

Aus der Sektion für Molekulare Onkologie,
Institut für Experimentelle Tumorforschung, Krebszentrum Nord - CCC
(Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

EXPRESSION VON TRAIL-REZEPTOREN UND HMGA2 IM DUKTALEN PANKREASADENOKARZINOM

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
FRANKA MARIA ANNEWANTER
aus Flensburg

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Kalthoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Susanne Sebens

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.09.2014

gez. Prof. Dr. Johann Roider (Vorsitzender des Promotionsausschusses)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom.....	1
1.2 TRAIL und TRAIL-Rezeptoren	1
1.3 HMGA2	4
1.4 Hintergrund und Zielsetzung dieser Arbeit	5
2 Patienten und Gewebeprobe.....	7
3 Material und Methoden	8
3.1 Herstellung der Schnittpräparate	8
3.2 Immunhistochemische Färbungen	8
3.3 Auswertung	14
4 Ergebnisse.....	16
4.1 Eigenschaften der untersuchten Karzinome	16
4.2 TRAIL-R1	18
4.3 TRAIL-R2	24
4.4 TRAIL-R4	31
4.5 HMGA2	38
4.6 Korrelation der untersuchten Marker untereinander.....	45
5 Diskussion	47
5.1 TRAIL-Rezeptoren	47
5.2 HMGA2	53
5.3 Zusammenhang zwischen TRAIL-Rezeptoren und HMGA2.....	55
6 Zusammenfassung	57
7 Literaturverzeichnis	59
8 Anhang	68

8.1 Etablierung der Antikörper	68
8.2 Ethikvotum	71
9 Danksagung	73
10 Lebenslauf	74

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
BCL-2	B-cell lymphoma-2
BCL-XL	B-cell lymphoma-XL
BID	BH3-interacting domain death agonist
CAD	Caspase-aktivierte DNase
cFLIP	Cellular Flice-like inhibitory protein
DD	Death domain
DISC	Death-inducing signaling complex
DR	Death receptor
FADD	Fas-associated protein with death domain
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
HMGA2	High-mobility-group A2
IAPs	Inhibitor of apoptosis (proteins)
IKK γ	Inhibitor of I κ B kinase γ
IL-1	Interleukin 1
Let-7	lethal-7
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
OPG	Osteoprotegerin
PI-3K/Akt	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RANK-L	Receptor activator of NF- κ B ligand
RIP1	receptor interacting protein 1
Tab.	Tabelle
tBID	truncated Bid
TBS	Tris-buffered Saline
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRADD	TNF-Receptor-Associated Death Domain
TRAF2	TNF-Receptor-Associated Factor 2
TRAIL	Tumor-necrosis-factor-related-apoptosis-inducing-ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor

VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom

Pankreastumoren entstehen zu 95% aus dem exokrinen Anteil der Bauchspeicheldrüse. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist hiervon mit 90% der mit Abstand häufigste Tumor (1). Die Neuerkrankungsrate von Pankreaskarzinomen ist seit Ende der 1990er Jahre weitgehend konstant und betrug 2008 in Deutschland 18,4/100 000 Einwohner bei Männern und war bei Frauen mit 18,1/100 000 Einwohner etwas niedriger (2). Aufgrund der äußerst schlechten Prognose ist die Sterberate nahezu gleich hoch (2).

Ätiologie und Pathogenese des duktales Pankreasadenokarzinoms sind derzeit unbekannt. Jedoch gelten Tabakrauchen, Alkoholkonsum, Übergewicht, chronische Pankreatitiden und Typ-II-Diabetes als Risikofaktoren (3).

Mit zur schlechten Prognose des duktales Pankreasadenokarzinoms trägt das Fehlen frühzeitiger Symptome bei. Erst in fortgeschrittenen Stadien kommt es zu unspezifischen Beschwerden wie Bauchschmerzen, Gewichtsverlust, Übelkeit und Ikterus (4). Aufgrund dessen ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine kurative Operation nur bei weniger als 20 % der Patienten möglich (5). Bei 50 % der Patienten liegen bereits Fernmetastasen vor (4). Für diese Patienten und Patienten mit lokal fortgeschrittener Erkrankung steht eine palliative Chemotherapie zur Verfügung, welche die Prognose jedoch kaum verbessert (6). All dies führt zu einer 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von etwa 5 % (7). Verantwortlich für das schlechte Ansprechen auf Chemo-, Radio- und Immuntherapien ist die ausgeprägte Apoptoseresistenz der PDAC-Zellen (8). Aufgrund der schlechten Prognose und der eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten des duktales Pankreasadenokarzinoms werden dringend neue Therapiekonzepte benötigt. Eine neue mögliche Therapieoption, die derzeit in klinischen Studien getestet wird, sind agonistische Antikörper gegen Rezeptoren des Zytokins TRAIL sowie der rekombinante Ligand TRAIL (9).

1.2 TRAIL und TRAIL-Rezeptoren

Tumor-necrosis-factor (TNF)-related-apoptosis-inducing-ligand (TRAIL) ist ein Mitglied der TNF-Superfamilie. Es ist ein Typ II Transmembranprotein (10), das vor allem auf Zellen des Immunsystems exprimiert wird. Durch Abspaltung des

extrazellulären C-terminalen Anteils kann es auch als lösliche Form freigesetzt werden (11). TRAIL ist in der Lage selektiv Apoptose in Tumorzellen zu induzieren, wobei normale Zellen unbeschädigt bleiben (12,13). Das macht TRAIL zu einem potenziellen Werkzeug in der Anti-Tumor-Therapie. Die physiologische Funktion von TRAIL ist noch nicht vollständig geklärt. Es scheint eine Rolle in der Regulation von Immunantworten zu spielen. So zeigten TRAIL-defiziente Mäuse eine verminderte Apoptose von Thymozyten (14) und Patienten mit systemischem Lupus erythematoses wiesen erhöhte TRAIL-Werte im Serum auf (15).

Zurzeit sind fünf verschiedene TRAIL-Rezeptoren bekannt. TRAIL-Rezeptor 1 (TRAIL-R1), auch DR4 (death receptor 4) genannt, und TRAIL-Rezeptor 2 (TRAIL-R2), auch als DR5 (death receptor 5) bezeichnet, sind die beiden Todesrezeptoren, die über ihre intrazelluläre Todesdomäne (death domain, DD) Apoptose induzieren können (16,17). Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass diese beiden Rezeptoren in verschiedenen Tumoren wie nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (18), kolorektalen Karzinomen (19) und Mamma-Karzinomen (20) jeweils in der deutlichen Mehrzahl der Fälle exprimiert werden. TRAIL-Rezeptor 3 (TRAIL-R3) und TRAIL-Rezeptor 4 (TRAIL-R4) sind sogenannte Decoy-Rezeptoren. TRAIL-R3 besitzt keine intrazelluläre Domäne und ist über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit der Zellmembran verbunden. TRAIL-R4 besitzt nur eine verkürzte intrazelluläre Domäne ohne intakte Todesdomäne. Somit sind sie nicht in der Lage, das apoptotische Signal zu vermitteln (17,21,22). Stattdessen wird ihnen ein protektiver Effekt vor TRAIL-vermittelter Apoptose durch kompetitive Bindung des TRAIL-Liganden zugesprochen (22,23). Der fünfte bekannte TRAIL-Rezeptor ist Osteoprotegerin (OPG), ein lösliches Protein, das vornehmlich an den Osteoprotegerin-Liganden (RANK-L) bindet und eine Rolle in der Regulation von Osteoklasten spielt (24,25).

Die namensgebende und auch am besten erforschte Funktion der beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 ist die Induktion von Apoptose. Apoptose ist eine kontrollierte Form des Zelltods (26) und kann über zwei Wege induziert werden: den extrinsischen Weg, der auch als Todesrezeptorweg bezeichnet wird, und den intrinsischen Weg, auch mitochondrialer Weg genannt. Beide Wege führen letztlich zur Aktivierung von Effektorcaspasen. Diese führen über Spaltung wichtiger zellulärer Proteine und über die Aktivierung einer Caspase-aktivierten DNase (CAD)

(27) schließlich zum Untergang der Zelle.

Im extrinsischen Signalweg führt die Bindung von TRAIL an die membranständigen Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zu deren Aktivierung. Über ihre intrazelluläre Todesdomäne sind sie nun in der Lage die Todesdomäne des Adaptermoleküls Fas-associated protein with death domain (FADD) zu binden. FADD bindet über eine weitere Domäne die Pro-Caspasen 8 und 10 (28). Der nun entstandene Multi-Protein-Komplex wird als Death-inducing signaling complex (DISC) bezeichnet (29). Am DISC werden die Pro-Caspasen 8 und 10 autokatalytisch aktiviert und aktivieren als Initiatorcaspasen nun ihrerseits Effektorcaspasen wie Caspase 3 (28).

Der intrinsische Signalweg wird durch die Mitglieder der B-cell lymphoma-2 (BCL-2) Familie reguliert. Über ihr Mitglied BID besteht eine Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg: BID wird von der Caspase 8 in seine aktive Form truncated-Bid (tBID) gespalten, die die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induziert (30). Cytochrom c bildet zusammen mit dem apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1) und Caspase 9 einen Komplex, das sogenannte Apoptosom. Am Apoptosom kommt es zur Aktivierung der Initiatorcaspase 9, die weitere Effektorcaspasen aktiviert (31,32).

PDAC-Zellen gehören zu den Typ II Zellen, bei denen diese Verbindung eine Rolle spielt (33). In Typ II Zellen ist die Aktivierung von Caspase 8 am DISC nicht stark genug, um ausreichend Effektorcaspasen zu aktivieren. Sie sind somit zusätzlich auf den mitochondrialen Signalweg angewiesen. Bei Überexpression des anti-apoptotischen Proteins BCL-XL sind sie resistent gegen Apoptose (34).

