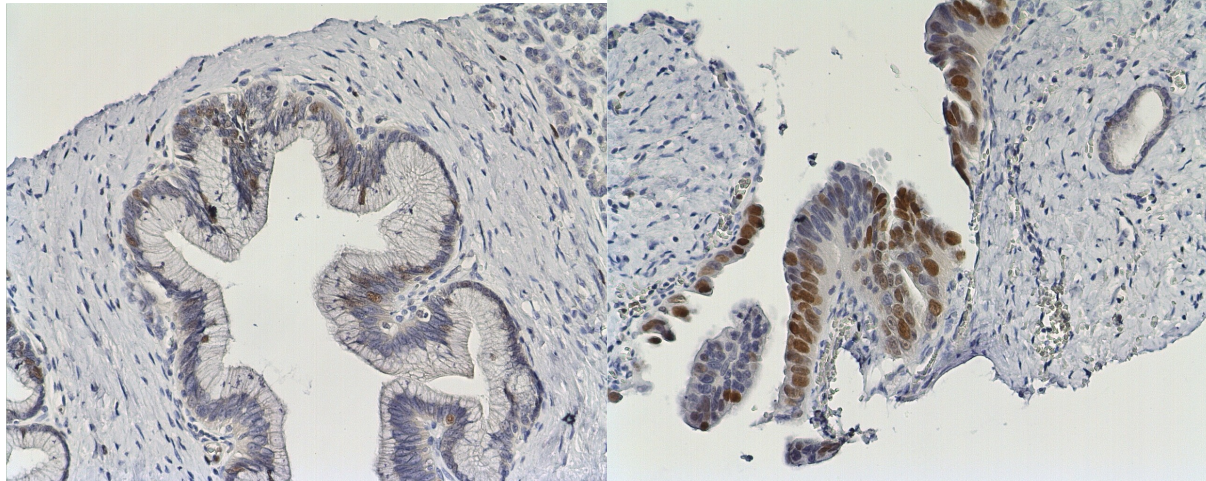
DAC = duktales Pankreas Adenokarzinom, **IRS** = Immunreaktiver Score, **n** = Anzahl, **PanIN** = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Abbildung 9: Ausgewählte Gewebe-Microarray-Ausschnitte gefärbt mit dem Antikörper MCM 2



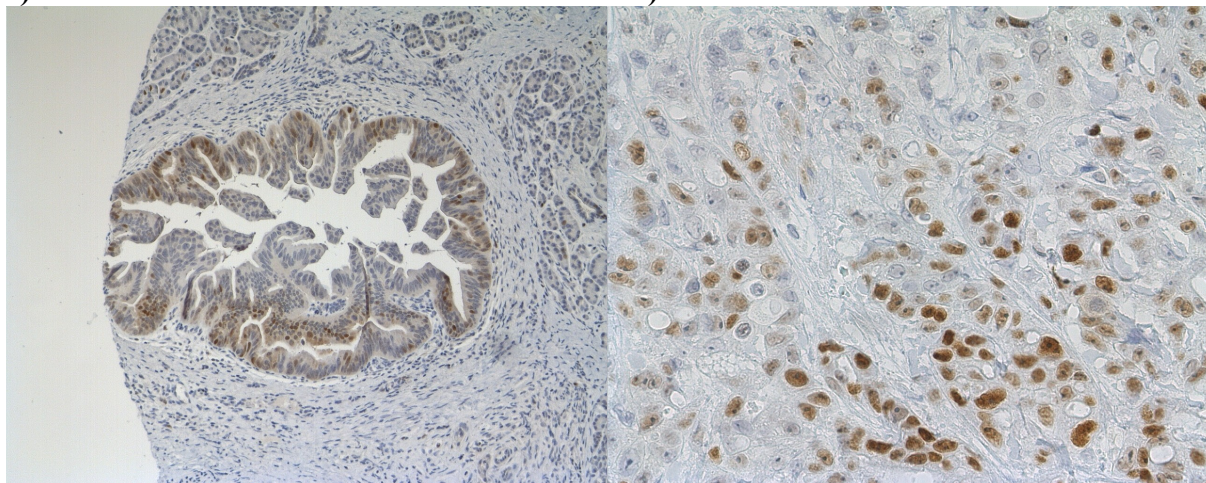
a)

b)



c)

d)



e)

f)

a) Normales Pankreasgangsepithel (100fache Vergrößerung) und **b)** PanIN-1a (400fache Vergrößerung) ohne Farbreaktion. **c)** PanIN-1b (400fache Vergrößerung) schwache Expression von MCM 2 in den Gangzellkernen. **d)** PanIN-2 mit mittel- und starker Expression von MCM 2 in den meisten Zellkernen der Gangzellen (400fache Vergrößerung). **e)** PanIN-3 mit mittelstarker Expression in den Zellkernen der Gangzellen (100fache Vergrößerung). **f)** In in den Zellkernen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas zeigt sich eine mittel- und starke Farbreaktion (400fache Vergrößerung).

Tabelle 17: Kruskal-Wallis Test für MCM 2

Kruskal-Wallis Test - MCM 2		
Gruppen	Anzahl	Mittlerer Rang
Normale Pankreasgänge	48	55,89
PanIN-1a	32	76,66
PanIN-1b	38	75,36
PanIN-2	18	108,56
PanIN-3	8	135,13
DAC	47	155,36
Gesamt	191	
p-Wert < 0,001		

DAC = duktales Adenokarzinom; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

In der Abbildung 8 kann man erkennen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit normalen Gängen, PanIN-1a und PanIN-1b zu den PanIN-2 Läsionen bis zum DAC ist. Diese Signifikanz wurde mit dem im Kruskal-Wallis-Test mit $p < 0,001$ in Tabelle 17 belegt. Bei Betrachtung der mittleren Ränge (Tabelle 17) sieht man ein kontinuierliches Ansteigen des IRS. In den PanIN-2 bis PanIN-3 wurde MCM 2 signifikant stärker exprimiert (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,001$) als in den Gruppen mit normalen Pankreasgängen und niedrigem Dysplasiegrad (PanIN-1a und PanIN-1b) (siehe Tabelle 18). Im duktalem Adenokarzinom wurde MCM 2 signifikant stärker exprimiert als im normalen Pankreasgewebe, was im Mann-Whitney-U-Test mit einem $p < 0,001$ aus der Tabelle 19 zu entnehmen ist.

Tabelle 18: Mann-Whitney-U-Test für MCM 2: Normale Pankreasgänge und *low grade* PanINs versus *high grade* PanINs

Mann-Whitney-U-Test:		Anzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gruppe 1 vs. Gruppe 2				
Gruppe 1	Normale Gänge und <i>low grade</i> PanINs	118	65,67	7749,5
Gruppe 2	<i>high grade</i> PanINs	26	103,48	2690,5
		144		
p-Wert < 0,001				

vs.= versus, *low grade* PanINs = PanIN-1a und PanIN-1b, *high grade* PanINs = PanIN-2 und PanIN-3; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Tabelle 19: Mann-Whitney-U-Test für MCM 2: Normale Pankreasgänge versus duktales Pankreaskarzinom

Mann-Whitney-U-Test Gruppe 1 vs. Gruppe 2		Anzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gruppe 1	Normale Pankreasgänge	48	24,5	1176
Gruppe 2	DAC	47	72	3384
		68	95	
p-Wert < 0,001				

vs.= versus, **DAC** = duktales Adenokarzinom; **PanIN** = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

3.1.4 Ergebnisse der statistischen Auswertung für MCM 7

Die immunhistochemische Auswertung des Antikörpers MCM 7 erfolgte in sechs Gewebe-*Microarrays*. Insgesamt wurden 193 Gewebestanden für die statistische Auswertung berücksichtigt. In der Tabelle 20 ist eine Übersicht über die verschiedenen Gruppen zu sehen. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung sind in der Abbildung 11 für die normalen Pankreasgänge, PanIN-1 bis PanIN-3 und dem duktales Adenokarzinom zu sehen. Die Antikörperfärbung zeigt sich vorwiegend nukleär und selten in Azinus- oder Stromazellen. Weitere zelluläre Anfärbungen wurden nicht beobachtet.

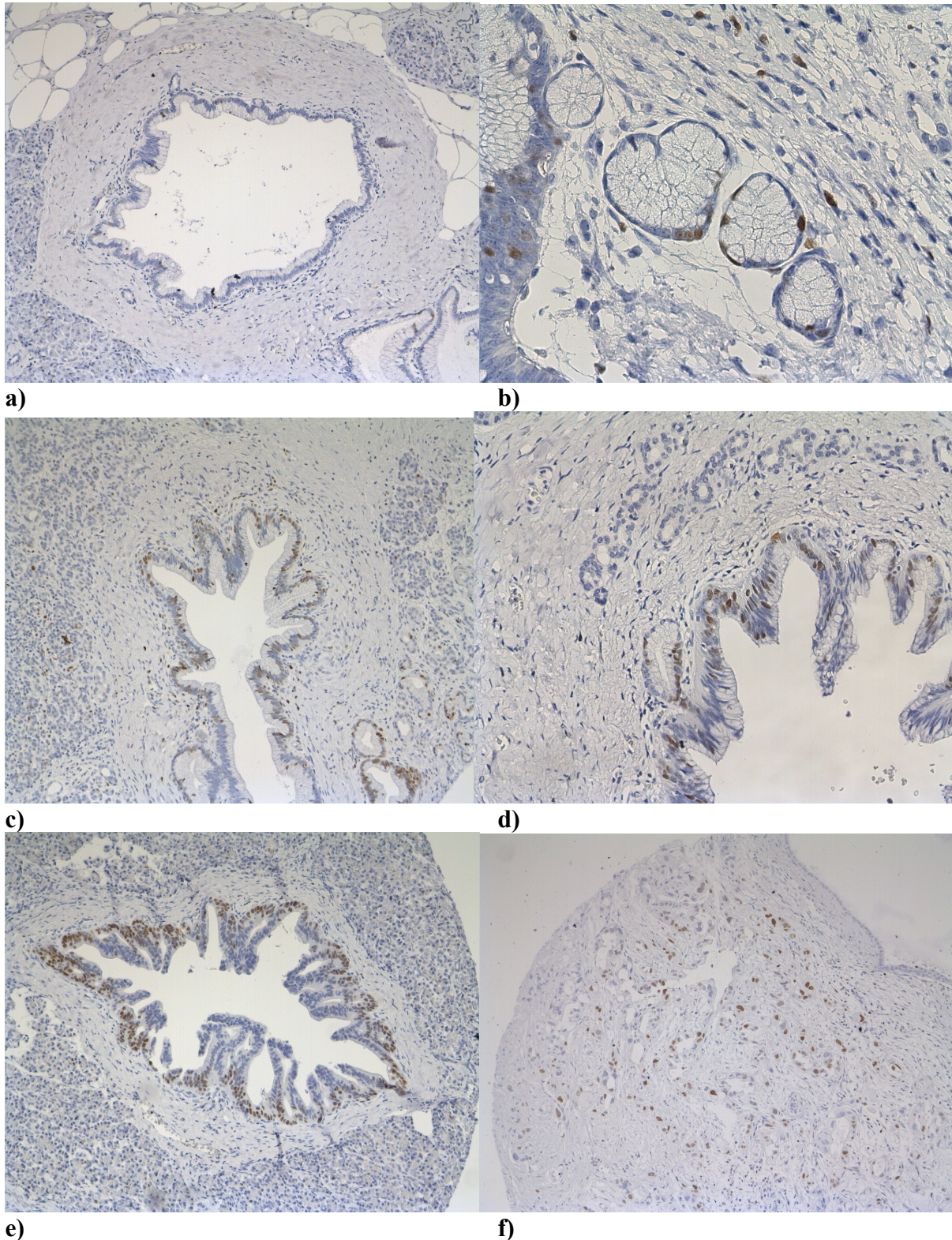
In der Abbildung 10 ist die immunhistochemische Expression von MCM 7 für die verschiedenen Gruppen zu sehen.

Tabelle 20: Detailansicht der untersuchten Gruppen für MCM 7

Gruppen	Anzahl
Normale Pankreasgänge	36
PanIN-1a	40
PanIN-1b	45
PanIN-2	18
PanIN-3	6
DAC	48
Gesamt Anzahl	193

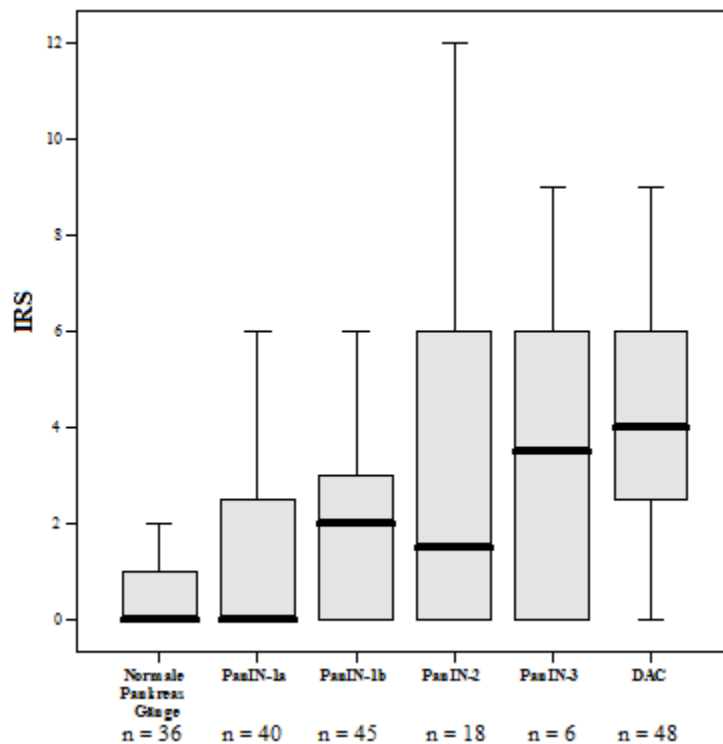
DAC = duktales Adenokarzinom; **PanIN** = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Abbildung 10: Ausgewählte Gewebe-*Microarray*-Ausschnitte gefärbt mit dem Antikörper MCM 7



a) Normales Pankreasgangepithel in 100facher Vergrößerung ohne Farbreaktion. **b)** PanIN-1a (400fache Vergrößerung) mit starker Farbreaktion in vereinzelt Zellkernen, **c)** PanIN-1b (100fache Vergrößerung) sowie **d)** PanIN-2 (100fache Vergrößerung) und **e)** PanIN-3 (100fache Vergrößerung) zeigen eine schwach bis mittelstarke positive Farbreaktion der Zellkerne der Gangzellen. **f)** Die Zellkerne des duktales Adenokarzinoms des Pankreas zeigen eine mittelstarke Farbreaktion (10fache Vergrößerung).