TRAIL induziert neben Apoptose auch nicht-apoptotische Signalwege. Es konnte gezeigt werden, dass TRAIL über TRAIL-R1, TRAIL-R2 und TRAIL-R4 Nuclear factor kappa B (NF- κ B) aktivieren kann (22,35). Dies geschieht über einen zweiten Signalkomplex neben dem DISC, an dessen Bildung FADD, Caspase 8, RIP1, TRAF2, IKK γ , TRADD und Caspase 10 beteiligt sind (36,37). NF- κ B reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression zahlreicher Gene, die an Metastasierung, (z.B. VCAM-1), Angiogenese (z.B. VEGF), Entzündungsreaktionen (z.B. IL-1) und Apoptose-Hemmung (z.B. TRAF-2, IAPs, Bcl-XL, c-FLIP) beteiligt sind und somit Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen fördern (38,39). Neben NF- κ B werden weitere Signalwege wie Protein Kinase C, PI-3K/Akt und MAPK (mitogen-

activated protein kinases) durch TRAIL aktiviert (40–42). Die Rolle dieser nicht-apoptotischen Signalwege wird insbesondere in apoptoseresistenten Zellen deutlich: Für einige apoptoseresistente Krebs-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass TRAIL-induzierte NF- κ B- Aktivierung Überleben und Proliferation von Krebszellen fördert (43). Auch in vivo zeigten immundefiziente Mäuse mit orthotop transplantierten Bcl-XL-exprimierenden Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit TRAIL einen signifikanten Anstieg der Metastasierung in Leber und Milz (44).

Studien, die die prognostische Signifikanz von TRAIL-Rezeptor-Expression in vivo untersucht haben, zeigen, dass auch die Todesrezeptoren malignes Potenzial besitzen. So ist hohe TRAIL-R1-Expression in fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen sowie in kleinzelligen Bronchialkarzinomen mit einer schlechteren Prognose assoziiert (18,45) und TRAIL-R2-Expression korreliert in Mammakarzinomen mit schlechter differenzierten Tumoren, Lymphknotenmetastasierung und kürzerem Gesamtüberleben (20,46). Diese Ergebnisse sind von Interesse, da derzeit die Wirksamkeit von agonistischen TRAIL-Rezeptor-Antikörpern bei verschiedenen Tumorerkrankungen, unter anderem beim Pankreaskarzinom, in klinischen Studien getestet wird. Bisher konnte dabei jedoch bis auf einzelne Remissionen keine genereller therapeutischer Effekt gezeigt werden (9). Hinweise auf einen weiteren möglichen Zusammenhang zwischen TRAIL-Rezeptoren und Malignität konnten in der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Trauzold (Institut für Experimentelle Tumorforschung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) gefunden werden: Es konnte gezeigt werden, dass Herunterregulation von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zu verstärkter Expression der microRNA let-7 führt. Let-7 wiederum hemmt als Tumor-Suppressor-Gen die Expression von HMGA2 (47,48), welches in verschiedenen Zelllinien bei Hemmung von TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 ebenfalls herunterreguliert wurde.

1.3 HMGA2

Das High-mobility-group A2 (HMGA2)-Protein gehört zur Familie der High-mobility-group-Proteine, die ihren Namen aufgrund ihrer hohen Laufgeschwindigkeit bei der Polyacrylamidgelelektrophorese erhalten haben (49). HMGA2 ist ein nukleäres Nicht-Histon-Protein (50,51). Es bindet in die kleine Furche AT-reicher DNA-Sequenzen (52) und führt so zu einer Konformationsänderung der DNA, wodurch die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren ermöglicht wird. Auf diese Weise beeinflusst

HMGA2 die Expression zahlreicher Gene, die an Zellzyklusregulation, Differenzierung, Seneszenz und neoplastischer Transformation beteiligt sind (53). Physiologischerweise wird HMGA2 während der Embryonalentwicklung exprimiert. In differenzierten adulten Geweben ist es kaum nachweisbar (54). Allerdings konnte in zahlreichen benignen (55,56) sowie malignen Neoplasien wie Ovarialkarzinomen (57), kolorektalen Karzinomen (58), Mammakarzinomen (59) und Pankreaskarzinomen (60) eine erhöhte HMGA2-Expression nachgewiesen werden. Diese korrelierte in Mammakarzinomen mit hohem Tumorgrading (59) und in Pankreaskarzinomen mit hohem Tumorgrading und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (60). Zudem konnte gezeigt werden, dass HMGA2 eine Rolle in Epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) spielt (61,62). EMT ist ein Vorgang, bei dem epitheliale Zellen ihre Zellkontakte auflösen sowie die Fähigkeit zur Migration entwickeln, und ermöglicht Karzinomzellen zu metastasieren (63). Somit spielt HMGA2 eine Rolle in Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen.

1.4 Hintergrund und Zielsetzung dieser Arbeit

Alle bisher beschriebenen Funktionen von TRAIL-Rezeptoren werden vermittelt durch Bindung von TRAIL an seine plasmamembranständige Rezeptoren, insbesondere TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Untersuchungen konnten TRAIL-Rezeptoren jedoch auch im Zytoplasma (18,20,45,64) und sogar im Zellkern (65–67) nachweisen. Insbesondere die Funktion von nukleären TRAIL-Rezeptoren ist zurzeit allerdings noch unbekannt.

Bisherige Arbeiten der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Trauzold (Institut für Experimentelle Tumorforschung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zeigten, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in vitro in zahlreichen Krebszelllinien auch im Zellkern vorhanden sind. Es konnte gezeigt werden, dass sie dort die Reifung der microRNA let-7 hemmen und so zu verstärkter Expression entsprechender let-7 Zielgene wie auch HMGA2 sowie zu vermehrter Zellproliferation führen (68).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Expression und insbesondere die subzelluläre Lokalisation von TRAIL-Rezeptoren und von HMGA2 in duktalem Pankreasadenokarzinomen sowie deren Korrelation untereinander zu untersuchen. Desweiteren wird untersucht, ob eine Korrelation der Expression der untersuchten Marker mit wichtigen klinisch-pathologischen Parametern wie Tumordifferenzierung,

Tumorgröße, Metastasierung und Überleben besteht und ob es Unterschiede in der Expression von TRAIL-Rezeptoren und HMGA2 zwischen duktalem Pankreasadenokarzinomen und nicht malignem Pankreasgewebe gibt.

2 Patienten und Gewebeproben

Untersucht wurden in Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete duktale Adenokarzinome des Pankreas aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Kiel aus den Jahren 1999 bis 2010. Von 149 Fällen war in 43 Fällen kein ausreichendes Tumorgewebe vorhanden, so dass schließlich von 106 duktalem Adenokarzinomen des Pankreas immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt wurden. Von 17 Patienten war zusätzlich Material von Lymphknotenmetastasen vorhanden und wurde ebenfalls untersucht. Von 28 Patienten wurde außerdem peritumorales nicht malignes Gewebe untersucht.

Von den 106 Patienten sind 55 (51,9 %) männlich, 51 (48,1 %) Patienten sind weiblich. Das mediane Alter beträgt 65 Jahre, die Spanne 47 bis 85 Jahre.

Informationen zum Überleben und Versterben von Patienten wurde mithilfe der Registerstelle des Krebsregisters Schleswig-Holstein ermittelt, sowie aus der Forschungsdatenbank der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Kiel entnommen. Diese Studie wurde von der lokalen Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel genehmigt (Aktenzeichen A-110/99, Kopie siehe 8.2).

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung der Schnittpräparate

Die in Formalin fixierten, in Paraffin eingebetteten Tumoren und Lymphknoten wurden zunächst auf einer Kühlplatte (PSI, Laudenbach, Deutschland) bei -18°C mindestens 10 Minuten gekühlt, bis das Material eine für das Schneiden ausreichende Temperatur erreichte. Anschließend wurden mittels eines Rotationsmikrotoms (LEICA RM 2245, Wetzlar, Deutschland) jeweils acht Schnitte mit einer Dicke von 3 µm angefertigt und in ein Wasserbad mit Raumtemperatur überführt. Dann wurden die Schnitte auf nummerierte, beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser Superfrost Plus, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und in einem zweiten Wasserbad (TFB 45, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) bei 50°C geglättet. Anschließend wurden die Schnittpräparate über Nacht im Wärmeschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 60°C getrocknet. Zur morphologischen Tumorbeurteilung wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen angefertigt.

3.2 Immunhistochemische Färbungen

Von allen Tumoren, dem nicht malignen Gewebe sowie den Lymphknoten wurde mit den vier verwendeten Antikörpern (siehe Tab. 1) je eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Um eine möglichst genaue Kollokalisierung v.a. zwischen HMGA2 und den beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zu ermöglichen, wurden die immunhistochemischen Untersuchungen der nummerierten Schnitte in folgender Reihenfolge durchgeführt:

- 1 – TRAIL-R1
- 2 – HMGA2
- 3 – TRAIL-R2 (Antikörper TR2.21)
- 4 – TRAIL-R4

Zur Beurteilung von unspezifischen Färbereaktionen wurden von jedem Tumor und jeder Lymphknotenmetastase zwei Negativ-Kontrollen angefertigt. Hierfür wurde der Primärantikörper durch Antibody-Diluent ersetzt und die weitere Immunfärbung nach Protokoll (Avidin-Biotin bzw. Polymersystem) durchgeführt. Sämtliche Negativ-Kontrollen zeigten keine Immunfärbung.