Abbildung 11: Immunreaktiver Score für die Gruppen gefärbt mit dem Antikörper MCM 7



DAC = duktales Adenokarzinom, IRS = Immunreaktiver Score, n = Anzahl;
PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Die Auswertung des IRS für MCM 7 ergab für das normale Pankreasgewebe einen Mittelwert von 0,83 (SPW: IRS 0 bis 4; SD = 1,2). Für die PanIN-1a Fälle zeigte sich ein Mittelwert von 1,4 (SPW: IRS 0 bis 6; SD = 1,94). Für die PanIN-1b Läsionen wurde ein Mittelwert von 1,6 (SPW: IRS 0 bis 6; SD = 1,49) berechnet. Die PanIN-2 Läsionen erreichten einen Mittelwert von 2,88 (SPW: IRS 0 bis 12; SD = 3,26). Für die PanIN-3 Fälle ergab sich ein Mittelwert von 3,66 (SPW: IRS 0 bis 9; SD = 3,82). Für das DAC ergab sich ein Mittelwert von 4 (SPW: IRS 0 bis 12; SD = 2,37). (Siehe Abbildung 11).

Die Expression des Antikörpers war signifikant unterschiedlich im Kruskal-Wallis-Test mit $p < 0,001$ für die verschiedenen Gruppen (siehe Tabelle 21). Bei Betrachtung der mittleren Ränge (siehe Tabelle 21) lässt sich eine stetige Zunahme der Ränge beschreiben. Bei den Gruppen mit normalen Pankreasgängen und *low grade* PanINs ist im Vergleich zu den *high grade* PanINs kein signifikanter Unterschied zu berichten (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,014$; siehe Tabelle 22). MCM 7 wurde im Pankreaskarzinom signifikant stärker exprimiert als in den normalen Pankreasgängen ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test; siehe Tabelle 23).

Tabelle 21: Kruskal-Wallis Test für MCM 7

Kruskal-Wallis-Test - MCM 7		
Gruppen	Anzahl	Mittlerer Rang
Normale Pankreasgänge	36	64,40
PanIN-1a	40	75,76
PanIN-1b	45	87,90
PanIN-2	18	106,67
PanIN-3	6	115,67
DAC	48	141,72
Gesamt	193	
p-Wert < 0,001		

DAC = duktales Adenokarzinom; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Tabelle 22: Mann-Whitney-U-Test für MCM 7: Normale Pankreasgänge und *low grade* PanINs versus *high grade* PanINs

Mann-Whitney-U-Test:		Anzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gruppe 1 vs. Gruppe 2				
Gruppe 1	Normale Gänge und <i>low grade</i> PanINs	121	69,39	8396,5
Gruppe 2	<i>high grade</i> PanINs	24	91,19	2188,5
		145		
p-Wert < 0,014				

vs.= versus, *low grade* PanINs = PanIN-1a und PanIN-1b, *high grade* PanINs = PanIN-2 und PanIN-3; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Tabelle 23: Mann-Whitney-U-Test für MCM 7: Normale Pankreasgänge versus duktales Pankreaskarzinom

Mann-Whitney-U-Test		Anzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gruppe 1 vs. Gruppe 2				
Gruppe 1	Normale Pankreasgänge	36	18,5	666
Gruppe 2	DAC	48	60,5	2904
		84		
p -Wert < 0,001				

vs.= versus, DAC = duktales Adenokarzinom; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

3.1.5 Ergebnisse der statistischen Auswertung für MMP-11 (Klon SL3.05)

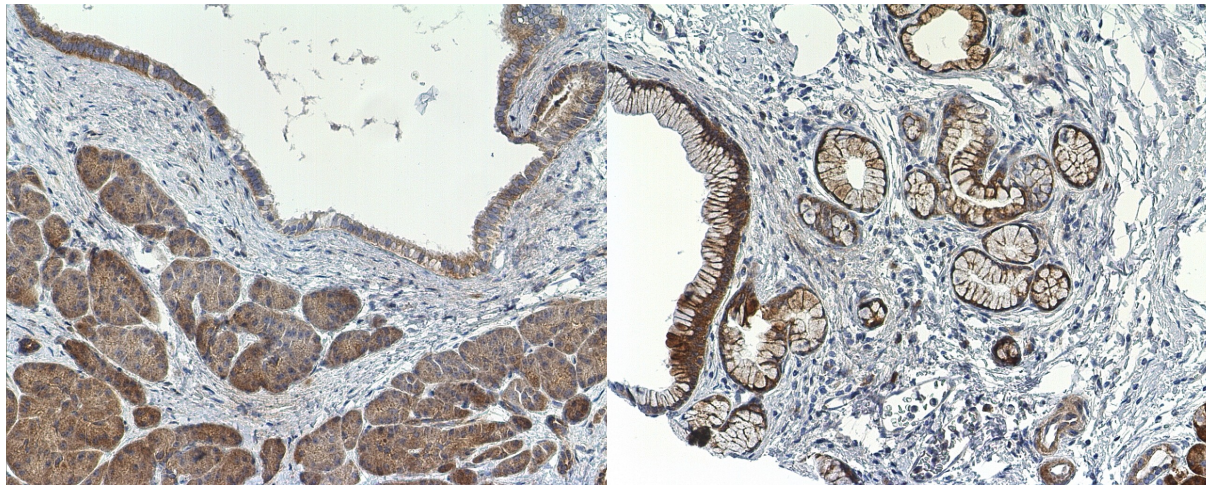
Für MMP-11 (Klon SL3.05 der Firma Diagnostic Bioscience) wurde die immunhistochemische Lokalisation in sechs Gewebe-*Microarrays* und zwölf Pankreas-Paraffinschnitte untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte in einer Gesamtanzahl von 189 Gewebestanden und zwölf Pankreas-Paraffinschnitte. In der Tabelle 24 ist eine Übersicht der verschiedenen untersuchten Gruppen zu entnehmen. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung sind in Abbildung 13 für die normalen Pankreasgänge, PanIN-1 bis PanIN-3 und dem DAC zu sehen. Der Antikörper zeigte in den Pankreasepithelien eine vorwiegend intrazytoplasmatische Färbung. Zusätzlich wurde MMP-11 der Firma Diagnostic Bioscience, stark in Azinuszellen und im Stroma exprimiert. Die immunhistochemische Anfärbung ist für die verschiedenen Gruppen in der Abbildung 12 zu sehen.

Tabelle 24: Detailansicht der untersuchten Gruppen mit dem Antikörper MMP-11, Klon SL3.05

Gruppen	Anzahl
Normale Pankreasgänge	38
PanIN-1a	41
PanIN-1b	45
PanIN-2	14
PanIN-3	4
DAC	47
Gesamt Anzahl	189

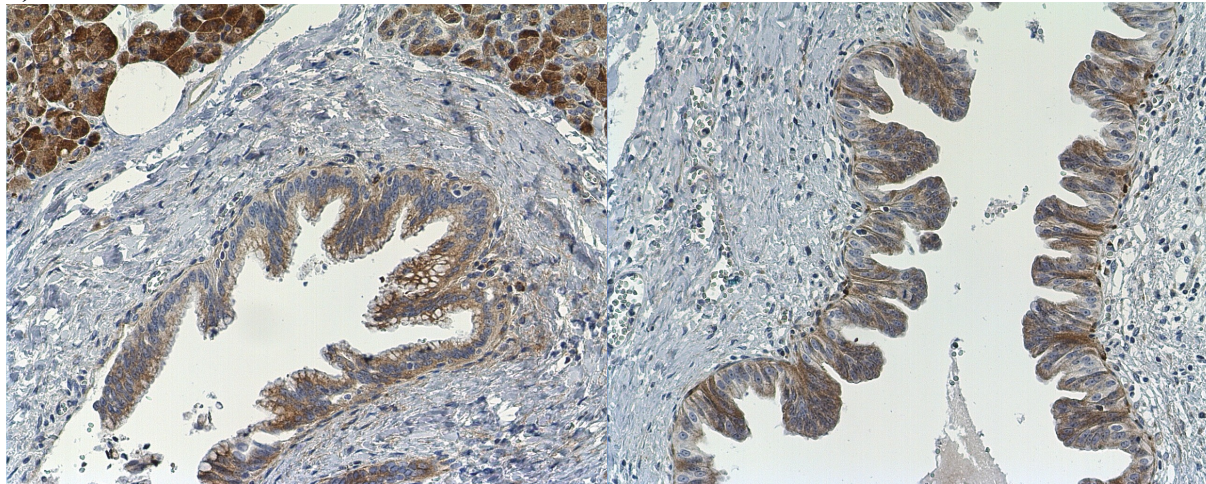
DAC = duktales Adenokarzinom; **PanIN** = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Abbildung 12: Ausgewählte Gewebe-Microarray-Ausschnitte gefärbt mit dem Antikörper MMP-11, Klon SL3.05



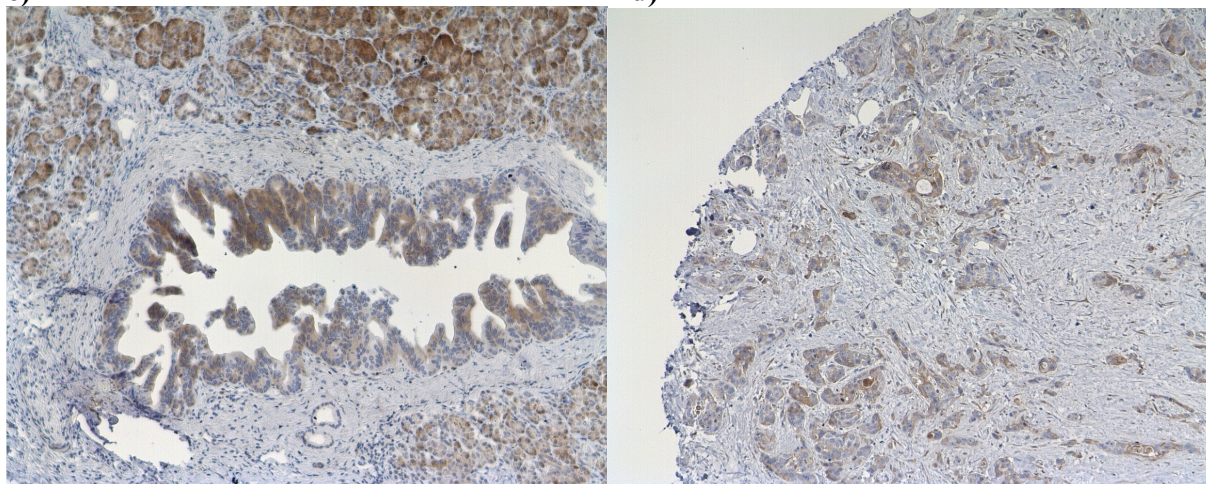
a)

b)



c)

d)

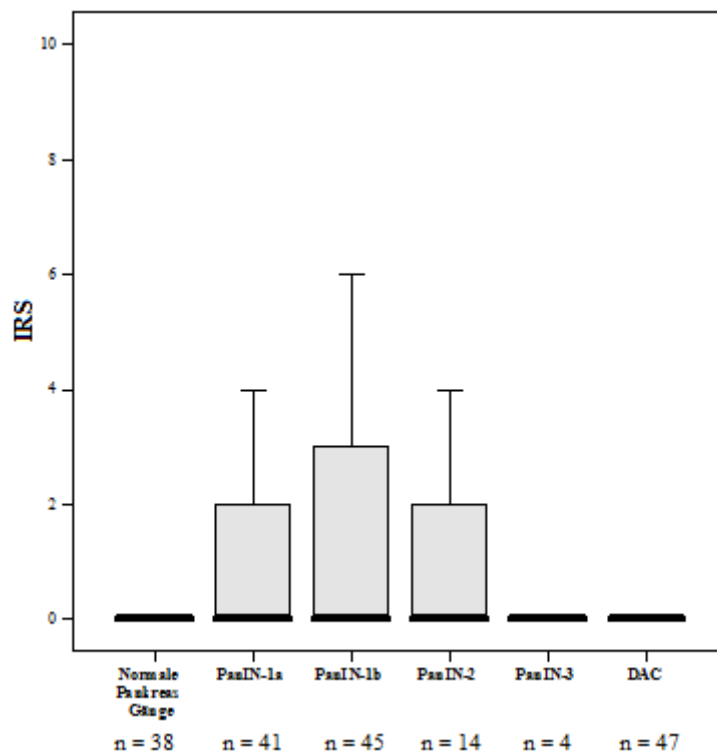


e)

f)

a) Normales Pankreasgangepithel mit mittelstarker Farbreaktion. Starkes Farbsignal in den umliegenden Azinuszellen (100fache Vergrößerung). In **b)** PanIN-1a und **c)** PanIN-1b (100fache Vergrößerung) zeigen die Gangzellen eine mäßig starke Expression des Antigens. Die Azinuszellen zeigen eine starke Farbreaktion. **d)** PanIN-2 mittelstarke Expression (100fache Vergrößerung) **e)** PanIN-3 vereinzelt mittelstarke Farbreaktion im Gangepithel sogleich in Azinuszellen (100fache Vergrößerung). **f)** Duktales Adenokarzinom des Pankreas mit schwacher Farbreaktion (100fache Vergrößerung).

Abbildung 13: Immunreaktiver Score für die verschiedenen Gruppen für MMP-11, Klon SL3.05



DAC = duktales Adenokarzinom, IRS = Immunreaktiver Score, n = Anzahl

Für MMP-11 ergab sich für die normalen Pankreasgängen ein Mittelwert von 0,28 (SPW: IRS 0 bis 4; SD = 0,83). Für die PanIN-1a Läsionen errechnete sich ein Mittelwert von 0,97 (SPW: IRS 0 bis 6; SD = 1,69). Für die PanIN-1b Läsionen errechnete sich ein Mittelwert von 1,75 (SPW: IRS 0 bis 9; SD = 2,43). Für die PanIN-2 Läsionen ergab sich ein Mittelwert von 1 (SPW: IRS 0 bis 6; SD = 1,88). Im Fall der PanIN-3 Fälle zeigte MMP-11 für alle Läsionen einen IRS = 0, daher Mittelwert, SPW und SD = 0. Für das DAC zeigte sich ein Mittelwert von 0,27 (SPW: IRS 0 bis 4; SD = 0,71). (Siehe Abbildung 13).

Da die Expression von MMP-11 in allen Vorläuferläsionen und auch im DAC sehr niedrig war, wurde kein signifikanter Unterschied für die verschiedenen Gruppen im Kruskal-Wallis-Test mit einem $p < 0,005$ (siehe Tabelle 25) festgestellt.