3.2.1 Antikörper

Tab. 1: Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Antikörper	Antigen	Klonalität	Wirt	Hersteller
TR1.02	TRAIL-R1	monoklonal IgG2b	Maus	Zur Verfügung gestellt von Prof. H. Walczak, London
TR2.21	TRAIL-R2	monoklonal IgG1	Maus	Zur Verfügung gestellt von Prof. H. Walczak, London
TNFRSF10B	TRAIL-R2	polyklonal IgG	Kaninchen	Atlas Antibodies, Stockholm, Schweden
TR3.06	TRAIL-R3	monoklonal IgG1	Maus	Zur Verfügung gestellt von Prof. H. Walczak, London
TR4.18	TRAIL-R4	monoklonal IgG1	Maus	Zur Verfügung gestellt von Prof. H. Walczak, London
HMGI-C (S-15)	HMGA2	polyklonal IgG	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas

Der Antikörper gegen TRAIL-R3 zeigte trotz zahlreicher Färbeansätze (siehe 8.1.3) keine Immunreaktivität und wurde somit für die Untersuchung der 106 duktaalen Pankreasadenokarzinome nicht verwendet. Der polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen TRAIL-R2 (TNFRSF10B) wurde in Vorversuchen mit dem monoklonalen Antikörper aus der Maus (TR2.21) verglichen.

3.2.2 Färbemethoden

Immunhistochemische Färbungen beruhen grundsätzlich auf einer spezifischen Bindung zwischen dem nachzuweisenden Antigen im Gewebe und der Antigenerkennungsregion des Primärantikörpers. Es stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, diese Bindung indirekt sichtbar zu machen:

3.2.2.1 (Strept-)Avidin-Biotin-Methode (SAB)

Diese Methode macht sich die Affinität von Avidin bzw. Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*) gegenüber Biotin zunutze (69). Nach dem spezifischen Primärantikörper wird ein biotinylierter Sekundärantikörper aufgetragen, dessen Fab-Teil gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist. In einem weiteren Schritt wird Streptavidin aufgetragen, welches mit vier möglichen Bindungsstellen an Biotin binden kann. An Streptavidin ist ein Enzym gekoppelt (siehe Abb. 1). Durch Zugabe des geeigneten Substrats wird die Bindung nun indirekt sichtbar.

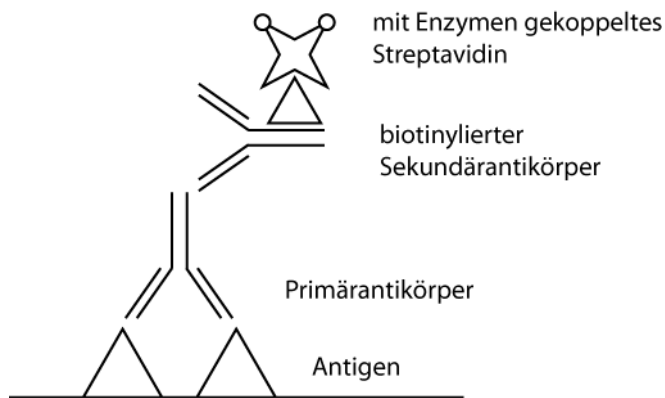


Abb. 1: Streptavidin-Biotin-Methode (umgezeichnet nach (70)). Der Primärantikörper bindet an das Antigen im Gewebe. An den Primärantikörper bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper. Bei der Streptavidin-Biotin-Methode wird zuletzt mit Enzymen gekoppeltes Streptavidin aufgetragen, das eine Bindung mit dem Biotin eingeht.

3.2.2.2 Polymersystem

Hier erfolgt die Detektion des Primärantikörpers in nur zwei Schritten: Nach dem Primärantikörper wird ein Polymer (Histofine Simple Stain MAX PO Universal Immuno-peroxidase Polymer Anti-Mouse and Rabbit, Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) aufgetragen. Dieses Polymer ist sowohl mit Sekundärantikörpern gegen den Fc-Teil von Antikörpern aus Maus und Kaninchen als auch mit zahlreichen Peroxidase-Enzymen gekoppelt (siehe Abb. 2). Durch Zugabe des Substrats Diaminobenzidin (DAB) wird das Antigen indirekt sichtbar.

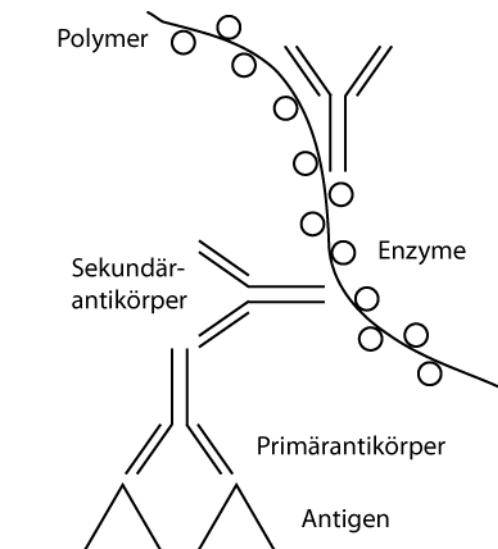


Abb. 2: Polymersystem (umgezeichnet nach (71)). Der Primärantikörper bindet an das Antigen im Gewebe. Anschließend werden Polymere aufgetragen, an die zum einen Sekundärantikörper, die gegen den Fc-Teil der Primärantikörper gerichtet sind, und zum anderen zahlreiche Enzyme gebunden sind.

3.2.3 Färbeprotokolle

Nach zahlreichen Etablierungsschritten (siehe 8.1) zeigten sich die besten Färbeergebnisse nach folgenden Protokollen:

3.2.3.1 TRAIL-R1

Diese immunhistochemische Färbung wurde nach der Avidin-Biotin-Methode durchgeführt. Zunächst wurde das Gewebe entparaffiniert. Hierfür wurden die Schnitte zweimal für jeweils 10 Minuten in Xylol und dann zur Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe geführt (jeweils zweimal für 2 Minuten in 96 %, 70 %, 50 % Ethanol). Anschließend wurden die Schnitte zweimal für jeweils 1 Minute in destilliertem Wasser gespült.

Zur Demaskierung der Antigene erfolgte anschließend eine 15-minütige Vorbehandlung im Wasserbad (Fa. Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen, Deutschland) bei 89°C in einer mit Citratpuffer [Stammlösung zehnfach konzentriert: 29,14 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit Citronensäure Monohydrat (Fa. Carl Roth) auf einen pH-Wert von 6,0 einstellen und mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen] gefüllten Kunststoffküvette. Diese wurden danach unter fließendem Leitungswasser abgekühlt. Dann wurden die Schnitte einmal für 5 Minuten in Tris-Puffer (TBS) [Stammlösung zehnfach konzentriert: 60,57 g Trizma Base (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 87,66 g Natriumchlorid (Fa. Carl Roth) in 1 l destilliertem Wasser lösen und mit 37%iger Salzsäure (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) den pH-Wert auf 7,4 einstellen] + 0,1 % Tween (Fa. Sigma-Aldrich) gespült.

Nun wurden endogenes Biotin sowie endogenes Avidin mit dem Avidin/Biotin Blocking Kit (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, CA) blockiert. Hierfür wurden die Präparate zunächst für 15 Minuten mit 3 bis 4 Tropfen Avidin-Lösung inkubiert, anschließend dreimal in TBS + 0,1 % Tween gewaschen und dann für 15 Minuten mit der Biotin-Lösung bedeckt. Anschließend wurde erneut dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS + 0,1 % Tween gewaschen.

Der Antikörper wurde 1:200 (5 µg/ml) in Antibody diluent (Fa. Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) verdünnt. Je nach Größe der Schnitte wurde das Gewebe mit 50 bis 150 µl bedeckt und in einer feuchten Kammer 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Präparate dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS + 0,1 %

Tween gewaschen. Dann erfolgte die Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung mithilfe des Super Sensitive Link-Label IHC Detection System (Fa. BioGenex, San Ramon, CA). Hierfür wurde zunächst ein gegen Maus, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten gerichteter biotinylierter Sekundärantikörper aufgetragen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBS + 0,1 % Tween gewaschen. Dann wurde eine Lösung mit an Streptavidin gekoppelter Alkalischer Phosphatase auf die Schnitte aufgebracht und ebenfalls für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Schritt wurde erneut dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS + 0,1 % Tween gewaschen.

Als Substrat der Alkalischen Phosphatase wurde Fast Red (Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablets, Fa. Sigma-Aldrich) verwendet. Wie vom Hersteller angegeben wurde zunächst 1 Tablette Tris-Puffer in 1 ml destilliertem Wasser durch Schütteln (Lab dancer Vario, Fa. IKA yellowline, Staufen, Deutschland) aufgelöst. Dieser Pufferlösung wurde dann 1 Tablette Fast Red hinzugefügt und ebenfalls durch Schütteln aufgelöst. Von dieser Lösung wurden 50 bis 150 µl auf jeden Schnitt pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurde Hämalaun (Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Fa. Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland) verwendet. Dazu wurden die Präparate 1 Minute in Hämalaun gestellt und anschließend 5 Minuten unter warmem Leitungswasser gebläut. Die gefärbten Schnitte wurden noch einmal für 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Die Schnitte wurden nun wässrig eingedeckelt mit Shandon Immu-Mount (Fa. Thermo Scientific, Fremont, CA) unter 24 x 50 mm großen Deckgläsern (Fa. Carl Roth) und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.3.2 TRAIL-R2

Zunächst wurde das Gewebe entparaffiniert wie für TRAIL-R1 bereits beschrieben. Die Antigendemaskierung erfolgte in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6.0 bei 120°C für 5 Minuten. Hierfür wurde ein handelsüblicher Schnellkochtopf verwendet. Anschließend wurden die Objektträger in Leitungswasser abgekühlt und 5 Minuten in TBS + 0,1 % Tween gespült.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Schnitte für 15 Minuten mit 3 bis 4 Tropfen Hydrogen Peroxide Block (Fa. Thermo Scientific) bedeckt. Danach wurde dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS + 0,1 % Tween

gewaschen. Zusätzlich wurde eine Blockierung unspezifischen Hintergrundes mittels Ultra V Block (Fa. Thermo Scientific) für 5 Minuten durchgeführt. Danach wurde einmal für 5 Minuten in TBS + 0,1 % Tween gespült.