Tabelle 25: Ergebnisse des Kruskal-Wallis Test für MMP-11, Klon SL3.05

Kruskal-Wallis Test - MMP-11, Klon SL3.05		
Gruppen	Anzahl	Mittlerer Rang
Normale Pankreasgänge	38	81,55
PanIN-1a	41	100,13
PanIN-1b	45	113,29
PanIN-2	14	98,04
PanIN-3	4	70
DAC	47	85,11
Total	189	
p -Wert < 0,005		

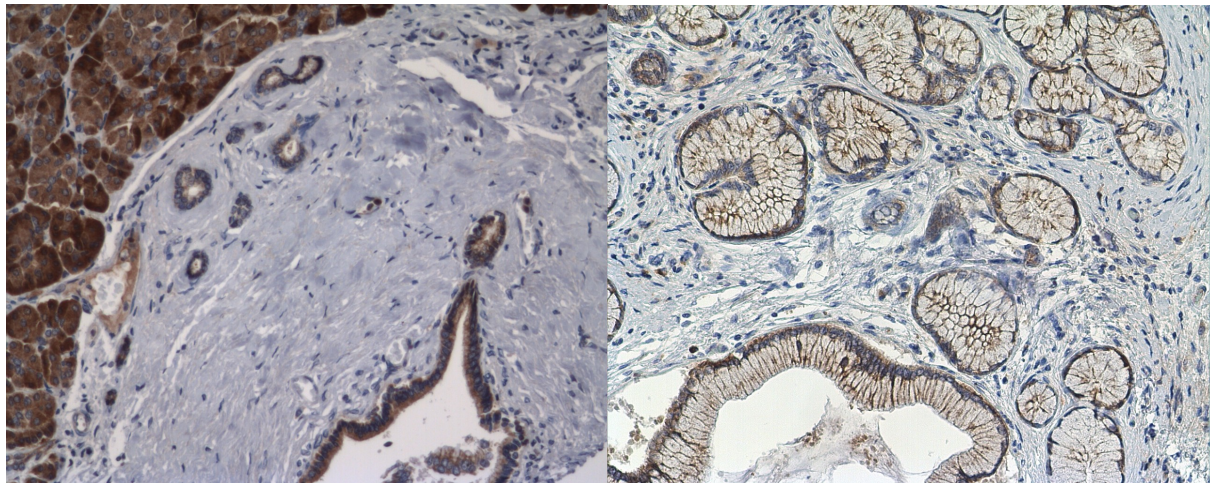
DAC = duktales Adenokarzinom; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

3.1.6 Ergebnisse der statistischen Auswertung für MMP-11 (Klon SPM199)

Da die Ergebnisse mit dem Antikörper MMP-11 Klon SL3.05 nicht mit den Literaturdaten korrelierten (Genexpressionsdaten sowie Proteinexpression in Pankreaskarzinom-Zelllinien) haben wir einen anderen MMP-11 Antikörper (Klon SPM199 der Firma AnaSpec) getestet. Für den Antikörper MMP-11 (Klon SPM199 der Firma AnaSpec) wurde die immunhistochemische Lokalisation in sechs Gewebe-*Microarrays* und zwölf Pankreas-Paraffinschnitten untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte in einer Gesamtanzahl von 166 Gewebeproben. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung sind in Abbildung 15 für die normalen Pankreasgänge, PanIN-1 bis PanIN-3 und dem DAC zu sehen. Die Farbreaktion zeigte sich intrazytoplasmatisch. Zusätzlich wurde das Antigen stark in Azinuszellen und im Stroma exprimiert. Die immunhistochemische Anfärbung ist für die verschiedenen Gruppen aus der Abbildung 14 zu entnehmen.

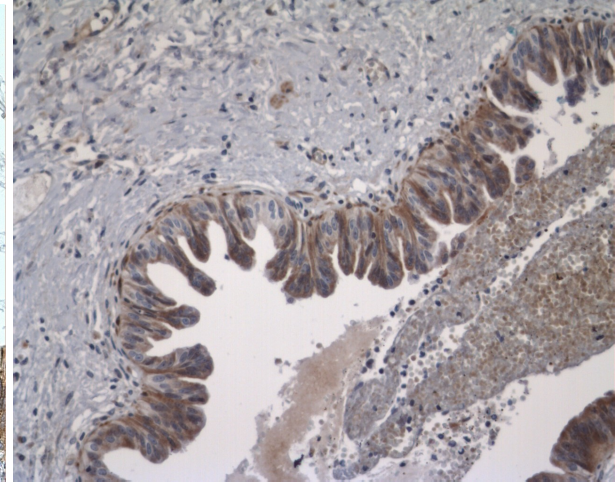
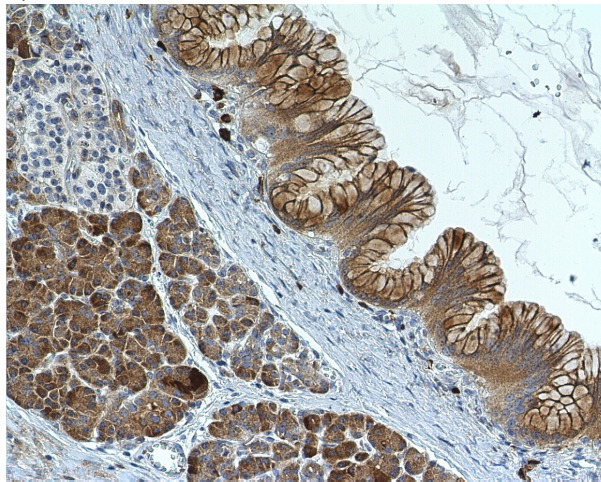
In den normalen Pankreasgängen ergab der IRS für MMP-11 (Klon SPM199) einen Mittelwert von 5,36 (SPW: IRS 0 bis 12; SD = 3,67). Für die PanIN-1a Läsionen errechnete sich ein Mittelwert von 6 (SPW: IRS 2 bis 12; SD = 3,11). Für die PanIN-1b Läsionen errechnete sich ein Mittelwert von 5,51 (SPW: IRS 0 bis 12; SD = 3,34). Für die PanIN-2 Läsionen errechnete sich ein Mittelwert von 5,25 (SPW: IRS 0 bis 8; SD = 2,59). In den ausgewerteten Spots wurde nur ein PanIN-3 mit einem IRS = 8 angetroffen. Das DAC ergab einen Mittelwert von 3,52 (SPW: IRS 0 bis 8; SD = 2,82). (Siehe Abbildung 15).

Abbildung 14: Ausgewählte Gewebe-*Microarray*-Ausschnitte gefärbt mit dem Antikörper MMP-11, Klon SPM199



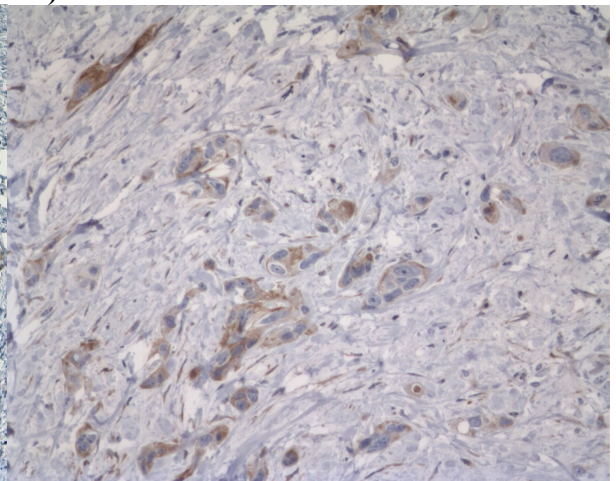
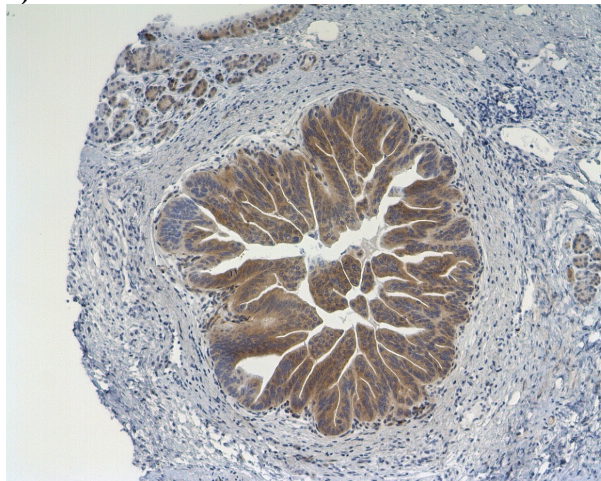
a)

b)



c)

d)



e)

f)

a) Normales Pankreasgangepithel mit starker Farbexpression. Starke Farbreaktion in den umliegenden Azinuszellen (100fache Vergrößerung). In **b)** PanIN-1a und **c)** PanIN-1b (100fache Vergrößerung) zeigen die Gangzellen und Azinuszellen eine starke Expression von MMP-11. **d)** PanIN-2 (100fache Vergrößerung) und **e)** PanIN-3 starke Farbreaktion im Gangepithel vereinzelt Expression in Azinus- und Stromazellen (100fache Vergrößerung). **f)** Duktales Adenokarzinom des Pankreas mit schwacher Farbreaktion (100fache Vergrößerung).

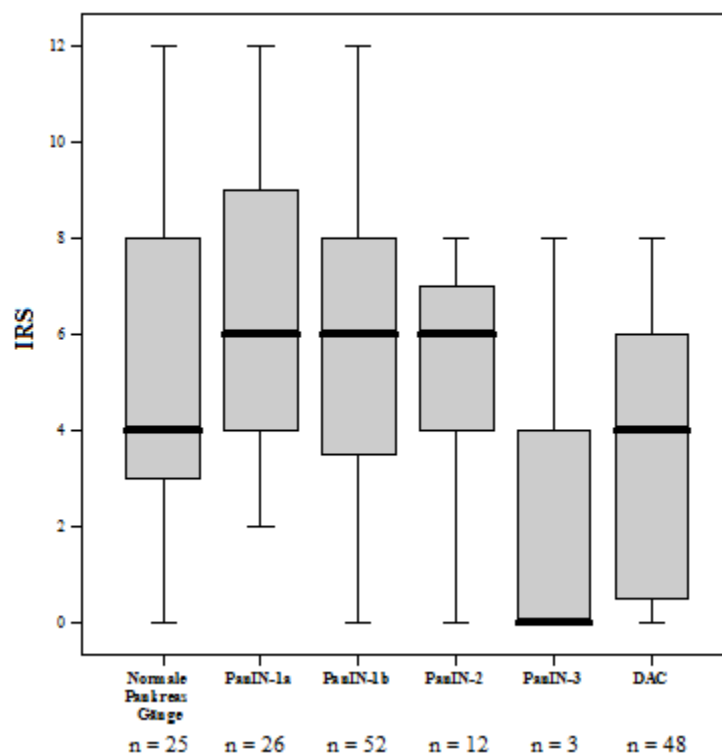
Die Expression des Antikörpers war nicht signifikant für die verschiedenen Gruppen mit einem Kruskal-Wallis-Test $p < 0,015$ (Siehe Tabelle 26). Der Median befindet sich im Mittel bei einem IRS = 6 (siehe Abbildung 15).

Tabelle 26: Kruskal-Wallis Test für MMP-11 Klon, SPM199

Kruskal-Wallis-Test - MMP-11, Klon SPM199		
Gruppen	Anzahl	Mittlerer Rang
Normale Pankreasgänge	25	86,54
PanIN-1a	26	98,63
PanIN-1b	52	91,62
PanIN-2	12	93,92
PanIN-3	3	52,17
DAC	48	64,28
Gesamt Anzahl	166	
p-Wert < 0,015		

DAC = duktales Adenokarzinom; **PanIN** = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Abbildung 15: Immunreaktiver Score der untersuchten Gruppen für MMP-11 Klon, SPM119



DAC = duktales Adenokarzinom, **IRS** = Immunreaktiver Score, **n** = Anzahl;
PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

3.1.7 Ergebnisse der statistischen Auswertung für TMPRSS4

Für TMPRSS4 wurde die immunhistochemische Lokalisation in sechs Gewebe-*Microarrays* und zwölf Pankreas Paraffinschnitten untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte in einer Gesamtanzahl von 182 Gewebestanden. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung sind in Abbildung 17 für die normalen Pankreasgänge, PanIN-1 bis PanIN-3 und dem DAC zu sehen. In der Tabelle 27 ist eine Übersicht der verschiedenen Gruppen, die mit TMPRSS4 gefärbt wurden, niedergelegt. Der Antikörper zeigte sich in den Pankreasepithelien vorwiegend intrazytoplasmatisch. Ein membranständiges Reaktionsmuster liess sich auch in den Epithelzellen der Pankreasgänge beobachten. Zusätzlich wurde der Antikörper schwach in Azinuszellen, sowie teilweise im Stroma exprimiert (siehe Abbildung 16).

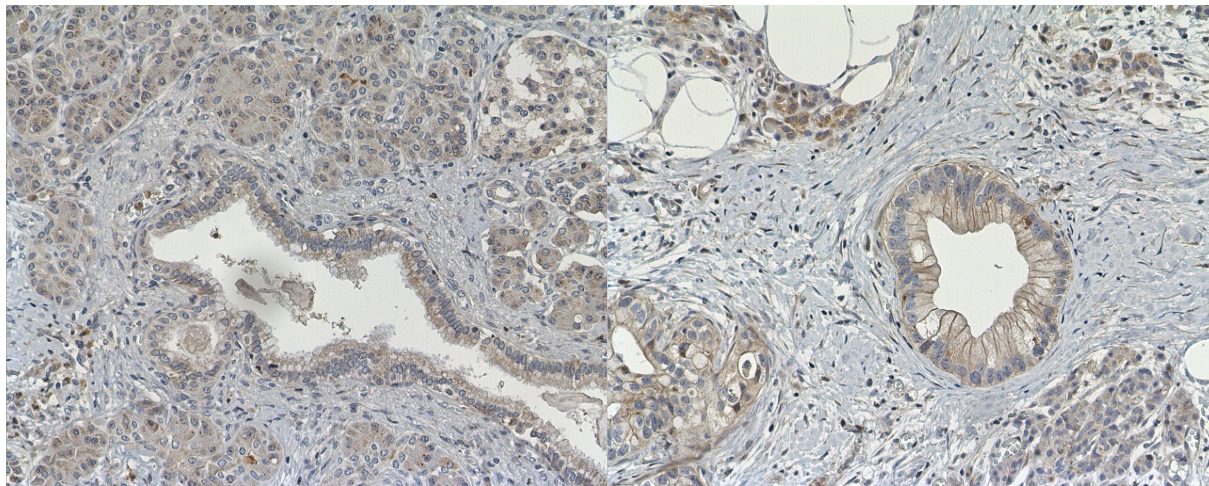
In 79 von 90 (87,7%) der *high grade* PanINs (PanIN-2 und PanIN-3) und dem DAC wurde ein Immunreaktiver Score ≥ 6 beobachtet. Bei den normalen Pankreasgängen wurde ein IRS ≥ 6 nur in 13 von 35 Fällen (37,1%), sowie in den PanIN-1a und PanIN-1b nur in 42 von 67 Fällen (62,7%) beobachtet. Bei TMPRSS4 ergab der IRS im normalen Pankreasgewebe einen Mittelwert von 4,62 (SPW: IRS 0 bis 12; SD = 3,1). Die PanIN-1a Läsionen ergaben einen Mittelwert von 5,34 (SPW: IRS 2 bis 12; SD = 2,56). Die PanIN-1b Läsionen ergaben einen Mittelwert von 7,36 (SPW: IRS 1 bis 12; SD = 3,34). Die PanIN-2 Läsionen erbrachten einen Mittelwert von 8,52 (SPW: IRS 2 bis 12; SD = 3,32). Die Läsionen der PanIN-3 Fälle zeigten einen Mittelwert von 10,3 (SPW: IRS 8 bis 12; SD = 1,82). Für das DAC berechnete sich ein Mittelwert von 8,19 (SPW: IRS 2 bis 12; SD = 2,79). (Siehe Abbildung 17).

Tabelle 27: Detailansicht der untersuchten Gruppen gefärbt mit dem Antikörper TMPRSS4

Gruppen	Anzahl
Normale Pankreasgänge	35
PanIN-1a	29
PanIN-1b	38
PanIN-2	23
PanIN-3	10
DAC	47
Gesamt Anzahl	182

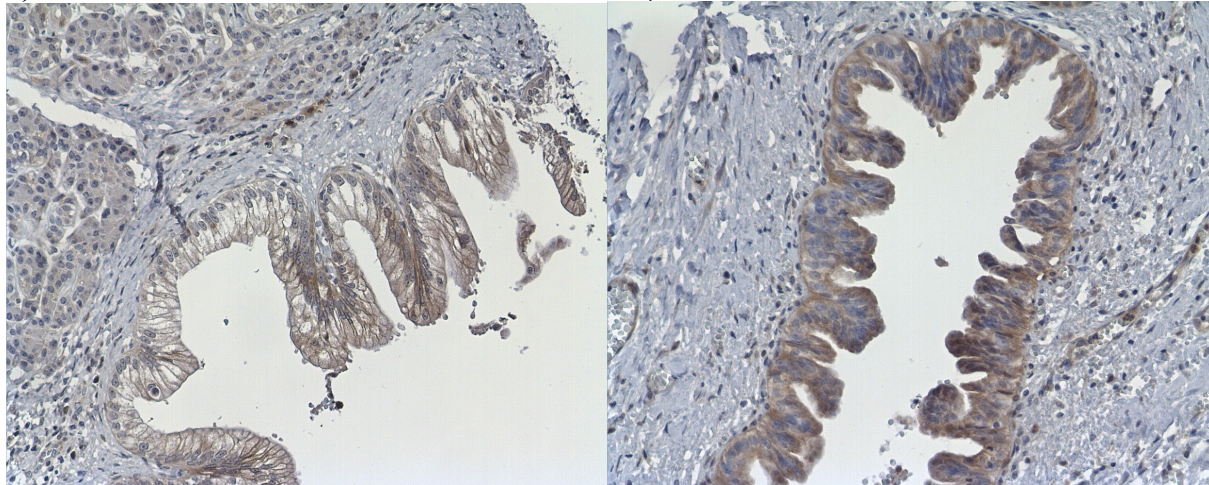
DAC = duktales Adenokarzinom; **PanIN** = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Abbildung 16: Ausgewählte Gewebe-*Microarray*-Ausschnitte gefärbt mit dem Antikörper TMPRSS4



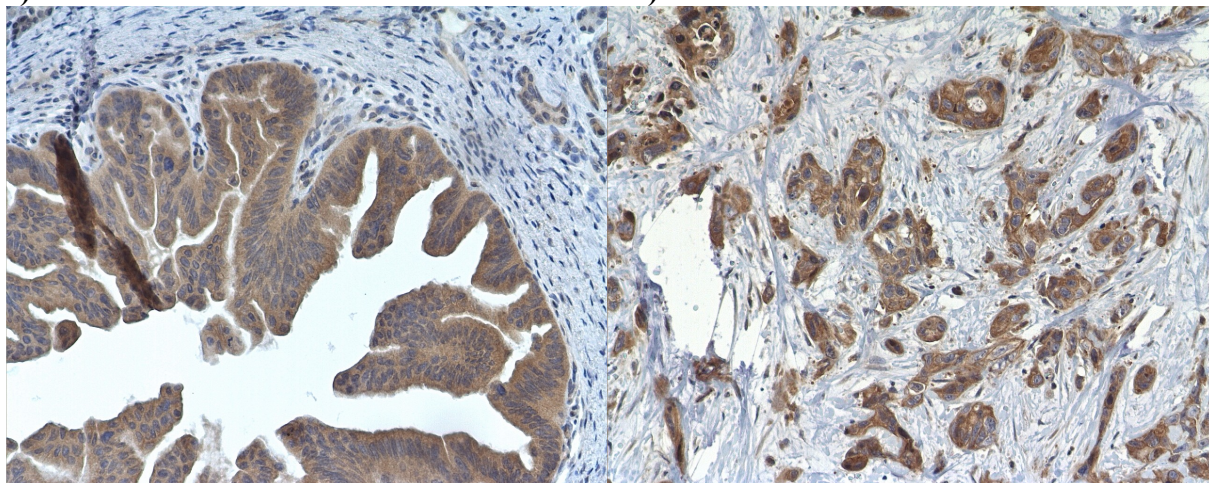
a)

b)



c)

d)

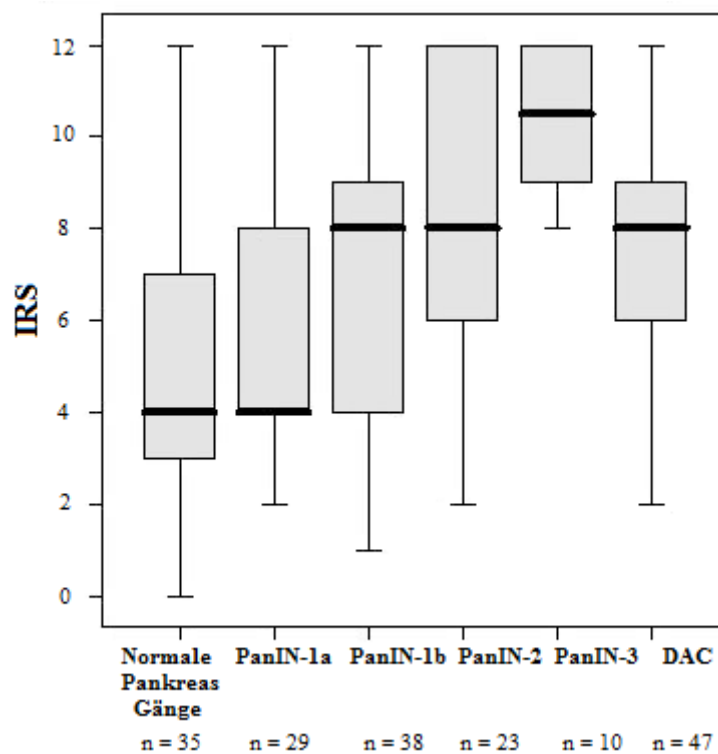


e)

f)

a) Normales Pankreasgangepithel (100fache Vergrößerung) und b) PanIN-1a (400fache Vergrößerung) mit schwacher Expression von TMPRSS4 in den Gangzellen sowie in den Azinuszellen. c) PanIN-1b schwache bis mittelstarke Farbreaktion in den Gangzellen (100fache Vergrößerung), d) PanIN-2 mit Übergang zu PanIN-3 zeigt eine mittelstarke bis starke Expression von TMPRSS4 in den Gangzellen (100fache Vergrößerung), e) PanIN-3 (400fache Vergrößerung) und das f) duktales Adenokarzinom des Pankreas (400fache Vergrößerung) zeigen eine durchgehende, starke Expression von TMPRSS4.

Abbildung 17: Immunreaktiver Score für Tmprss4



DAC = duktales Adenokarzinom, **IRS** = Immunreaktiver Score, **n** = Anzahl;
PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Die Expression des Antikörpers war signifikant unterschiedlich im Kruskal-Wallis-Test mit $p < 0,001$ (siehe Tabelle 28) für die unterschiedlichen Gruppen. Bei Betrachtung der Ränge (Tabelle 28) wird deutlich, dass der mittlere Rang bis zur PanIN-3 stetig zunimmt. Tmprss4 wurde in den *high grade* PanINs signifikant stärker exprimiert als in den normalen Pankreasgängen und in den *low grade* PanINs, was im Mann-Whitney-U-Test mit einem $p < 0,001$ deutlich wird (siehe Tabelle 29). Der Antikörper Tmprss4 wurde zudem im duktales Adenokarzinom statistisch signifikant stärker exprimiert als im normalen Pankreasgangepithel ($p < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test, siehe Tabelle 30).

Tabelle 28: Kruskal-Wallis Test für TMRSS4

Kruskal-Wallis-Test - TMRSS4		
Gruppen	Anzahl	Mittlerer Rang
Normale Pankreasgänge	35	55,61
PanIN-1a	29	65,52
PanIN-1b	38	98,38
PanIN-2	23	113,59
PanIN-3	10	145,45
DAC	47	106,4
Gesamt	182	
p-Wert < 0,001		

DAC = duktales Adenokarzinom; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Tabelle 29: Mann-Whitney-U-Test für TMRSS4: Normale Pankreasgänge und *low grade* PanINs versus *high grade* PanINs

Mann-Whitney-U-Test:		Anzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gruppe 1 vs. Gruppe 2				
Gruppe 1	normale Gänge und <i>low grade</i> PanINs	102	59,51	6070,5
Gruppe 2	<i>high grade</i> PanINs	33	94,23	3109,5
		135		
p-Wert < 0,001				

vs.= versus, *low grade* PanINs = PanIN-1a und PanIN-1b, *high grade* PanINs = PanIN-2 und PanIN-3; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

Tabelle 30: Mann-Whitney-U-Test für TMRSS4: Normale Pankreasgänge versus duktales Pankreaskarzinom

Mann-Whitney-U-Test		Anzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gruppe 1 vs. Gruppe 2				
Gruppe 1	Normale Pankreasgänge	35	27,87	975,5
Gruppe 2	DAC	47	51,65	2427,5
		82		
p-Wert < 0,001				

vs.= versus, DAC = duktales Adenokarzinom; PanIN = pankreatisch intraepitheliale Neoplasie

4 Diskussion

Das Pankreaskarzinom hat trotz verbesserter Operationsverfahren eine sehr schlechte Prognose. Nur etwa 10 - 15 % der Patienten kommen für eine radikale Pankreatoduodenektomie in Frage. Die fünf-Jahres-Überlebensrate ist bei den wenigen operablen Fällen trotz kurativer Zielsetzung mit 15 - 40 % sehr niedrig [Koopmann, 2004]. In der Pathogenese des Pankreaskarzinoms handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, in dem verschiedene Gene involviert sind. Angenommen wird eine kontinuierliche Häufung von genetischen Veränderungen vom normalen Pankreasgangepithel über verschiedene pankreatische intraepitheliale Neoplasien bis hin zum invasiven Adenokarzinom. Beteiligt sind an der Pankreaskarzinogenese verschiedene Onkogene, wie *K-ras* oder *Her2/neu* und inaktivierte Tumorsuppressorgene wie *p16*, *dpc4*, *p53*, die zu einem gestörten Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Apoptose führen [Moskaluk, 1997; Hruban, 2000; Lüttges, 2001; Lühr, 2005; Prasad, 2005].

Mit Hilfe der DNA-*Microarray*-Technologie sind bis dato über 1500 Gene bekannt, die im Pankreaskarzinom pathologisch exprimiert sind [Crnogorac-Jurcevic, 2002; Logsdon, 2003; Grützmann, 2004; Hustinx, 2004; Mahlamaki, 2004]. Die Information über pathologisch exprimierte Gene beim duktalem Pankreasadenokarzinom ist für die Entwicklung neuer Therapie-, Screening- und Nachsorgemethoden ein wichtiger Schritt. Mit dieser Information kann nämlich gezielt nach Genen gesucht werden, die bei der Initiation und Progression des Pankreaskarzinoms beteiligt sein könnten. Um herauszufinden welche der pathologisch exprimierten Gene auch zu einer veränderten Proteinexpression führen, ist es erforderlich, diese Kandidaten auf Proteinebene zu validieren. Für diese Arbeit wurden sechs Kandidatengene ausgesucht, die von Grützmann et al. 2004 als überexprimiert im Pankreaskarzinom publiziert wurden: *anxa-2* (Annexin A2), *hk-10* (*Kallikrein-related peptidase 10*), *mcm2* (*Minichromosom maintenance deficient 2*), *mcm7* (*Minichromosom maintenance deficient 7*), *mmp11* (Matrix Metalloproteinase 11), *tmprss4* (*transmembrane protease, serine 4*). Diese Proteine wurden mit Hilfe von paraffingängigen Antikörpern, der Immunhistochemie und der Gewebe-*Microarray*-Technologie auf Proteinebene untersucht. Ziel dieser Untersuchung war die Identifizierung und Validierung von Proteinen, die beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas von biologischer oder klinischer Relevanz sein könnten.

Ein wichtiges Kriterium für die Suche nach einem geeigneten diagnostischen Marker ist, dass dieser spezifisch für *high grade* PanINs oder für das Karzinom selber sein sollte. Der Grund

hierfür ist, dass *low grade* PanIN Läsionen sehr häufig in der Bevölkerung vorkommen und nicht unbedingt mit einer Entartung des Gewebes einhergehen.

4.1 Immunhistochemische Analyse unterschiedlich exprimierter Gene im Pankreaskarzinom mittels der Gewebe-Microarray Technik

Für die Validierung auf Proteinebene wurden mit Hilfe der Gewebe-*Microarray* Technologie und der Immunhistochemie folgende Antikörper genutzt: Annexin A2, KLK-10, MCM 2, MCM 7, MMP-11 und Tmprss4.

4.1.1 Annexin A2

Anxa-2 kodiert für ein gleichnamiges calciumabhängiges, phospholipidbindendes Protein. Annexin A2 wurde unter den überexprimierten Genen im Pankreaskarzinom für die Validierung auf Proteinebene ausgewählt, da es mit der DNA-Synthese, DNA-Replikation und Zellproliferation interagiert [Jindal, 1991; Liu, 2003]. Ausserdem ist Annexin A2 als *RNA-binding-protein* (RNA-gebundenes Protein) für den Aufbau der *messenger* Ribonucleoproteine (mRNP) mitverantwortlich und somit für eine geregelte Proteinbiosynthese wichtig [Luna, 2008].

Die Annexine sind Substrate einer src-Tyrosinkinase [Raynal, 1994; Chiang, 1999]. Src-Tyrosinkinasen sind in verschiedenen Prozessen, wie beispielsweise im Zellwachstum, in der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation, der Neoangiogenese und der Apoptosis involviert [Huang, 1986; Yezhelyev, 2004]. Diese src-Tyrosinkinase ist in verschiedenen Tumoren, wie zum Beispiel im Pankreas- [Lutz, 1998; Sato, 2002], Mamma- [Lu, 2003; Myoui, 2003] und Kolonkarzinom [Windham, 2002] überexprimiert gefunden worden.