Nun wurde der Antikörper im Verhältnis 1:100 (10 µg/ml) (monoklonaler Antikörper aus der Maus) bzw. 1:200 (5 µg/ml) (polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen) in Antibody diluent verdünnt. Je nach Größe des Tumorpräparates wurden 50 bis 150 µl auf den Schnitt pipettiert und in einer feuchten Kammer zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS + 0,1 % Tween gewaschen.

Als Detektionssystem wurde ein gegen Maus und Kaninchen gerichtetes Peroxidasegekoppeltes Polymer verwendet (Histofine Simple Stain MAX PO Universal Immunoperoxidase Polymer Anti-Mouse and Anti-Rabbit, Fa. Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan). Die Gewebeschnitte wurden mit 3 bis 4 Tropfen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS + 0,1 % Tween gewaschen.

Nun wurde das Gewebe für 10 Minuten mit dem Substrat Diaminobenzidin (DAB Peroxidase Substrate Kit, Fa. Vector Laboratories) bedeckt. Dieses wurde nach Anleitung der Hersteller angesetzt (auf 2,5 ml destilliertes Wasser 40 µl Puffer, 80 µl DAB und 40 µl Hydrogen-Peroxidase). Anschließend wurde einmal für 5 Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Nun erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun für 1 Minute mit anschließendem Bläuen unter warmem Leitungswasser für 5 Minuten.

Danach wurden die gefärbten Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt (2 x 70 % Ethanol, 2 x 96 % Ethanol, 2 x 100 % Ethanol, 2 x 100 % Ethanol + Xylol) bis ins Xylol geführt. Das Eindeckeln erfolgte mit einer Promounter RCM 2000 Coverslipping Machine (Fa. Medite, Burgdorf, Deutschland) unter Verwendung von Pertex (Fa. Medite) als dauerhaftes Eindeckelmedium.

3.2.3.3 TRAIL-R4

Für diesen Antikörper wurde ebenfalls die Avidin-Biotin-Methode verwendet. Nach der Entparaffinierung wurde eine Vorbehandlung im Schnellkochtopf in Citratpuffer (pH=6,0) für 5 Minuten bei 120°C durchgeführt. Die Blockierung des endogenen Biotin und Avidin wurde in diesem Fall für jeweils 30 Minuten durchgeführt, ist aber ansonsten, wie auch das weitere Vorgehen, dem Protokoll für TRAIL-R1 zu entnehmen (siehe 3.2.3.1).

3.2.3.4 HMGA2

Die Entparaffinierung des Gewebes erfolgte wie oben beschrieben. Die Antigendemaskierung erfolgte thermisch in einem Schnellkochtopf bei 120°C in Citratpuffer (pH=6,0) für 15 Minuten.

Die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben (siehe 3.2.3.2) für 15 Minuten mit 3 bis 4 Tropfen Hydrogen Peroxide Block.

Der Primärantikörper wurde 1:50 (20 µg/ml) in Antibody diluent verdünnt und in einer feuchten Kammer für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte ebenfalls mit einem Histofine-Polymer (Histofine Simple Stain MAX PO Universal Immuno-peroxidase Polymer Anti-Goat, Fa. Nichirei Biosciences) und dem Substrat DAB wie oben beschrieben. Auch die weitere Behandlung der Präparate sowie die einzelnen Waschschriffe sind dem Färbeprotokoll für TRAIL-R2 (3.2.3.2) zu entnehmen.

3.3 Auswertung

3.3.1 Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung der Immunfärbungen erfolgte an einem Leica DM 1000-Mikroskop. Die Auswertung des Gewebes erfolgte semiquantitativ unter Berücksichtigung von Farbeintensität und Anzahl positiver Zellen nach folgendem Schema:

Tab. 2: Score zur Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen

Je nach Farbeintensität werden 0 bis 3 Punkte vergeben. Getrennt davon werden für die Anzahl positiver Zellen 0 bis 4 Punkte vergeben. Diese beiden Werte können in einem Summscore zusammengefasst werden (siehe unten).

Punkte	Färbeintensität	Punkte	Anzahl positiver Zellen
0	negativ	0	0 %
1	schwach positiv	1	< 10 %
2	mäßig positiv	2	10 – 50 %
3	stark positiv	3	51 – 80 %
4	-	4	81-100 %

Waren die Zellen innerhalb eines Präparates verschieden stark gefärbt, wurde immer die maximale Intensität angegeben. Aus der Summe beider Punktwerte wurde ein Summenscore gebildet:

$$\text{Summenscore} = \text{Score (Färbeintensität)} + \text{Score (Anzahl positiver Zellen)}$$

Dieser Summenscore wurde jeweils für Zytoplasma und Zellkerne getrennt erhoben.

3.3.2 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die Statistik-Software IBM SPSS Version 20 (IBM Corporation, Armonk, NY) verwendet. Zur Bestimmung des Zusammenhangs der Expression der verschiedenen Antigene mit klinisch-pathologischen Kriterien wurde Kendalls τ verwendet. Dabei handelt es sich um einen Rangkorrelationskoeffizienten für ordinale Daten. Dieser wurde ebenfalls verwendet, um eine Korrelation der verschiedenen Antigene untereinander zu untersuchen. Für die Überlebensanalysen wurden Kaplan-Meier-Kurven angefertigt. Es wurden alle Patienten eingeschlossen, für die Nachsorgedaten vorhanden waren. Ausgeschlossen wurden jene Patienten, die perioperativ innerhalb von 14 Tagen nach der Operation verstorben sind. Somit wurden 89 von 106 Patienten eingeschlossen. Davon wurden 27 Patienten zensiert, da sie entweder noch lebten oder die klinische Nachsorge während des Beobachtungszeitraums beendet wurde. Es wurde das postoperative Gesamtüberleben betrachtet. Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt. Um die beiden Antikörper gegen TRAIL-R2 zu vergleichen, wurde Cohens Kappa, ein zufallskorrigiertes Übereinstimmungsmaß, verwendet. Der Vergleich der Färbeintensitäten von Tumorgewebe mit nicht malignem Gewebe sowie von Tumorgewebe mit Lymphknotenmetastasen wurde mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest, einem nichtparametrischen Test für gepaarte Stichproben, durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Eigenschaften der untersuchten Karzinome

Von den 106 untersuchten Tumoren lag der Großteil (88,7 %) im Stadium T3. 8,5 % der Tumoren lagen im Stadium T4, 2,8 % im Stadium T2 und kein Tumor im Stadium T1. Bei 79,2 % der Patienten lagen zum Zeitpunkt der Operation bereits Lymphknotenmetastasen vor, bei 10,4 % der Patienten waren Fernmetastasen bekannt. Bei 69,8 % der Patienten konnten die Tumoren vollständig (R0) reseziert werden, bei 26,4 % der Patienten konnte mikroskopisch, bei 1,9 % der Patienten makroskopisch ein Residualtumor festgestellt werden. Die Tumoren der 106 Patienten zeigten verschiedene Differenzierungsgrade, zum größten Teil (55,7 %) waren sie mäßig, in 10,4 % der Fälle gut und in 33 % der Fälle schlecht differenziert. Bei einem Patienten war der Tumor vollständig undifferenziert. Eine Lymphgefäßinvasion konnte bei 67 %, eine Hämangioinvasion bei 20,7 % und eine Perineuralinvasion bei 55,7 % der Patienten festgestellt werden (siehe Tab. 3).

Tab. 3: Eigenschaften der duktaalen Pankreasadenokarzinome der 106 Patienten

	Anzahl der Patienten
Tumorstadium	
T1	0 (0 %)
T2	3 (2,8 %)
T3	94 (88,7 %)
T4	9 (8,5 %)
Nodalstatus	
N0	22 (20,8 %)
N1	84 (79,2 %)
Metastasen	
M0	69 (65,1 %)
M1	11 (10,4 %)
MX	26 (24,5 %)
Residualtumor	
R0	74 (69,8 %)
R1	28 (26,4 %)
R2	2 (1,9 %)
RX	2 (1,9 %)
Differenzierungsgrad	
G1	11 (10,4 %)
G2	59 (55,7 %)
G3	35 (33,0 %)
G4	1 (0,9 %)
Lymphangi invasion	
L0	30 (28,3 %)
L1	71 (67,0 %)
LX	5 (4,7 %)
Hämangi invasion	
V0	79 (74,5 %)
V1	19 (17,9 %)
V2	3 (2,8 %)
VX	5 (4,7 %)
Perineuralscheideninvasion	
Pn0	39 (36,8 %)
Pn1	59 (55,7 %)
PnX	8 (7,5 %)

T1 Tumor begrenzt auf Pankreas, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung, **T2** Tumor begrenzt auf Pankreas, mehr als 2 cm in größter Ausdehnung, **T3** Tumor breitet sich jenseits des Pankreas aus, jedoch ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der A. mesenterica superior, **T4** Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior, **N0** Keine nachweisbaren regionären Lymphknotenmetastasen, **N1** regionäre Lymphknotenmetastasen, **M0** Keine nachweisbaren Fernmetastasen, **M1** nachweisbare Fernmetastasen, **MX** Fernmetastasen können nicht beurteilt werden, **R0** kein Residualtumor vorhanden, **R1** mikroskopischer Nachweis eines Residualtumors, **R2** makroskopischer Nachweis eines Residualtumors, **RX** Residualtumor nicht bestimmbar, **G1** gut differenzierter Tumor, **G2** mäßig differenzierter Tumor, **G3** schlecht differenzierter Tumor, **G4** undifferenzierter Tumor, **L0** keine Lymphgefäßinvasion, **L1** Lymphgefäßinvasion, **LX** Lymphgefäßinvasion nicht beurteilbar, **V0** keine Veneninvasion, **V1** mikroskopisch nachweisbare Veneninvasion, **V2** makroskopisch nachweisbare Veneninvasion, **Pn0** keine Perineuralscheideninvasion, **Pn1** Perineuralscheideninvasion, **PnX** Perineuralscheideninvasion nicht beurteilbar (72)

4.2 TRAIL-R1

4.2.1 TRAIL-R1-Expression in Pankreastumoren

In 93,4 % aller untersuchten Pankreaskarzinome wurde TRAIL-R1 im Zytoplasma exprimiert. In 51,9 % der Fälle war die Expression schwach, in 22,6 % der Fälle mäßig und in 18,9 % der Fälle stark positiv. In 78,3 % der Tumoren waren mehr als die Hälfte aller Karzinomzellen im Zytoplasma positiv für TRAIL-R1. Eine nukleäre Expression von TRAIL-R1 zeigten 34 % aller Tumore. Diese war überwiegend schwach und in 8 Fällen (7,5 %) mäßig positiv, wobei in 10,3 % der Tumore mehr als die Hälfte der Tumorzellkerne eine TRAIL-R1-Expression zeigten (siehe Tab. 4 und Abb. 3). Auffallend waren zudem vereinzelte stark positiv gefärbte Zellen im Stroma, vermutlich Mastzellen oder Makrophagen, die in der Negativkontrolle keine Anfärbung zeigten. Eine eindeutige Anfärbung der Zellmembranen zeigte sich für TRAIL-R1 nicht.

Tab. 4: TRAIL-R1-Expression in den 106 Pankreaskarziomen

Die Färbeintensität, die Anzahl positiver Zellen und der daraus berechnete Summenscore wurde jeweils getrennt für das Zytoplasma und für die Zellkerne ermittelt.

Färbeparameter	Zytoplasma Anzahl der Tumoren	Zellkern Anzahl der Tumoren
<u>Färbeintensität</u>		
negativ	7 (6,6 %)	70 (66,0 %)
schwach positiv	55 (51,9 %)	28 (26,4 %)
mäßig positiv	24 (22,6 %)	8 (7,5 %)
stark positiv	20 (18,9 %)	0 (0 %)
<u>Anzahl positiver Zellen</u>		
0 %	7 (6,6 %)	70 (66,0 %)
< 10 %	5 (4,7 %)	9 (8,5 %)
11 - 50 %	11 (10,4 %)	16 (15,1 %)
51 - 80 %	22 (20,8 %)	10 (9,4 %)
> 80 %	61 (57,5 %)	1 (0,9 %)
<u>Summenscore</u>		
0	7 (6,6 %)	70 (66,0 %)
2	4 (3,8 %)	9 (8,5 %)
3 - 4	25 (23,6 %)	21 (19,8 %)
5 - 6	57 (53,8 %)	6 (5,7 %)
7	13 (13 %)	0 (0 %)

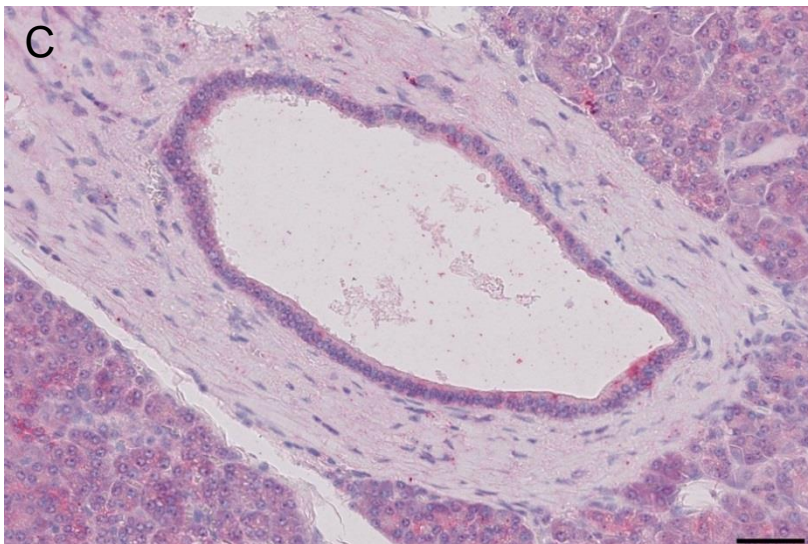
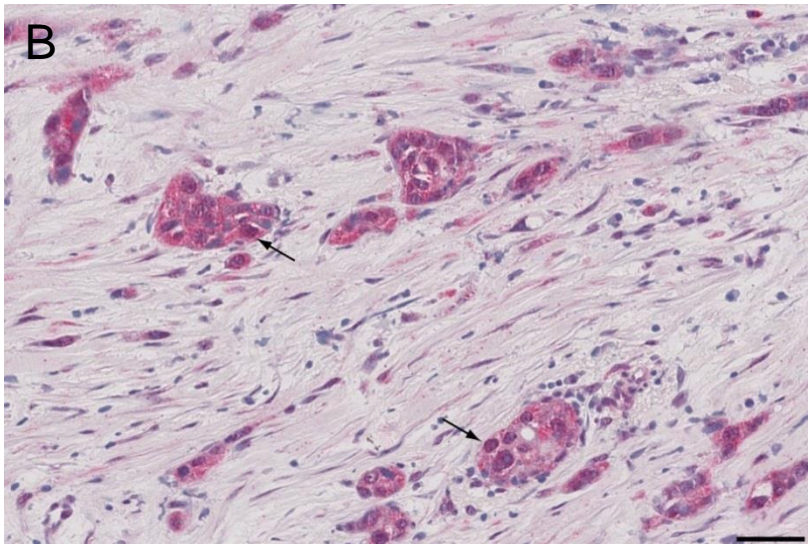
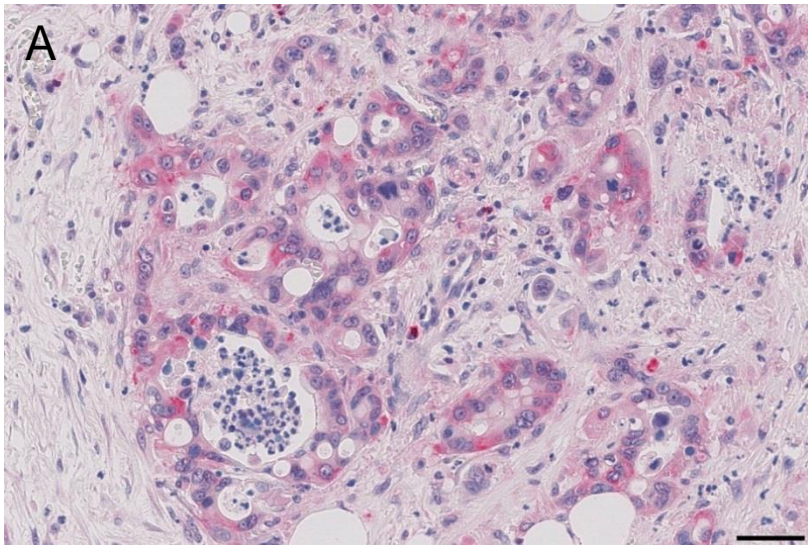


Abb.3: Immunhistochemische Färbungen von TRAIL-R1 an Pankreasgewebe. TRAIL-R1 wird sowohl im Zytoplasma (A, B) als auch in den Zellkernen (B) von duktalem Pankreasadenokarzinomzellen exprimiert. Die Pfeile zeigen auf positive Zellkerne. Eine schwache TRAIL-R1-Expression findet sich auch in nicht-malignen Pankreasgangzellen (C). Die schwarzen Balken entsprechen 50 μm (200fache Vergrößerung).

4.2.2 Korrelation der TRAIL-R1-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Zwischen der TRAIL-R1-Expression in den 106 Pankreastumoren und den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern Tumorstadium (T), Nodalstatus (N), Fernmetastasen (M), Differenzierungsgrad (G), Lymphgefäßinvasion (L), Blutgefäßinvasion (V) sowie Perineuralscheideninvasion (Pn) zeigte sich keine signifikante Korrelation (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Korrelation der TRAIL-R1-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Es werden jeweils der Korrelationskoeffizient Kendalls τ sowie die Signifikanz der Korrelation angegeben.

Färbe-parameter	T	N	M	G	L	V	Pn
Intensität Zytoplasma	$\tau=0,032$ $p=0,724$	$\tau=0,019$ $p=0,832$	$\tau=-0,095$ $p=0,369$	$\tau=-0,097$ $p=0,271$	$\tau=0,070$ $p=0,457$	$\tau=0,096$ $p=0,298$	$\tau=0,002$ $p=0,981$
Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma	$\tau=-0,090$ $p=0,319$	$\tau=-0,124$ $p=0,175$	$\tau=0,033$ $p=0,753$	$\tau=-0,099$ $p=0,259$	$\tau=0,035$ $p=0,708$	$\tau=0,021$ $p=0,824$	$\tau=0,060$ $p=0,528$
Summenscore Zytoplasma	$\tau=-0,020$ $p=0,815$	$\tau=-0,043$ $p=0,621$	$\tau=-0,028$ $p=0,780$	$\tau=-0,102$ $p=0,223$	$\tau=0,038$ $p=0,669$	$\tau=0,041$ $p=0,644$	$\tau=0,041$ $p=0,652$
Intensität Zellkerne	$\tau=-0,121$ $p=0,196$	$\tau=-0,001$ $p=0,993$	$\tau=-0,015$ $p=0,894$	$\tau=-0,103$ $p=0,285$	$\tau=0,033$ $p=0,731$	$\tau=0,114$ $p=0,234$	$\tau=0,125$ $p=0,206$
Anzahl pos. Zellkerne	$\tau=-0,117$ $p=0,201$	$\tau=0,027$ $p=0,770$	$\tau=-0,004$ $p=0,974$	$\tau=-0,110$ $p=0,215$	$\tau=0,047$ $p=0,623$	$\tau=0,123$ $p=0,186$	$\tau=0,128$ $p=0,183$
Summenscore Zellkerne	$\tau=-0,116$ $p=0,202$	$\tau=0,013$ $p=0,890$	$\tau=-0,015$ $p=0,889$	$\tau=-0,111$ $p=0,210$	$\tau=0,047$ $p=0,614$	$\tau=0,124$ $p=0,181$	$\tau=0,125$ $p=0,191$