Die Expression von *anxa2* wird von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie Insulin, *fibroblast growth factor* (FGF, Fibroblasten-Wachstumsfaktor) und dem *epidermal growth factor* (EGF, epidermaler Wachstumsfaktor) reguliert [Chiang, 1999; Filipenko, 2004]. Die Überexpression von Wachstumsfaktoren wurde an einer Reihe von Tumoren beschrieben.

Für verschiedene Karzinome ist das Gen *anxa-2* als überexprimiert beschrieben worden, so zum Beispiel für das Pankreas- [Ross, 2000; Grützmann, 2004; Esposito, 2006], für das Mamma- [Andronicos, 2001], für das Kolorektale- [Emoto, 2001] und für das Bronchialkarzinom [Brichory, 2001]. Im Gegensatz dazu ist auch der Verlust an *anxa-2* für Karzinome beschrieben worden, zum Beispiel für das Prostatakarzinom [Chetcuti, 2001].

Annexin A2 liess sich in den Gewebe-*Microarrays* immunhistochemisch, zytoplasmatisch und membrangebunden, wie in der Literatur beschrieben [Vishwanatha, 1993; Raynal, 1994; Cheng, 2005; Kittaka, 2008], nachweisen. In den normalen Pankreasgängen liess sich Annexin A2 schwach nachweisen. Die Ergebnisse für die duktaalen Adenokarzinomen schwankten: es gab Karzinome, wo Annexin A2 nicht gefärbt und Karzinome, wo Annexin A2 sehr stark gefärbt wurde. Der Unterschied zwischen der *anxa-2* Expression in normalen Pankreasgängen und Karzinomen zeigte sich als signifikant. Da Annexin A2 in den pankreatischen duktaalen Adenokarzinomen eine positive Farbreaktion zeigte, ist es von Bedeutung, ob und wie dieses Protein in den Vorläuferläsionen exprimiert wird. In dieser Arbeit wurde erstmalig Annexin A2 in PanINs getestet. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass in den *low grade* PanINs Annexin A2 schwächer gefärbt wurde als in den *high grade* PanINs. Es wurde also eine stufenweise stärkere Anfärbung des Proteins in den Vorläuferläsionen beobachtet. Der Unterschied zwischen *low grade* PanINs und *high grade* PanINs war signifikant. Die Farbexpression von Annexin A2 war in den PanIN-3 Läsionen höher als im duktaalen Adenokarzinom. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Überexpression von *anxa-2* in einem Teil der duktaalen Adenokarzinome eine Rolle spielt. Ähnliche Ergebnisse wurden von Vishwanatha et al. 1993 publiziert. Vishwanatha et al. beschreiben eine veränderte Expression von Annexin A2 im PDAC im Vergleich zu den normalen Pankreasepithelzellen.

Dass die Expression von Annexin A2 mit dem Dysplasiegrad der Pankreaskarzinomvorstufen korreliert und im duktaalen Adenokarzinom exprimiert wird, gibt Hoffnungen, dass es möglicherweise als Screening-Marker genutzt werden könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Annexin A2 möglicherweise in der Pathogenese des duktaalen Adenokarzinoms eine Rolle spielt. Dieser Vermutung sollte durch funktionelle Untersuchungen nachgegangen werden.

4.1.2 KLK-10

Kallikrein-related peptidase 10 (hk-10) kodiert für mehrere Serinproteasen. Serinproteasen sind in einer Vielzahl biologischer Prozessen involviert. Zu den Kallikreinen gehören verschiedene Endopeptidasen wie zum Beispiel: Chymotrypsin, Elastase und Pepsin. Kallikrein 10 kann in verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel im Blut, in der Muttermilch oder im Sperma, nachgewiesen werden [Luo, 2001; Borgono, 2004]. Kallikreine können Wachstumsfaktoren [Luo, 2003] und verschiedene Proteasen aktivieren und werden in verschiedenen Drüsen des Körpers sezerniert, beispielsweise in der Bauchspeicheldrüse [Luo,

2003; Paliouras, 2007]. In den Langerhans Inseln des Pankreas aktiviert Kallikrein 10 verschiedene Pro-Hormone [Emami, 2007]. Die proteolytische Aktivität der Kallikreine wird mit Tumorinvasion und Metastasierungsfähigkeit von Karzinomen in Verbindung gebracht [Paliouras, 2007; Emami, 2007]. Sie spielen bei der Metastasierungsfähigkeit von Tumoren insofern eine Rolle, da sie in der Lage sind, Kollagen und andere Bestandteile der extrazellulären Matrix zu spalten und so die Invasion der Tumorzellen zu erleichtern [Borgono, 2004].

Das Gen *hk-10* ist im Pankreas- [Iacobuzio-Donahue, 2003; Sato, 2003; Grützmann, 2004, Yousef, 2004; Paliouras, 2007], Kolon- und Lungenkarzinom [Obiezu, 2005] als überexprimiert beschrieben worden. Beim Ovarialkarzinom ist KLK-10 ein Tumormarker [Luo, 2001; Obiezu, 2005].

KLK-10 zeigte eine mittelstarke zytoplasmatische Anfärbung, was zu den publizierten Daten von Borgono et al, 2004 passt. Zur Zeit gibt es in der Literatur keine Daten zur KLK-10-Expression in PanINs. In dieser Arbeit hat KLK-10 eine sehr schwache Farbreaktion in den normalen Pankreasgängen gezeigt. Im duktalem Adenokarzinom war eine starke Expression von KLK-10 zu beobachten. Da ein signifikanter Unterschied zwischen dem normalen Pankreasepithelien und dem Karzinom bestand, folgte die Untersuchung der Vorläuferläsionen. Im Vergleich zu den *low grade* PanINs, wo eine sehr schwache Farbreaktion zu beobachten war, zeigten die *high grade* PanINs eine stärkere Farbreaktion. Der Vergleich beider PanIN Gruppen war signifikant. KLK-10 zeigte eine spezifische Farbreaktion für dysplastische Epithelveränderungen im Pankreas. Diese Reaktion entsprach stufenweise dem Dysplasiegrad. Da KLK-10 sezerniert wird und im Rahmen dieser Arbeit eine spezifische Reaktion für die *high grade* PanIN Läsionen beobachtet wurde, sollte nach neuen therapeutischen Angriffspunkten und nach Entwicklungsmöglichkeiten für einen Screening Marker gesucht werden. Serinproteasen-Inhibitoren (Serpine) könnten zum Beispiel in der Zukunft für Kallikreine ein medikamentöser Angriffspunkt sein, um die Aktivität dieser Proteasen zu drosseln [Paliouras, 2007].

Die Expression von KLK-10 wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal in PanINs beschrieben.

4.1.3 MCM 2 und MCM 7

An der DNA-Replikation ist der *Mini Chromosome Maintenance complex* (MCM, Minichromosomaler Erhaltungs Komplex) beteiligt. Zum MCM-Komplex gehören sechs Polypeptide (MCM 2 bis MCM 7, *minichromosom maintenance proteins 2 - 7*). Diese

Proteine bilden zusammen mit weiteren Proteinen einen so genannten Prä-Replikationskomplex [Stoeber, 2001]. Nach der Bildung des Prä-Replikationskomplexes sind die Chromatiden zur Replikation imstande. Der Prä-Replikationskomplex gewährleistet durch Bindung an die Chromatiden, dass jeweils nur eine DNA-Replikation pro Zellzyklus stattfindet [Dimitrova, 2002]. Im Anschluß löst sich der Replikationskomplex wieder auf, so dass die MCM-Proteine nur während des Zellzyklus und somit nur in proliferierenden Zellen angetroffen werden. In ruhenden Zellen oder differenzierten Zellen werden MCM Proteine nicht exprimiert. Durch dieses spezifische Vorkommen kann die Expression dieser Proteine als Proliferationsmarker genutzt werden [Freeman, 1999; Stoeber, 2001; Meng, 2001; Obermann, 2005].

Beim Pankreaskarzinom ist die Expression von *mcm2* und *mcm7* in verschiedenen Arbeiten als überexprimiert beschrieben worden [Grützmann, 2004; Li, 2007]. Mahlamaki et al. 2004 konnten beim Pankreaskarzinom eine statistisch relevante Korrelation zwischen der Anzahl an Genkopien und der Expression dieses Gens beobachten.

Eine Überexpression von *mcm2* ist auch beim Prostatakarzinom berichtet worden [Meng, 2001]. *Mcm7* ist im Neuroblastom, Cervix-, Prostata- und Hypopharynxkarzinom überexprimiert [Honeycutt, 2006].

Die kodierten Proteine der als überexprimiert beschriebenen Genen, werden als Screening-Marker für das kolorektale Karzinom [Davies, 2002] und für das Barrett-Epithel als Vorläuferläsion für das Ösophaguskarzinom [Going, 2002] genutzt. Ausserdem dienen MCM Proteine als prognostische Marker für das Nieren- [Rodins, 2002], Prostata- [Meng 2001], Cervix- [Brake, 2003] und Endometriumkarzinom [Li 2005], sowie auch als Prognosemarker für das B-Zell-Lymphom [Obermann, 2005].

In dieser Arbeit konnte für das Pankreaskarzinom bestätigt werden, dass MCM 2 in den Zellpopulationen mit einer höheren Zellteilungsaktivität eine intensivere Zellkernfärbung hatten. Diese Ergebnisse stimmen mit den bisherigen Publikationen überein. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Färbung an normalen Pankreasgängen und dem Karzinom. Ausserdem wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den *low grade* und den *high grade* PanINs gefunden. Ähnliche Ergebnisse wurden mit MCM 7 erzielt. Die Färbexpression für MCM 7 war in den normalen Pankreasepithelien schwach und im Karzinom stark. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den normalen Pankreasgängen und dem Karzinom. Es bestand aber kein signifikanter Unterschied zwischen den *low-* und *high grade* PanINs. Diese Arbeit bestätigt die erhöhte Expression von *mcm2* und *mcm7* auf Proteinebene und die Qualität der Proteine als Proliferationsmarker. Ähnliche

Ergebnisse wurden für das PDAC von Grützmann et al. 2004 und Li et al. 2007 beschrieben. Weitere Ergebnisse zu der Expression in PanINs sind für beide Proteine in der Literatur nicht beschrieben.

4.1.4 MMP-11

Matrix metalloproteinase-11 (*mmp11*) kodiert für ein proteolytisches zinkhaltiges Enzym. Aufzufinden sind diese Proteine entweder in der Zellmembran oder in der extrazellulären Matrix. In der extrazellulären Matrix sind sie in dessen Ab- und Umbau involviert. Da sie die Aktivität verschiedener Zytokine, Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren regulieren, beeinflussen sie die Zellproliferation. Durch proteolytische Destruktion der extrazellulären Matrix erleichtern sie die Zellinvasion, Neo-Angiogenese und somit auch die Tumorvermehrung [von Marschall, 1998; Garcea, 2005].

Mmp11 ist in verschiedenen Arbeiten für das Pankreaskarzinom als überexprimiertes Gen erkannt worden [Iacobuzio-Donahue, 2003; Grützmann, 2004; Hustinx, 2004; Jones, 2004; Laurell, 2006]. Eine erhöhte Genexpression von *mmp11* wird ausserdem für das Magen-, Kolon-, Nieren- und Mammakarzinom beschrieben [Jones, 2004; Deng, 2005; Kasper, 2007; Yang, 2008].

Garcea et al, 2005 haben für unterschiedliche Tumoren eine Überexpression an *mmp11* mit einer schlechteren Prognose, höheren Invasivitätsrate und Metastasenhäufigkeit in Verbindung gebracht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei MMP-11 Antikörper unterschiedlicher Hersteller genutzt. Wie in der Literatur beschrieben, wurde eine Anfärbung des Pankreaskarzinom und eine Farbreaktion des umliegenden Stromas beobachtet [von Marschall, 1998; Jones, 2004]. Es wurde auch eine Anfärbung der verschiedenen Vorläuferläsionen und der normalen Pankreasgangepithelien beobachtet. Eine Relation zum Dysplasiegrad konnte mit beiden getesteten Antikörpern nicht beobachtet werden. Die Färbung mit MMP-11 der Firma *Diagnostic Biosystems* war für alle getesteten Gruppen sehr schwach. Bei MMP-11 der Firma *AnaSpec* wurde eine gleichmäßig starke Färbung in allen untersuchten Gruppen beobachtet. Es bestand für beide getesteten MMP-11 Antikörper kein statistisch signifikanter Unterschied für die untersuchten Gruppen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sind beide getesteten Antikörper nicht geeignet um zwischen niedrig- und hoch dysplastischen PanINs oder zwischen normalen Pankreasgängen und Karzinom zu unterscheiden. Jones et al., 2004 konnten nur für das Stroma des Pankreaskarzinoms eine spezifische Farbreaktion beobachten, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt. Von Marschall et al. 1998, beschrieb im PDAC

Stroma in 80% der Fälle eine positive Farbreaktion für MMP-11. Außerdem wurde eine stärkere Farbreaktion im Stroma als im Karzinom beschrieben. Im Unterschied zu dieser Arbeit beschreiben Marschall et al., 1998 keine positive Farbreaktion in den normalen Pankreasgängen. Die Signifikanz von MMP-11 sollte mit weiteren immunhistochemisch tauglichen Antikörpern, die zur Zeit nicht zur Verfügung stehen, untersucht werden.

4.1.5 TMPRSS4

Das Gen *tmprss4* (*transmembrane protease, serine 4*) kodiert wie *hk-10* (siehe 4.1.2.) für eine Serinprotease, die gemeinsam mit anderen Proteasen für die proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix wichtig ist. Dieser enzymatische Abbau ist für eine Tumordinvasion und die damit verbundene Metastasierungsfähigkeit, Invasivität und Neo-Angiogenese essentiell [Wallrapp, 2000; Jung, 2008].

Für das Pankreaskarzinom ist das Gen *tmprss4* als überexprimiert beschrieben worden [Gress, 1997; Wallrapp, 2000; Grützmann, 2004; Dawelbait, 2007]. Ausserdem wird *tmprss4* für das Kolon- und für das Magenkarzinom als überexprimiert beschrieben [Jung, 2008]. Für das Schilddrüsenkarzinom ist TMPRSS4 als ein spezifischer diagnostischer Marker beschrieben worden [Kebebew, 2005]. Jung beschreibt TMPRSS4 als Initiator für die Invasion, Migration und Metastasierungsfähigkeit verschiedener Tumore [Jung, 2008].