τ Kendalls τ , p p-Wert, T Tumorstadium, N Nodalstatus, M Fernmetastasen, G Differenzierungsgrad, L Lymphgefäßinvasion, V Blutgefäßinvasion, Pn Perineuralscheideninvasion

4.2.3 TRAIL-R1-Expression und Patienten-Überleben

Die erhobenen Befunde für Intensität und Anzahl positiver Zellen sowie der gebildete Summenscore wurden jeweils dichotomisiert. Mittels Log-Rank-Test wurden die Mediane der beiden gebildeten Gruppen verglichen. Hierbei fand sich in der Gruppe der Patienten, in deren Tumoren mehr als 80 % der Zellen TRAIL-R1 im Zytoplasma exprimierten, mit 21 Monaten gegenüber 8 Monaten ($p = 0,004$) ein signifikant längeres medianes Überleben als in der Gruppe der Patienten mit weniger als 80 % TRAIL-R1 positiven Zellen (siehe Abb. 4). Zytoplasmatische Intensität und Summenscore sowie alle für die Kernfärbung erhobenen Befunde zeigten keinen signifikanten Einfluss auf das mediane Patientenüberleben (siehe Tab. 6).

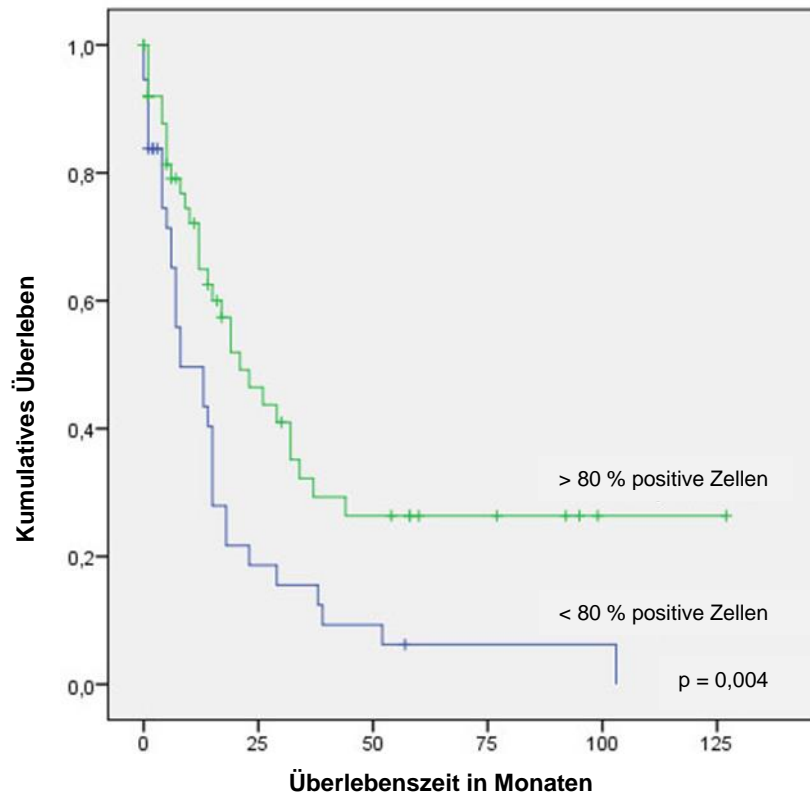


Abb. 4: Kaplan-Meier-Analyse des kumulativen Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Anzahl der Zellen, die TRAIL-R1 im Zytoplasma exprimieren. Die Signifikanz (p) wurde mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Tab. 6: Patienten-Überleben in Abhängigkeit der TRAIL-R1-Expression

Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Färbeparameter	Gesamtanzahl der Patienten	Anzahl der verstorbenen Patienten	Medianes Gesamtüberleben \pm SF (95 % KI) in Monaten	p-Wert
<u>Färbeintensität Zytoplasma</u> neg. bis schwach pos. mäßig bis stark pos	53 36	37 25	15 \pm 1,895 (11,285 - 18,715) 19 \pm 4,409 (10,358 - 27,642)	0,723
<u>Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma</u> < 80 % > 80 %	37 52	32 30	8 \pm 4.205 (0.000 - 16.241) 21 \pm 5.134 (10.938 - 31.062)	0,004
<u>Sumenscore Zytoplasma</u> \leq 5 > 5	58 31	41 21	15 \pm 1,635 (11,795 - 18,205) 19 \pm 5,372 (8,470 - 29,530)	0,476
<u>Intensität Zellkerne</u> neg. pos.	61 28	41 21	15 \pm 2.302 (10,288 - 19,512) 15 \pm 1,826 (11,412 - 18,579)	0,564
<u>Anzahl pos. Zellkerne</u> < 10 % > 10 %	69 20	47 15	15 \pm 2.340 (10.414 - 19.586) 15 \pm 2.108 (10.868 - 19.132)	0,718
<u>Summenscore Zellkerne</u> \leq 3 > 3	18 71	14 41	7 \pm 0,605 (5,813 - 8,187) 17 \pm 2,054 (12,974 - 21,026)	0,131

SF Standardfehler, KI Konfidenzintervall, neg. negativ, pos. positiv

4.2.4 TRAIL-R1-Expression in nicht malignem Pankreasgewebe

Bei 28 Patienten wurde neben dem Tumorgewebe auch peritumorales nicht maligne verändertes Pankreasgewebe untersucht und mit dem jeweils korrespondierenden Tumor verglichen. Im nicht malignen Gewebe wurde qualitativ die Intensität der jeweiligen Antigen-Expression in den vorhandenen Pankreasgangzellen ausgewertet. Da die Anzahl der vorhandenen Ausführungsgänge in den Präparaten sehr heterogen war und in einigen Präparaten weniger als 100 Zellen ausgewertet werden konnten, wurde auf eine quantitative Auswertung mit Angabe der Anzahl positiver Zellen verzichtet. Im nicht maligne veränderten Gewebe wurde TRAIL-R1 in 89,3 % der Fälle im Zytoplasma und in 7,1 % der Fälle im Zellkern exprimiert (siehe Abb. 3C). Es zeigte sich eine signifikant stärkere Intensität der nukleären Expression

in Tumorzellen im Vergleich zur Intensität in nicht malignen Pankreasgangzellen ($p = 0,008$). Die zytoplasmatische Intensität war im Tumor nicht signifikant stärker als im nicht malignen Gewebe ($p = 0,426$) (siehe Abb. 5).

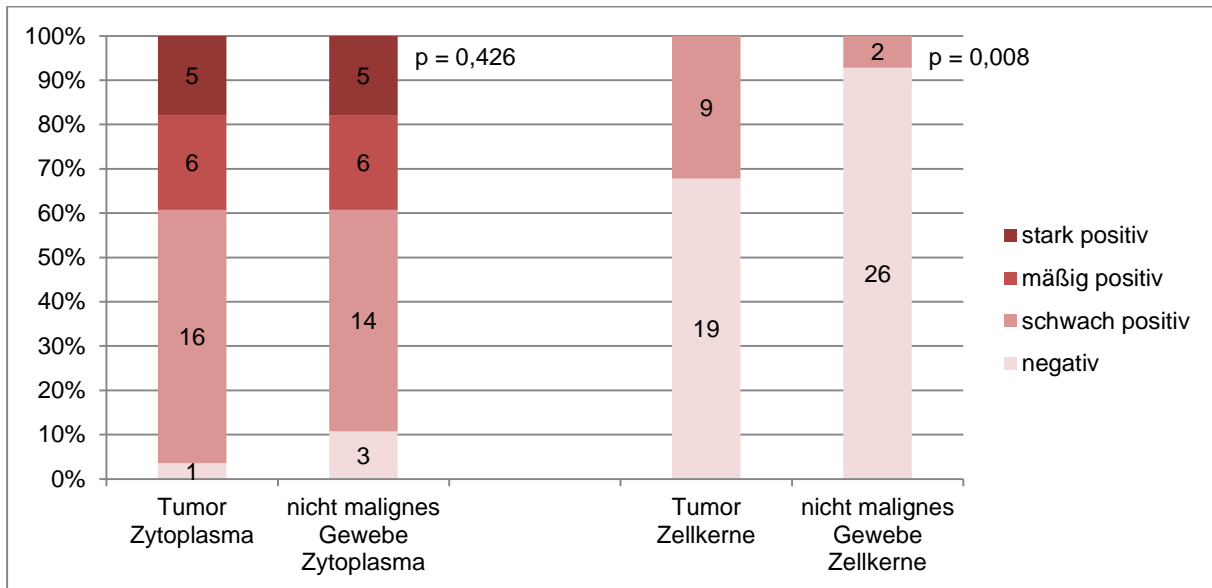


Abb. 5: Intensität der TRAIL-R1-Expression in Tumor und nicht malignem Gewebe. Die Intensität der TRAIL-R1-Expression in Tumor und nicht malignem peritumoralem Gewebe wurde jeweils getrennt für Zytoplasma (linke Seite) und Zellkerne (rechte Seite) verglichen. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl der Patienten (Gesamtanzahl = 28 Patienten). Die entsprechenden p-Werte (p) wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ermittelt.

4.2.5 TRAIL-R1-Expression in Lymphknotenmetastasen

Von 17 Patienten war zusätzlich zum Primärtumorgewebe Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Material von Lymphknotenmetastasen vorhanden. Diese wurden ebenfalls immunhistochemisch untersucht und mit den entsprechenden Primärtumoren verglichen. Es wurden aufgrund der geringen Anzahl von Tumorzellen in den Lymphknotenmetastasen nur die Intensitäten der jeweiligen Antigen-Expressionen betrachtet. Insgesamt wurde TRAIL-R1 in 64,7 % der Lymphknotenmetastasen im Zytoplasma und in 5,9 % der Lymphknotenmetastasen im Zellkern exprimiert. Beim Vergleich mit den entsprechenden Primärtumoren ergab sich eine signifikant stärkere Intensität der zytoplasmatischen TRAIL-R1-Expression im Tumor im Vergleich zu den Lymphknotenmetastasen ($p = 0,005$). Für die Zellkerne zeigte sich kein signifikanter Unterschied (siehe Abb. 6).

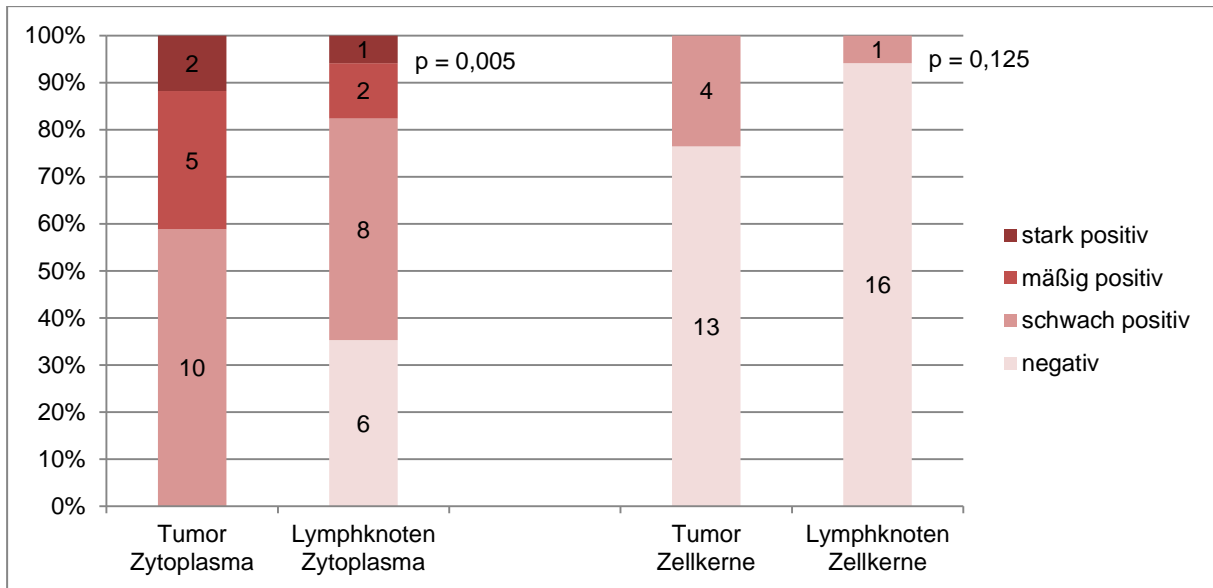


Abbildung 6: Intensität der TRAIL-R1-Expression in Tumor und Lymphknotenmetastasen. Die Intensität der TRAIL-R1-Expression in Tumor und Lymphknotenmetastasen wurde jeweils getrennt für Zytoplasma (linke Seite) und Zellkerne (rechte Seite) verglichen. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl der Patienten (Gesamtanzahl = 17 Patienten). Die entsprechenden p-Werte (p) wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ermittelt.

4.3 TRAIL-R2

4.3.1 TRAIL-R2-Expression in Pankreastumoren

TRAIL-R2 wurde in allen 106 Tumoren im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert. In 55,7 % der Fälle waren die Tumorzellen im Zytoplasma schwach, in 39,6 % mäßig und in 4,7 % der Fälle stark positiv. In 86,8 % der Fälle exprimierten über 80 % der Tumorzellen TRAIL-R2 im Zytoplasma. Bei 64,2 % der Karzinome konnte zudem eine nukleäre Expression von TRAIL-R2 detektiert werden. Diese war in 41,5 % der Fälle schwach, in 20,8 % der Fälle mäßig und in 1,9 % der Fälle stark positiv. In 25,5 % der Fälle exprimierten mehr als die Hälfte der Zellkerne der Karzinomzellen TRAIL-R2 (siehe Tab. 7 und Abb. 7). Eine eindeutige membranständige Färbung konnte für TRAIL-R2 nicht detektiert werden.

Tab. 7: TRAIL-R2-Expression in den 106 Pankreaskarziomen

Die Färbeintensität, die Anzahl positiver Zellen und der daraus berechnete Summenscore wurde jeweils getrennt für das Zytoplasma und für die Zellkerne ermittelt.

Färbeparameter	Zytoplasma Anzahl der Tumoren	Zellkerne Anzahl der Tumoren
<u>Färbeintensität</u>		
negativ	0 (0,0 %)	38 (35,8 %)
schwach positiv	59 (55,7 %)	44 (41,5 %)
mäßig positiv	42 (39,6 %)	22 (20,8 %)
stark positiv	5 (4,7 %)	2 (1,9 %)
<u>Anzahl positiver Zellen</u>		
0 %	0 (0,0 %)	38 (35,8 %)
< 10 %	0 (0,0 %)	14 (13,2 %)
11 - 50 %	3 (2,8 %)	27 (25,5 %)
51 - 80 %	11 (10,4 %)	18 (17,0 %)
> 80 %	92 (86,8 %)	9 (8,5 %)
<u>Summenscore</u>		
0	0 (0,0 %)	38 (35,8 %)
2	0 (0,0 %)	12 (11,3 %)
3 - 4	11 (10,4 %)	38 (35,8 %)
5 - 6	91 (85,8 %)	16 (15,1 %)
7	4 (3,8 %)	2 (1,9 %)

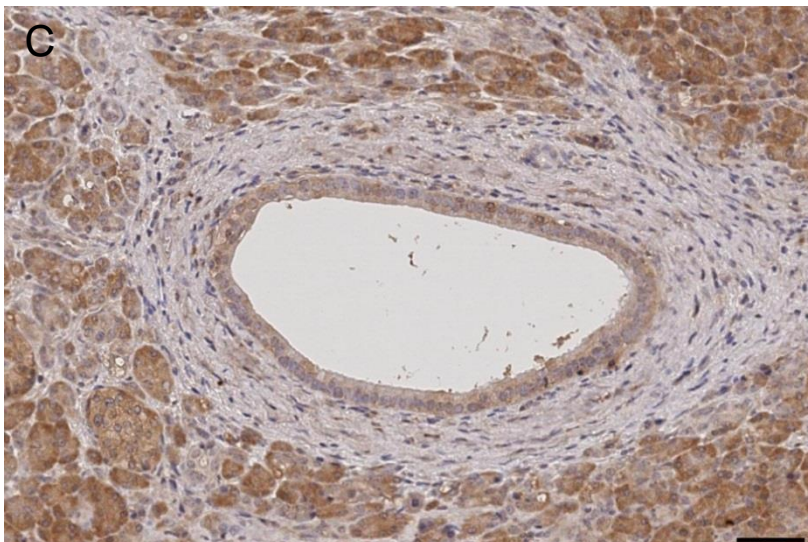
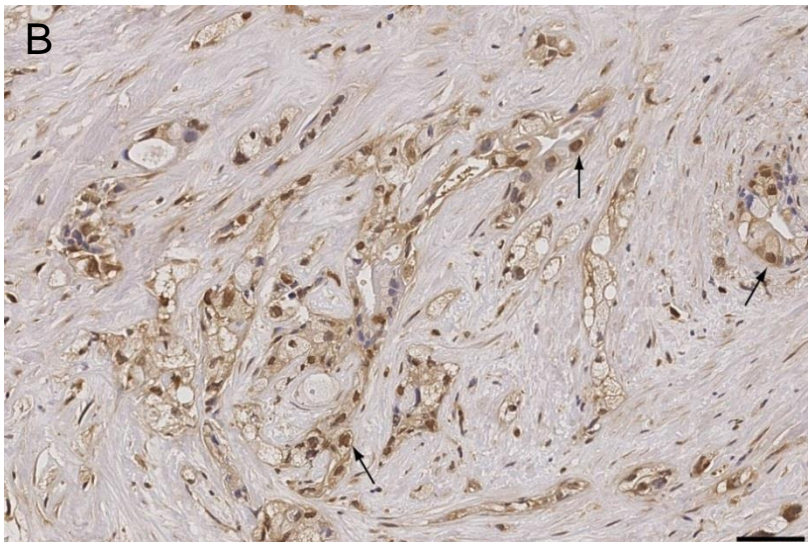
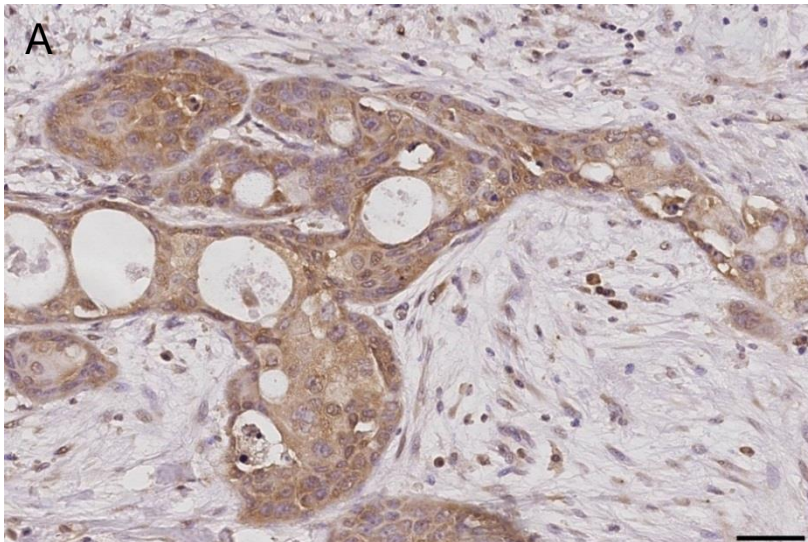


Abb.7: Immunhistochemische Färbungen von TRAIL-R2 an Pankreasgewebe. TRAIL-R2 wird sowohl im Zytoplasma (A, B) als auch in den Zellkernen (B) von duktalem Pankreasadenokarzinomzellen exprimiert. Die Pfeile zeigen auf positive Zellkerne. Eine schwache TRAIL-R2-Expression findet sich auch in nicht-malignen Pankreasgangzellen (C). Die schwarzen Balken entsprechen 50 μm (200fache Vergrößerung).