Das von *tmprss4* kodierte Protein ist laut Wallrapp et al. 2000 Membran gebunden und wird nur sehr schwach im normalen Pankreasgewebe gefärbt angetroffen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Wallrapps Ergebnisse zum Teil reproduziert werden. Das Protein wurde sowohl Membran gebunden als auch zytoplasmatisch beobachtet. Außerdem wurde TMPRSS4 schwach in Azinus- und Stromazellen beobachtet. In dieser Arbeit fand sich im normalen Pankreasgewebe eine mittelstarke Anfärbung. Im duktalem Adenokarzinom wurde eine starke Farbreaktion beobachtet. Da ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen bestand, wurden die Vorläuferläsionen auf die Expression von TMPRSS4 untersucht. Im Vergleich *low*- und *high grade* PanINs fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied.

Die Hemmung der proteolytischen Aktivität könnte die Invasivität von Karzinomen vermindern. Die Relevanz von TMPRSS4 sollte funktionell *in vivo* untersucht werden, da das Expressionsmuster dieses Proteins viel versprechend ist hinsichtlich eines möglichen Therapietarget für das Pankreaskarzinom. Weitere Untersuchungen sollten folgen, um TMPRSS4 als mögliches Therapietarget zu prüfen.

Mit Hilfe dieser Arbeit wurden sechs Gene, die zuvor im duktalem Pankreasadenokarzinom als überexprimiert identifiziert wurden, auf Proteinebene untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die kodierten Proteine von den im Pankreaskarzinom überexprimierten Genen *anxa2*, *hk-10*, *mcm2*, *mcm7*, *mmp11* und *tmprss4* auf Proteinebene exprimiert werden.

Ein wichtiges Kriterium für die Suche nach neuen Therapie- und Diagnostikmöglichkeiten ist, dass dieser spezifisch für *high grade* PanINs sein sollte, da *low grade* PanINs häufig in der Bevölkerung anzutreffen sind. Annexin A2, KLK-10 und MCM 2 wurden in den *low grade* PanINs im Vergleich zu den *high grade* PanINs schwach exprimiert. Für MCM 7 ist mit Ausnahme der PanIN-1b Läsionen kaum eine Expression in den normalen Pankreasgängen und in den PanIN-1a Läsionen zu vermerken. Zudem zeigte MCM7 keine statistische Signifikanz in der Unterscheidung zwischen *low-* und *high grade* PanINs. Der Antikörper Tmprss4 zeigte im Vergleich zu den anderen Antikörpern eine relativ stärkere Anfärbung in allen untersuchten Gewebegruppen.

Die Antigene Annexin A2, KLK-10, MCM 2 und Tmprss4 sind potentiell gut geeignete diagnostische Marker, da sie die Unterscheidung zwischen *low-* und *high grade* PanINs ermöglichen.

Sezernierte und Membran gebundene Proteine erweitern die Möglichkeit, neue Screeningmethoden, Therapieziele und Nachsorgeweiterentwicklungen für das Pankreaskarzinom zu finden. KLK-10 könnte als sezerniertes Protein, als diagnostischer Marker und/oder als Angriffspunkt für Medikamente fungieren. Diese Eigenschaft könnte für die Entwicklung eines Screening-Markers oder Biomarkers genutzt werden.

Für die Entwicklung von Immuntoxinen, beispielsweise in Form von Medikamenten, ist die Entdeckung von spezifischen Markern von enormer Bedeutung. Besonders Proteine, die Membran gebunden oder für die Zelladhäsion mitverantwortlich sind, sind hier von besonderem Interesse. Tmprss4 und Annexin A2 könnten für die Weiterentwicklung für Immun- und/oder Chemotherapien zwei geeignete Kandidaten sein. Beide Proteine sind für die Zellproliferation wichtig und könnten Angriffspunkte für Therapien darstellen, die eine weitere Tumorprogression durch Störung der Zell-Zell-Interaktion und Zellproliferation verhindern. Durch Beeinträchtigung dieser Signalwege könnte ein Tumorwachstum gehemmt und sogar ein Absterben der Tumorzellen begünstigt werden. Diese Therapieform wird zum Beispiel für das Mammakarzinom nach der Prüfung, ob das Gen *Her2/neu* überexprimiert ist angewandt.

5 Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse weist eine schlechte Prognose auf. Bedingt durch mangelnde Frühsymptome und der frühen Metastasierung beträgt die fünf-Jahresüberlebensrate unter fünf Prozent. Die mangelnde Sensitivität der nicht-invasiven, bildgebenden Verfahren, bedingt durch die retroperitoneale Lage des Pankreas, machen eine Frühdiagnostik und Screening des Pankreaskarzinoms zur Zeit nicht möglich.

Die Tumorprogression des duktales Pankreasadenokarzinoms verläuft über verschiedene Krebsvorstufen. Diese pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) werden nach ihrer Morphologie in PanIN-1a-, PanIN-1b-, PanIN-2- und PanIN-3-Läsionen unterteilt.

Auf der Suche nach weiteren Erkenntnissen über die Tumorigenese und Progression dieses Karzinoms sind bisher über 1500 verschiedene Gene publiziert worden, die im Pankreaskarzinom differenziell über- oder unterexprimiert werden. Diese Genexpressionsanalysen versuchen, mögliche Zielgene für eine verbesserte Frühdiagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms zu identifizieren. Zur Identifizierung neuer potentieller therapeutischer Angriffspunkte, ist es notwendig diese Gene auf Proteinebene zu validieren.

Ziel dieser Arbeit war es, sechs überexprimierte Gene des duktales Pankreasadenokarzinoms (*anxa2*, *hk-10*, *mcm2*, *mcm7*, *mmp11*, *tmprss4*) auf Proteinebene mit Hilfe der Gewebe-*Microarray*-Technologie und der Immunhistochemie zu validieren. Durch die immunhistochemische Analyse der überexprimierten Kandidatengene wurde die Expression auf Proteinebene untersucht und geprüft, ob diese Gene als mögliche Marker für das Pankreaskarzinom und seine Vorstufen geeignet sind.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die Expression von *anxa2*, *hk-10*, *mcm2*, *mcm7*, *mmp11* und *tmprss4* auf Proteinebene zu validieren.

MCM 2 und MCM 7 wurden erstmals auf Proteinebene im Pankreaskarzinom untersucht. Die Expression von MCM 2 korreliert mit der Tumorprogression und zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen *low*- und *high grade* PanINs, sowie zum Pankreasadenokarzinom. MCM 2 wurde als ein möglicher Proliferationsmarker für das duktales Pankreaskarzinom identifiziert. MCM 7 zeigte eine statistisch signifikante stärkere Expression im DAC im Vergleich zu den normalen Pankreasepithelzellen, aber keine statistische Signifikanz in der Unterscheidung zwischen *low*- und *high grade* PanINs.

Annexin A2 wurde erstmals in PanINs getestet und zeigte gemeinsam mit KLK-10, MCM 2 und TMPRSS4 eine signifikant unterschiedliche Expression zwischen den *low*- und *high grade* PanINs sowie zum PDAC. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die jeweiligen

Gene (*anxa2*, *hk-10*, *mcm2*, und *tmprss4*) eine Rolle in der Tumorigenese von einem Teil der duktaalen Pankreasadenokarzinome und deren Vorstufen spielen könnten.

Färbungen mit dem Antikörper MMP-11 erfolgten mit zwei Antikörpern unterschiedlicher Hersteller. Mit beiden MMP-11 Antikörper wurde eine Anfärbung der normalen Pankreasepithelzellen, der pankreatischen intraepithelialen Neoplasien, des duktaalen Pankreasadenokarzinoms und des umliegenden Stroma beobachtet, aber kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression der untersuchten Gruppen gefunden.

Diese Arbeit stellt eine Grundlage für weitere Untersuchungen und für die Weiterentwicklung von neuen Therapie- und diagnostischen Möglichkeiten dar. Die Ergebnisse der getesteten Antikörper stellen einen der vielen Grundbausteine dar, um mögliche Markerproteine, wie Tumormarker, Biomarker oder diagnostische Marker identifizieren zu können, um die Prognose und die Präventionsmöglichkeiten des duktaalen Pankreasadenokarzinoms zu verbessern.

6 Literaturverzeichnis

- Andronicos, N. M., and M. Ranson (2001)**, "The topology of plasminogen binding and activation on the surface of human breast cancer cells", *Br J Cancer* 85 (6):909-916.
- Boenisch, T. (2003)**. Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden. 3. Auflage; hrsg. v. Boenisch T; Dako Cytomation Verlag, Hamburg 2003, 34 - 42
- Borgono, C. A., I. P. Michael, and E. P. Diamandis (2004)**, "Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer", *Mol Cancer Res* 2 (5):257-280.
- Brake, T., J. P. Connor, D. G. Petereit, and P. F. Lambert (2003)**, "Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human cervical cancer", *Cancer Res* 63 (23):8173-8180.
- Brichory, F. M., D. E. Misek, A. M. Yim, M. C. Krause, T. J. Giordano, D. G. Beer, and S. M. Hanash (2001)**, "An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer", *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (17):9824-9829.
- Cheng, C. W., A. Rifai, S. M. Ka, H. A. Shui, Y. F. Lin, W. H. Lee, and A. Chen (2005)**, "Calcium-binding proteins annexin A2 and S100A6 are sensors of tubular injury and recovery in acute renal failure", *Kidney Int* 68 (6):2694-2703.
- Chetcuti, A., S. H. Margan, P. Russell, S. Mann, D. S. Millar, S. J. Clark, J. Rogers, D. J. Handelsman, and Q. Dong (2001)**, "Loss of annexin II heavy and light chains in prostate cancer and its precursors", *Cancer Res* 61 (17):6331-6334.
- Chiang, Y., A. Rizzino, Z. A. Sibenaller, M. S. Wold, and J. K. Vishwanatha (1999)**, "Specific down-regulation of annexin II expression in human cells interferes with cell proliferation", *Mol Cell Biochem* 199 (1-2):139-147.
- Crnogorac-Jurcevic, T., E. Efthimiou, T. Nielsen, J. Loader, B. Terris, G. Stamp, A. Baron, A. Scarpa, and N. R. Lemoine (2002)**, "Expression profiling of microdissected pancreatic adenocarcinomas", *Oncogene* 21 (29):4587-4594.
- Davies, R. J., A. Freeman, L. S. Morris, S. Bingham, S. Dilworth, I. Scott, R. A. Laskey, R. Miller, and N. Coleman (2002)**, "Analysis of minichromosome maintenance proteins as a novel method for detection of colorectal cancer in stool", *Lancet* 359 (9321):1917-1919.

- Dawelbait, G., C. Winter, Y. Zhang, C. Pilarsky, R. Grutzmann, J. C. Heinrich, and M. Schroeder (2007)**, "Structural templates predict novel protein interactions and targets from pancreas tumour gene expression data", *Bioinformatics* 23 (13):i115-124.
- Deng, H., R. F. Guo, W. M. Li, M. Zhao, and Y. Y. Lu (2005)**, "Matrix metalloproteinase 11 depletion inhibits cell proliferation in gastric cancer cells", *Biochem Biophys Res Commun* 326 (2):274-281.
- Dimitrova, D. S., T. A. Prokhorova, J. J. Blow, I. T. Todorov, and D. M. Gilbert (2002)**, "Mammalian nuclei become licensed for DNA replication during late telophase", *J Cell Sci* 115 (Pt 1):51-59.
- Emami, N., and E. P. Diamandis (2007)**, "Human tissue kallikreins: a road under construction", *Clin Chim Acta* 381 (1):78-84.
- Emoto, K., Y. Yamada, H. Sawada, H. Fujimoto, M. Ueno, T. Takayama, K. Kamada, A. Naito, S. Hirao, and Y. Nakajima (2001)**, "Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma", *Cancer* 92 (6):1419-1426.
- Esposito, I., R. Penzel, M. Chaib-Harriche, U. Barcena, F. Bergmann, S. Riedl, H. Kayed, N. Giese, J. Kleeff, H. Friess, and P. Schirmacher (2006)**, "Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis", *J Pathol* 208 (5):673-685.
- Filipenko, N. R., T. J. MacLeod, C. S. Yoon, and D. M. Waisman (2004)**, "Annexin A2 is a novel RNA-binding protein", *J Biol Chem* 279 (10):8723-8731.
- Freeman, A., L. S. Morris, A. D. Mills, K. Stoeber, R. A. Laskey, G. H. Williams, and N. Coleman (1999)**, "Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy", *Clin Cancer Res* 5 (8):2121-2132.
- Garcea, G., C. P. Neal, C. J. Pattenden, W. P. Steward, and D. P. Berry (2005)**, "Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review", *Eur J Cancer* 41 (15):2213-2236.
- Gerke, V., and S. E. Moss (2002)**, "Annexins: from structure to function", *Physiol Rev* 82 (2):331-371.
- Going, J. J., W. N. Keith, L. Neilson, K. Stoeber, R. C. Stuart, and G. H. Williams (2002)**, "Aberrant expression of minichromosome maintenance proteins 2 and 5, and Ki-67 in dysplastic squamous oesophageal epithelium and Barrett's mucosa", *Gut* 50 (3):373-377.

- Gress, T. M., C. Wallrapp, M. Frohme, F. Muller-Pillasch, U. Lacher, H. Friess, M. Buchler, G. Adler, and J. D. Hoheisel (1997)**, "Identification of genes with specific expression in pancreatic cancer by cDNA representational difference analysis", *Genes Chromosomes Cancer* 19 (2):97-103.
- Grützmann, R., C. Pilarsky, O. Ammerpohl, J. Lüttges, A. Böhme, B. Sipos, M. Foerder, I. Alldinger, B. Jahnke, H. K. Schackert, H. Kalthoff, B. Kremer, G. Klöppel, and H. D. Saeger (2004)**, "Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays", *Neoplasia* 6 (5):611-622.
- Honeycutt, K. A., Z. Chen, M. I. Koster, M. Miers, J. Nuchtern, J. Hicks, D. R. Roop, and J. M. Shohet (2006)**, "Deregulated minichromosomal maintenance protein MCM7 contributes to oncogene driven tumorigenesis", *Oncogene* 25 (29):4027-4032.
- Hruban, R. H., M. Goggins, J. Parsons, and S. E. Kern (2000)**, "Progression model for pancreatic cancer", *Clin Cancer Res* 6 (8):2969-2972.
- Hruban, R. H., N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, C. Compton, E. S. Garrett, S. N. Goodman, S. E. Kern, D. S. Klimstra, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges, and G. J. Offerhaus (2001)**, "Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions", *Am J Surg Pathol* 25 (5):579-586.
- Huang, K. S., B. P. Wallner, R. J. Mattaliano, R. Tizard, C. Burne, A. Frey, C. Hession, P. McGray, L. K. Sinclair, E. P. Chow, J. L. Browning, K. L. Ramachandran, J. Tang, J. E. Smart and R. B. Pepinsky (1986)**, "Two human 35 kd inhibitors of phospholipase A2 are related to substrates of pp60v-src and of the epidermal growth factor receptor/kinase", *Cell* 46 (2):191-199.
- Hustinx, S. R., D. Cao, A. Maitra, N. Sato, S. T. Martin, D. Sudhir, C. Iacobuzio-Donahue, J. L. Cameron, C. J. Yeo, S. E. Kern, M. Goggins, J. Mollenhauer, A. Pandey, and R. H. Hruban (2004)**, "Differentially expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas identified through serial analysis of gene expression", *Cancer Biol Ther* 3 (12):1254-1261.
- Iacobuzio-Donahue, C. A., R. Ashfaq, A. Maitra, N. V. Adsay, G. L. Shen-Ong, K. Berg, M. A. Hollingsworth, J. L. Cameron, C. J. Yeo, S. E. Kern, M. Goggins, and R. H. Hruban (2003)**, "Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies", *Cancer Res* 63 (24):8614-8622.

- Iacobuzio-Donahue, C. A., A. Maitra, M. Olsen, A. W. Lowe, N. T. van Heek, C. Rosty, K. Walter, N. Sato, A. Parker, R. Ashfaq, E. Jaffee, B. Ryu, J. Jones, J. R. Eshleman, C. J. Yeo, J. L. Cameron, S. E. Kern, R. H. Hruban, P. O. Brown, and M. Goggins (2003)**, "Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays", *Am J Pathol* 162 (4):1151-1162.
- Jindal, H. K., W. G. Chaney, C. W. Anderson, R. G. Davis, and J. K. Vishwanatha (1991)**, "The protein-tyrosine kinase substrate, calpactin I heavy chain (p36), is part of the primer recognition protein complex that interacts with DNA polymerase alpha", *J Biol Chem* 266 (8):5169-5176.
- Jones, L. E., M. J. Humphreys, F. Campbell, J. P. Neoptolemos, and M. T. Boyd (2004)**, "Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival", *Clin Cancer Res* 10 (8):2832-2845.
- Jung, H., K. P. Lee, S. J. Park, J. H. Park, Y. S. Jang, S. Y. Choi, J. G. Jung, K. Jo, D. Y. Park, J. H. Yoon, J. H. Park, D. S. Lim, G. R. Hong, C. Choi, Y. K. Park, J. W. Lee, H. J. Hong, S. Kim, and Y. W. Park (2008)**, "TMPRSS4 promotes invasion, migration and metastasis of human tumor cells by facilitating an epithelial-mesenchymal transition", *Oncogene* 27 (18):2635-2647.
- Kallioniemi, O. P., U. Wagner, J. Kononen, and G. Sauter (2001)**, "Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer", *Hum Mol Genet* 10 (7):657-662.
- Kasper, G., M. Reule, M. Tschirschmann, N. Dankert, K. Stout-Weider, R. Lauster, E. Schrock, D. Mennerich, G. N. Duda, and K. E. Lehmann (2007)**, "Stromelysin-3 over-expression enhances tumorigenesis in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines: involvement of the IGF-1 signalling pathway", *BMC Cancer* 7:12.
- Kebebew, E., M. Peng, E. Reiff, Q. Y. Duh, O. H. Clark, and A. McMillan (2005)**, "ECM1 and TMPRSS4 are diagnostic markers of malignant thyroid neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy", *Ann Surg* 242 (3):353-361; discussion 361-353.
- Kittaka, N., I. Takemasa, Y. Takeda, S. Marubashi, H. Nagano, K. Umeshita, K. Dono, K. Matsubara, N. Matsuura, and M. Monden (2008)**, "Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma provides deeper biological insight from genomic data", *Eur J Cancer* 44 (6):885-897.

- Klöppel, G. (1997)**, "Exokrines Pankreas", in Remmele W (ed.), *Pathologie*, Bd. 3., 2 edn. Berlin: Springer, 335-390.
- Kononen, J., L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. J. Mihatsch, G. Sauter, and O. P. Kallioniemi (1998)**, "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens", *Nat Med* 4 (7):844-847.
- Koopmann, J., Z. Zhang, N. White, J. Rosenzweig, N. Fedarko, S. Jagannath, M. I. Canto, C. J. Yeo, D. W. Chan, and M. Goggins (2004)**, "Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry", *Clin Cancer Res* 10 (3):860-868.
- Laboratories, S. (2005)**. "Tissue Array" Retrieved 07.05.2008, 2008, from <http://www.tissue-array.com/ver3/index.php>.
- Laurell, H., M. Bouisson, P. Berthelemy, P. Rochaix, S. Dejean, P. Besse, C. Susini, L. Pradayrol, N. Vaysse, and L. Buscail (2006)**, "Identification of biomarkers of human pancreatic adenocarcinomas by expression profiling and validation with gene expression analysis in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples", *World J Gastroenterol* 12 (21):3344-3351.
- Levy, A., J. Zucman, O. Delattre, M. G. Mattei, M. C. Rio, and P. Basset (1992)**, "Assignment of the human stromelysin 3 (STMY3) gene to the q11.2 region of chromosome 22", *Genomics* 13 (3):881-883.
- Li, S. S., W. C. Xue, U. S. Khoo, H. Y. Ngan, K. Y. Chan, I. Y. Tam, P. M. Chiu, P. P. Ip, K. F. Tam, and A. N. Cheung (2005)**, "Replicative MCM7 protein as a proliferation marker in endometrial carcinoma: a tissue microarray and clinicopathological analysis", *Histopathology* 46 (3):307-313.
- Li, Y., J. Pan, J. L. Li, J. H. Lee, C. Tunkey, K. Saraf, J. C. Garbe, M. Z. Whitley, S. A. Jelinsky, M. R. Stampfer, and S. A. Haney (2007)**, "Transcriptional changes associated with breast cancer occur as normal human mammary epithelial cells overcome senescence barriers and become immortalized", *Mol Cancer* 6:7.
- Liu, X. L., D. E. Wazer, K. Watanabe, and V. Band (1996)**, "Identification of a novel serine protease-like gene, the expression of which is down-regulated during breast cancer progression", *Cancer Res* 56 (14):3371-3379.
- Liu, J., C. A. Rothermund, J. Ayala-Sanmartin, and J. K. Vishwanatha (2003)**, "Nuclear annexin II negatively regulates growth of LNCaP cells and substitution of ser 11 and 25 to glu prevents nucleo-cytoplasmic shuttling of annexin II", *BMC Biochem* 4:10.

- Logsdon, C. D., D. M. Simeone, C. Binkley, T. Arumugam, J. K. Greenon, T. J. Giordano, D. E. Misek, R. Kuick, and S. Hanash (2003)**, "Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer", *Cancer Res* 63 (10):2649-2657.
- Löhr, M., G. Klöppel, P. Maisonneuve, A. B. Lowenfels, and J. Lüttges (2005)**, "Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis", *Neoplasia* 7 (1):17-23.
- Lowenfels, A. B., and P. Maisonneuve (2004)**, "Epidemiology and prevention of pancreatic cancer", *Jpn J Clin Oncol* 34 (5):238-244.
- Lu, Y., Q. Yu, J. H. Liu, J. Zhang, H. Wang, D. Koul, J. S. McMurray, X. Fang, W. K. Yung, K. A. Siminovitch, and G. B. Mills (2003)**, "Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades", *J Biol Chem* 278 (41):40057-40066.
- Luna, R., H. Gaillard, C. Gonzalez-Aguilera, and A. Aguilera (2008)**, "Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus", *Chromosoma*.
- Luo, L. Y., P. Bunting, A. Scorilas, and E. P. Diamandis (2001)**, "Human kallikrein 10: a novel tumor marker for ovarian carcinoma?" *Clin Chim Acta* 306 (1-2):111-118.
- Luo, L. Y., D. Katsaros, A. Scorilas, S. Fracchioli, R. Bellino, M. van Gramberen, H. de Bruijn, A. Henrik, U. H. Stenman, M. Massobrio, A. G. van der Zee, I. Vergote, and E. P. Diamandis (2003)**, "The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer diagnosis and prognosis", *Cancer Res* 63 (4):807-811.
- Lüttges, J., S. Schemm, I. Vogel, J. Hedderich, B. Kremer, and G. Klöppel (2000)**, "The grade of pancreatic ductal carcinoma is an independent prognostic factor and is superior to the immunohistochemical assessment of proliferation", *J Pathol* 191 (2):154-161.
- Lüttges, J., H. Galehdari, V. Brocker, I. Schwarte-Waldhoff, D. Henne-Bruns, G. Klöppel, W. Schmiegel, and S. A. Hahn (2001)**, "Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis", *Am J Pathol* 158 (5):1677-1683.
- Lüttges, J., and Klöppel, G. (2005)**, "Das duktales Pankreaskarzinom und seine Vorläufer", *Der Pathologe* 26 (1):12-17.

- Lutz, M. P., I. B. Esser, B. B. Flossmann-Kast, R. Vogelmann, H. Luhrs, H. Friess, M. W. Buchler, and G. Adler (1998)**, "Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma", *Biochem Biophys Res Commun* 243 (2):503-508.
- Mahlamaki, E. H., P. Kauraniemi, O. Monni, M. Wolf, S. Hautaniemi, and A. Kallioniemi (2004)**, "High-resolution genomic and expression profiling reveals 105 putative amplification target genes in pancreatic cancer", *Neoplasia* 6 (5):432-439.
- Meng, M. V., G. D. Grossfeld, G. H. Williams, S. Dilworth, K. Stoeber, T. W. Mulley, V. Weinberg, P. R. Carroll, and T. D. Tlsty (2001)**, "Minichromosome maintenance protein 2 expression in prostate: characterization and association with outcome after therapy for cancer", *Clin Cancer Res* 7 (9):2712-2718.
- Michaud, D. S. (2004)**, "Epidemiology of pancreatic cancer", *Minerva Chir* 59 (2):99-111.
- Mincheva, A., I. Todorov, D. Werner, T. M. Fink, and P. Lichter (1994)**, "The human gene for nuclear protein BM28 (CDCL1), a new member of the early S-phase family of proteins, maps to chromosome band 3q21", *Cytogenet Cell Genet* 65 (4):276-277.
- Moskaluk, C. A., R. H. Hruban, and S. E. Kern (1997)**, "p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma", *Cancer Res* 57 (11):2140-2143.
- Myoui, A., R. Nishimura, P. J. Williams, T. Hiraga, D. Tamura, T. Michigami, G. R. Mundy, and T. Yoneda (2003)**, "C-SRC tyrosine kinase activity is associated with tumor colonization in bone and lung in an animal model of human breast cancer metastasis", *Cancer Res* 63 (16):5028-5033.
- Nakatsuru, S., K. Sudo, and Y. Nakamura (1995)**, "Isolation and mapping of a human gene (MCM2) encoding a product homologous to yeast proteins involved in DNA replication", *Cytogenet Cell Genet* 68 (3-4):226-230.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, H. Friess, C. Bassi, J. A. Dunn, H. Hickey, H. Beger, L. Fernandez-Cruz, C. Dervenis, F. Lacaine, M. Falconi, P. Pederzoli, A. Pap, D. Spooner, D. J. Kerr, and M. W. Buchler (2004)**, "A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer", *N Engl J Med* 350 (12):1200-1210.
- Obermann, E. C., P. Went, A. Zimpfer, A. Tzankov, P. J. Wild, R. Stoehr, S. A. Pileri, and S. Dirnhofer (2005)**, "Expression of minichromosome maintenance protein 2 as a marker for proliferation and prognosis in diffuse large B-cell lymphoma: a tissue microarray and clinico-pathological analysis", *BMC Cancer* 5:162.

- Obiezu, C. V., and E. P. Diamandis (2005)**, "Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer", *Cancer Lett* 224 (1):1-22.
- Orchekowski, R., D. Hamelinck, L. Li, E. Gliwa, M. vanBrocklin, J. A. Marrero, G. F. Vande Woude, Z. Feng, R. Brand, and B. B. Haab (2005)**, "Antibody microarray profiling reveals individual and combined serum proteins associated with pancreatic cancer", *Cancer Res* 65 (23):11193-11202.
- Paliouras, M., C. Borgono, and E. P. Diamandis (2007)**, "Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family", *Cancer Lett* 249 (1):61-79.
- Petraki, C. D., V. N. Karavana, L. Y. Luo, and E. P. Diamandis (2002)**, "Human kallikrein 10 expression in normal tissues by immunohistochemistry", *J Histochem Cytochem* 50 (9):1247-1261.
- Polikoff, D., W. L. Kuo, J. F. Cochran, M. Wernick, D. Kowbel, K. Myambo, and C. C. Collins (1997)**, "Assignment of protease, serine-like 1 (PRSSL1) to human chromosome 19q13 by in situ hybridization and radiation hybrid mapping", *Cytogenet Cell Genet* 79 (1-2):147-148.
- Prasad, N. B., A. V. Biankin, N. Fukushima, A. Maitra, S. Dhara, A. G. Elkhouloun, R. H. Hruban, M. Goggins, and S. D. Leach (2005)**, "Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells", *Cancer Res* 65 (5):1619-1626.
- Raynal, P., and H. B. Pollard (1994)**, "Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins", *Biochim Biophys Acta* 1197 (1):63-93.
- Richard, I., O. Broux, N. Chiannikulchai, F. Fougerousse, V. Allamand, N. Bourg, L. Brenguier, C. Devaud, P. Pasturaud, C. Roudaut, F. Lorenzo, C. Sebastiani-Kabatchis, R. A. Schultz, M. H. Polymeropoulos, G. Gyapay, C. Auffray and Jacques S. Beckmann (1994)**, "Regional localization of human chromosome 15 loci", *Genomics* 23 (3):619-627.
- Rodins, K., M. Cheale, N. Coleman, and S. B. Fox (2002)**, "Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility", *Clin Cancer Res* 8 (4):1075-1081.
- Ross, D. T., U. Scherf, M. B. Eisen, C. M. Perou, C. Rees, P. Spellman, V. Iyer, S. S. Jeffrey, M. Van de Rijn, M. Waltham, A. Pergamenschikov, J. C. Lee, D. Lashkari, D. Shalon, T. G. Myers, J. N. Weinstein, D. Botstein, and P. O. Brown**

- (2000), "Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines", *Nat Genet* 24 (3):227-235.
- Sato, M., T. Tanaka, T. Maeno, Y. Sando, T. Suga, Y. Maeno, H. Sato, R. Nagai, and M. Kurabayashi (2002)**, "Inducible expression of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia in human lung adenocarcinoma A549 cells. Role of Src family kinases-dependent pathway", *Am J Respir Cell Mol Biol* 26 (1):127-134.
- Sato, N., N. Fukushima, A. Maitra, H. Matsubayashi, C. J. Yeo, J. L. Cameron, R. H. Hruban, and M. Goggins (2003)**, "Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays", *Cancer Res* 63 (13):3735-3742.
- Slebos, R. J. C., J. A. Hoppin, P. E. Tolbert, E. A. Holly, J. W. Brock, R. H. Zhang, P. M. Bracci, J. Foley, P. Stockton, L. M. McGregor, G. P. Flake, and J. A. Taylor (2000)**, "K-ras and p53 in Pancreatic Cancer: Association with Medical History, Histopathology, and Environmental Exposures in a Population-based Study." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9: 1223- 1232.
- Stoeber, K., T. D. Tlsty, L. Happerfield, G. A. Thomas, S. Romanov, L. Bobrow, E. D. Williams, and G. H. Williams (2001)**, "DNA replication licensing and human cell proliferation", *J Cell Sci* 114 (Pt 11):2027-2041.
- Thierry-Mieg, D. and J. Thierry-Mieg (2006)**, "A comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation.", *Genome Biology* 7 (Suppl 1):S12.1-S12.14
- Takaori, K., R. H. Hruban, A. Maitra and N. Tanigawa (2004)**, "Pancreatic Intraepithelial Neoplasia." *Pancreas* 28(3): 257-262.
- Vishwanatha, J. K., Y. Chiang, K. D. Kumble, M. A. Hollingsworth, and P. M. Pour (1993)**, "Enhanced expression of annexin II in human pancreatic carcinoma cells and primary pancreatic cancers", *Carcinogenesis* 14 (12):2575-2579.
- Vishwanatha, J. K., and S. Kumble (1993)**, "Involvement of annexin II in DNA replication: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs", *J Cell Sci* 105 (Pt 2):533-540.
- von Marschall, Z., E. O. Riecken, and S. Rosewicz (1998)**, "Stromelysin 3 is overexpressed in human pancreatic carcinoma and regulated by retinoic acid in pancreatic carcinoma cell lines", *Gut* 43 (5):692-698.
- Wallrapp, C., S. Hahnel, F. Muller-Pillasch, B. Burghardt, T. Iwamura, M. Ruthenburger, M. M. Lerch, G. Adler, and T. M. Gress (2000)**, "A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer", *Cancer Res* 60 (10):2602-2606.

- Wan, W. H., M. B. Fortuna, and P. Furmanski (1987)**, "A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously", *J Immunol Methods* 103 (1):121-129.
- Windham, T. C., N. U. Parikh, D. R. Siwak, J. M. Summy, D. J. McConkey, A. J. Kraker, and G. E. Gallick (2002)**, "Src activation regulates anoikis in human colon tumor cell lines", *Oncogene* 21 (51):7797-7807.
- Wray, C. J., S. A. Ahmad, J. B. Matthews, and A. M. Lowy (2005)**, "Surgery for pancreatic cancer: recent controversies and current practice", *Gastroenterology* 128 (6):1626-1641.
- Yang, Y. H., H. Deng, W. M. Li, Q. Y. Zhang, X. T. Hu, B. Xiao, H. H. Zhu, P. L. Geng, and Y. Y. Lu (2008)**, "Identification of matrix metalloproteinase 11 as a predictive tumor marker in serum based on gene expression profiling", *Clin Cancer Res* 14 (1):74-81.
- Yeo, C. J., J. L. Cameron, K. D. Lillemoe, J. V. Sitzmann, R. H. Hruban, S. N. Goodman, W. C. Dooley, J. Coleman, and H. A. Pitt (1995)**, "Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients", *Ann Surg* 221 (6):721-731; discussion 731-723.
- Yezhelyev, M. V., G. Koehl, M. Guba, T. Brabletz, K. W. Jauch, A. Ryan, A. Barge, T. Green, M. Fennell, and C. J. Bruns (2004)**, "Inhibition of SRC tyrosine kinase as treatment for human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice", *Clin Cancer Res* 10 (23):8028-8036.
- Yousef, G. M., C. A. Borgono, C. Popalis, G. M. Yacoub, M. E. Polymeris, A. Soosaipillai, and E. P. Diamandis (2004)**, "In-silico analysis of kallikrein gene expression in pancreatic and colon cancers", *Anticancer Res* 24 (1):43-51.
- Zhou, G. X., J. F. Huang, Z. S. Li, G. M. Xu, F. Liu, and H. Zhang (2004)**, "Detection of K-ras point mutation and telomerase activity during endoscopic retrograde cholangiopancreatography in diagnosis of pancreatic cancer", *World J Gastroenterol* 10 (9):1337-1340.
- Zhang, L., S. O. Sanderson, R. V. Lloyd and T. C. Smyrk (2007)**, "Pancreatic Intraepithelial Neoplasia in Heterotopic Pancreas. Evidence for the Progression Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Am J Surg Pathol* 31(8): 1191–1195.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorprogressionsmodel von Hruban et al. 2000.....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Herstellung eines Gewebe Microarrays.....	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Avidin-Biotin-Komplexes	20
Abbildung 4: Ausgewählte Gewebe- <i>Microarray</i> -Ausschnitte gefärbt mit dem Antikörper Annexin A2.....	27
Abbildung 5: Immunreaktiver Score für die unterschiedlichen Gruppen gefärbt mit Annexin A2.....	28
Abbildung 6: Immunreaktiver Score für die verschiedenen Gruppen für KLK-10.....	31
Abbildung 7: Ausgewählte Gewebe- <i>Microarray</i> -Ausschnitte gefärbt mit KLK-10 und KLK-10-Peptid.....	32 - 33
Abbildung 8: Immunreaktiver Score für die unterschiedlichen Gruppen von MCM 2.....	36
Abbildung 9: Ausgewählte Gewebe- <i>Microarray</i> -Ausschnitte gefärbt mit dem Antikörper MCM 2.....	37
Abbildung 10: Ausgewählte Gewebe- <i>Microarray</i> -Ausschnitte gefärbt mit dem Antikörper MCM 7.....	40
Abbildung 11: Immunreaktiver Score für die Gruppen gefärbt mit dem Antikörper MCM 741	
Abbildung 12: Ausgewählte Gewebe- <i>Microarray</i> -Ausschnitte gefärbt mit dem Antikörper MMP-11, Klon SL3.05.....	44
Abbildung 13: Immunreaktiver Score für die verschiedenen Gruppen für MMP-11, Klon SL3.05.....	45
Abbildung 14: Ausgewählte Gewebe- <i>Microarray</i> -Ausschnitte gefärbt mit dem Antikörper MMP-11, Klon SPM199.....	47
Abbildung 15: Immunreaktiver Score der untersuchten Gruppen für MMP-11 Klon, SPM119	48
Abbildung 16: Ausgewählte Gewebe- <i>Microarray</i> -Ausschnitte gefärbt mit dem Antikörper TMPRSS4.....	50
Abbildung 17: Immunreaktiver Score für TMPRSS4.....	51

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der ausgewählten Gene aus der Arbeit von Grützmann et al. 2004: „Genexpressionsanalyse aus mikrodisezierten pankreatisch duktalem Adenokarzinomen, die mit Hilfe der high-density DNA-Microarray Technologie untersucht wurden“	13
Tabelle 2: Übersicht des Tumor- und Nodalstatus, Resektionsrand und Grading des DAC-Patientenkollektives dieser Arbeit	16
Tabelle 3: Übersicht der Gewebe-Microarray-Modelle (GMA-1 bis 6) mit der jeweiligen Anzahl und dem jeweiligen Dysplasiegrad der enthaltenen Gewebestanzen.....	18
Tabelle 4: Gesamtanzahl (n = 1254) der ausgewerteten Gewebestanzen dieser Arbeit pro Dysplasiegrad Gruppe	18
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper.....	21
Tabelle 6: Vorbehandlung, Verdünnung, Färbemethode und Konzentration der verwendeten Antikörper.....	23
Tabelle 7: Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner.....	25
Tabelle 8: Detailansicht der Anzahl von untersuchten Microarray Gewebestanzen für die verschiedenen Gruppen die mit Annexin A2 gefärbt wurden.....	28
Tabelle 9 : Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Test für Annexin A2.....	29
Tabelle 10: Mann-Whitney-U-Test für Annexin A2: Normale Pankreasgänge und low grade PanINs versus high grade PanINs	30
Tabelle 11: Mann-Whitney-U-Test für Annexin A2: Normale Pankreasgänge versus duktales Pankreaskarzinom	30
Tabelle 12: Detailansicht der untersuchten Microarray Gewebestanzen für die verschiedenen Gruppen gefärbt mit KLK-10.....	31
Tabelle 13: Kruskal-Wallis-Test für KLK-10.....	34
Tabelle 14: Mann-Whitney-U-Test für KLK-10: Normale Pankreasgänge und low grade PanINs versus high grade PanINs	35
Tabelle 15: Mann-Whitney-U-Test für KLK-10: Normale Pankreasgänge versus duktales Pankreaskarzinom	35
Tabelle 16: Detailansicht der untersuchten Gruppen gefärbt mit MCM 2.....	36
Tabelle 17: Kruskal-Wallis Test für MCM 2.....	38
Tabelle 18: Mann-Whitney-U-Test für MCM 2: Normale Pankreasgänge und low grade PanINs versus high grade PanINs	38
Tabelle 19: Mann-Whitney-U-Test für MCM 2: Normale Pankreasgänge versus duktales Pankreaskarzinom	39

Tabelle 20: Detailansicht der untersuchten Gruppen für MCM 7.....	39
Tabelle 21: Kruskal-Wallis Test für MCM 7.....	42
Tabelle 22: Mann-Whitney-U-Test für MCM 7: Normale Pankreasgänge und low grade PanINs versus high grade PanINs	42
Tabelle 23: Mann-Whitney-U-Test für MCM 7: Normale Pankreasgänge versus duktales Pankreaskarzinom	42
Tabelle 24: Detailansicht der untersuchten Gruppen mit dem Antikörper MMP-11, Klon SL3.05.....	43
Tabelle 25: Ergebnisse des Kruskal-Wallis Test für MMP-11, Klon SL3.05.....	46
Tabelle 26: Kruskal-Wallis Test für MMP-11 Klon, SPM199.....	48
Tabelle 27: Detailansicht der untersuchten Gruppen gefärbt mit dem Antikörper Tmprss449	
Tabelle 28: Kruskal-Wallis Test für Tmprss4.....	52
Tabelle 29: Mann-Whitney-U-Test für Tmprss4: Normale Pankreasgänge und low grade PanINs versus high grade PanINs.....	52
Tabelle 30: Mann-Whitney-U-Test für Tmprss4: Normale Pankreasgänge versus duktales Pankreaskarzinom	52
Tabelle 31: pTNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2002.....	77
Tabelle 32: Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms nach dem AJCC 2002.....	77

9 Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AJCC	American Joint Committee on Cancer
aq.dest.	Destilliertes Wasser
AN	Artikelnummer
CA19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAC	Duktales Adenokarzinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	<i>Donkey-Normal-Serum</i>
DPC4	<i>Deleted in Pancreatic Carcinoma, Locus 4</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HE	Hämatoxylin-Eosin
GMA	Gewebe- <i>Microarray</i>
IRS	Immunreaktiver Score
KLK	Kallikrein
LK	Lymphknoten
MCM	Minichromosomal Maintenance Protein
MMP	Matrixmetalloproteinase
MTA-1	<i>Manual Tissue Arrayer</i>
MP	Milchpulver
NS	Normalserum
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PDAC	Pankreatisch duktales Adenokarzinom
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
TEC	TRIZMA-Base, EDTA, Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> (Tris-gepuffertes Salz)
TNM	Tumor, Nodi, Metastase

10 Anhang

Tabelle 31: pTNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2002

pTNM-Klassifikation	
T is	Carcinoma in situ
T 1	Tumor auf Pankreas beschränkt < 2 cm
T 2	Tumor auf Pankreas beschränkt > 2 cm
T 3	Tumorausdehnung jenseits des Pankreas, ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior
T 4	Tumordinfiltration des Truncus coeliacus oder jenseits der A.mesenterica sup.
N 0	Keine regionären Lymphknoten (LK) Metastasen
N 1	Regionäre LK-Metastasen (peripankreatische LK, pankreatiko-duodenale LK, pylorische LK, am Milzhilus, proximal mesenterial und zöliakal)
N 1a	Metastase in einem einzelnen LK
N 1b	Metastasen in multiplen regionären LK
M 0	Keine Fernmetastasen
M 1	Fernmetastasen (Leber, Lunge, Knochen, Gehirn, u.a.)
* p = „pathologisch ermittelt“, T = Tumor steht für die Größe und Ausdehnung des Primärtumors, N = Nodi, steht für die Anzahl der befallenen regionären Lymphknoten und M = Metastasen steht für das Auftreten und die Lokalisation von Fernmetastasen.	

Tabelle 32: Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms nach dem AJCC 2002

Stadiengruppierung	TNM-System		
0	T is	N 0	M 0
I a	T 1	N 0	M 0
I b	T 2	N 0	M 0
II a	T 3	N 0	M 0
II b	T 1-3	N 1	M 0
III	T 4	jedes N	M 0
IV	jedes T	jedes N	M 1

11 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Günter Klöppel für die Bereitstellung des interessanten Themas und die guten Bedingungen zur wissenschaftlichen Arbeit im Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Bence Sipos für die kontinuierliche Betreuung, Unterstützung und Hilfestellung bei den vielen kleinen und großen immer wieder aufkehlenden Schwierig- und Neuigkeiten. Vielen Dank!!

Ein großes Dankeschön an Sabine Roggenbrodt für ihr immer offenes Ohr, Zeit, Geduld und großartige Hilfestellung!

Bei Dr. Almut Kirchhoff und Dr. Anne Rohdenburg möchte ich mich für das Korrektur lesen und Motivieren bedanken. Insbesondere bei Dr. Anne Rohdenburg für das Immer-Dasein, Immer-Zuhören und immer wieder Hilfeleistung bei jeder großen und kleinen „Kleinigkeit“.

Martin Kirchhoff danke ich für die langjährige Geduld, Motivation, anregenden Diskussionen und Korrektur lesen.

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung, Kraft und Liebe danken.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katja Regina Gojak
Anschrift: Hansastr. 78, 24118 Kiel
Geburtsdatum: 13. Mai 1981
Geburtsort: München
Nationalität: Deutsch

Berufliche Ausbildung

Seit Mai 2008 Angestellt im Krankenhaus Rendsburg als Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe

Hochschulbildung

Dez. 2007 Vollendung des Studiums der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Okt. 2005 Beginn der Dissertation „Validierung differenzieller Genexpression im duktalem Pankreaskarzinom“ im Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Mär. 2003 Abschluss des vorklinischen Studiums
Okt. 2000 Beginn des Humanmedizinstudiums an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Mär. - Aug. 2000 Studium der Gynäkologie und Kinderpflege, Universidad de Valparaíso, Chile

Schulbildung

Dez. 1999 Abitur an der Deutschen Schule Valparaíso, Chile
1988 - 1999 Grundschule und Gymnasium an der Deutschen Schule Valparaíso, Chile
1987- 1988 Grundschule Anzing bei München

Kiel, den 26. Oktober 2010

Katja Gojak