4.3.2 Korrelation der TRAIL-R2-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Es wurde jeweils getrennt für Zytoplasma und Zellkerne untersucht, ob eine signifikante Korrelation zwischen der Intensität der Immunfärbung, der Anzahl positiver Zellen oder dem gebildeten Summenscore mit einem der folgenden klinisch-pathologischen Parameter besteht: Tumorstadium (T), Nodalstatus (N), Fernmetastasen (M), Differenzierungsgrad (G), Lymphgefäßinvasion (L), Blutgefäßinvasion (V), Perineuralscheideninvasion (Pn) (siehe Tab. 3).

Es zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Intensität der TRAIL-R2-Expression im Zytoplasma und der Lymphgefäßinvasion ($p = 0,001$) sowie zwischen dem Summenscore der zytoplasmatischen TRAIL-R2-Expression und der Lymphgefäßinvasion ($p = 0,001$) (siehe Tab .8).

Tab. 8: Korrelation der TRAIL-R2-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Es werden jeweils der Korrelationskoeffizient Kendalls τ sowie die Signifikanz der Korrelation angegeben.

Färbe-parameter	T	N	M	G	L	V	Pn
Intensität Zytoplasma	$\tau=0,165$ $p=0,082$	$\tau=0,182$ $p=0,057$	$\tau=-0,147$ $p=0,181$	$\tau=-0,090$ $p=0,328$	$\tau=0,333$ $p=0,001$	$\tau=0,109$ $p=0,259$	$\tau=0,054$ $p=0,586$
Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma	$\tau=-0,186$ $p=0,051$	$\tau=-0,065$ $p=0,499$	$\tau=-0,013$ $p=0,905$	$\tau=-0,076$ $p=0,411$	$\tau=0,012$ $p=0,903$	$\tau=0,065$ $p=0,507$	$\tau=-0,030$ $p=0,765$
Summenscore Zytoplasma	$\tau=0,058$ $p=0,524$	$\tau=0,131$ $p=0,158$	$\tau=-0,114$ $p=0,281$	$\tau=-0,102$ $p=0,252$	$\tau=0,303$ $p=0,001$	$\tau=0,132$ $p=0,159$	$\tau=0,029$ $p=0,764$
Intensität Zellkerne	$\tau=-0,051$ $p=0,576$	$\tau=-0,034$ $p=0,714$	$\tau=-0,118$ $p=0,267$	$\tau=-0,154$ $p=0,081$	$\tau=-0,056$ $p=0,551$	$\tau=-0,074$ $p=0,428$	$\tau=-0,058$ $p=0,546$
Anzahl pos. Zellkerne	$\tau=-0,042$ $p=0,631$	$\tau=-0,071$ $p=0,421$	$\tau=-0,100$ $p=0,328$	$\tau=-0,159$ $p=0,062$	$\tau=-0,007$ $p=0,939$	$\tau=-0,024$ $p=0,785$	$\tau=-0,061$ $p=0,504$
Summenscore Zellkerne	$\tau=-0,038$ $p=0,658$	$\tau=-0,054$ $p=0,538$	$\tau=-0,104$ $p=0,306$	$\tau=-0,141$ $p=0,095$	$\tau=-0,025$ $p=0,779$	$\tau=-0,031$ $p=0,725$	$\tau=-0,066$ $p=0,465$

τ Kendalls τ , p p-Wert, T Tumorstadium, N Nodalstatus, M Fernmetastasen, G Differenzierungsgrad, L Lymphgefäßinvasion, V Blutgefäßinvasion, Pn Perineuralscheideninvasion

4.3.3 TRAIL-R2-Expression und Überleben

In der Patientengruppe mit mäßig bis starker zytoplasmatischer TRAIL-R2-Expression der Tumorzellen zeigte sich mit 21 Monaten gegenüber 10 Monaten ($p = 0,017$) ein signifikant längeres medianes postoperatives Gesamtüberleben als in

der Gruppe mit schwach positiver zytoplasmatischer Expression (siehe Abb. 8). Die Anzahl der Zellen mit positivem Zytoplasma und Summenscore der zytoplasmatischen Färbung sowie alle für die Kernfärbung erhobenen Befunde zeigten keinen signifikanten Einfluss auf das mediane Patientenüberleben (siehe Tab. 9).

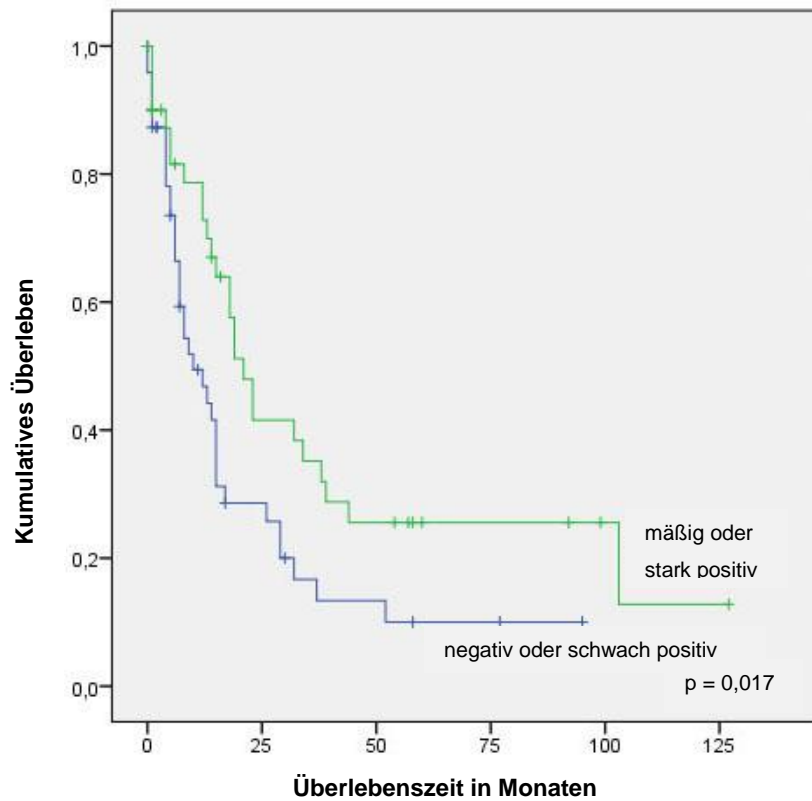


Abb. 8: Kaplan-Meier-Analyse des kumulativen Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Intensität der TRAIL-R2-Expression im Zytoplasma. Die zugehörige Signifikanz (p) wurde mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Tab. 9: Patientenüberleben in Abhängigkeit der TRAIL-R2-Expression

Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Färbeparameter	Gesamtanzahl der Patienten	Anzahl der verstorbenen Patienten	Medianes Gesamtüberleben \pm SF (95 % KI) in Monaten	p-Wert
<u>Färbeintensität Zytoplasma</u> schwach pos. mäßig bis stark pos.	48 41	36 26	10 \pm 3,050 (4,022 - 15,978) 21 \pm 2,709 (15,691 - 23,309)	0,017
<u>Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma</u> < 80 % > 80 %	13 76	11 51	9 \pm 1.699 (5.669 - 12.331) 15 \pm 1.830 (11.413 - 18.587)	0,243
<u>Sumenscore Zytoplasma</u> \leq 5 > 5	51 38	37 25	12 \pm 3,724 (4,700 - 19,300) 19 \pm 3,127 (12,871 - 25,126)	0,061
<u>Intensität Zellkerne</u> neg. pos.	32 57	21 41	17 \pm 2,993 (11,133 - 22,867) 15 \pm 1,672 (11,723 - 18,277)	0,868
<u>Anzahl pos. Zellkerne</u> < 10 % > 10 %	45 44	30 32	15 \pm 2.313 (10.467 - 19.533) 15 \pm 2.168 (10.751 - 19.249)	0,947
<u>Summenscore Zellkerne</u> \leq 4 > 4	74 15	51 11	17 \pm 2.120 (12,845 - 21,155) 7 \pm 0,912 (5,212 - 8,788)	0,276

SF Standardfehler, KI Konfidenzintervall, neg. negativ, pos. positiv

4.3.4 TRAIL-R2-Expression in nicht malignem Pankreasgewebe

Von 28 Patienten wurde zusätzlich zum Tumorgewebe auch nicht malignes peritumorales Gewebe untersucht. TRAIL-R2 wurde im nicht maligne veränderten Gewebe in allen Fällen im Zytoplasma und in 35,7 % der Fälle im Zellkern exprimiert (siehe Abb. 7C). Das peritumorale Gewebe wurde zudem mit den entsprechenden Tumoren verglichen. Hierbei zeigte sich eine signifikant stärkere zytoplasmatische Expression im Tumor als im nicht malignen Gewebe ($p = 0,003$). Die Intensität der TRAIL-R2-Expression in den Tumorzellkernen war ebenfalls stärker als in den Kernen der nicht malignen Gangzellen, wenn auch der Unterschied hier nicht signifikant war ($p = 0,064$) (siehe Abb. 9).

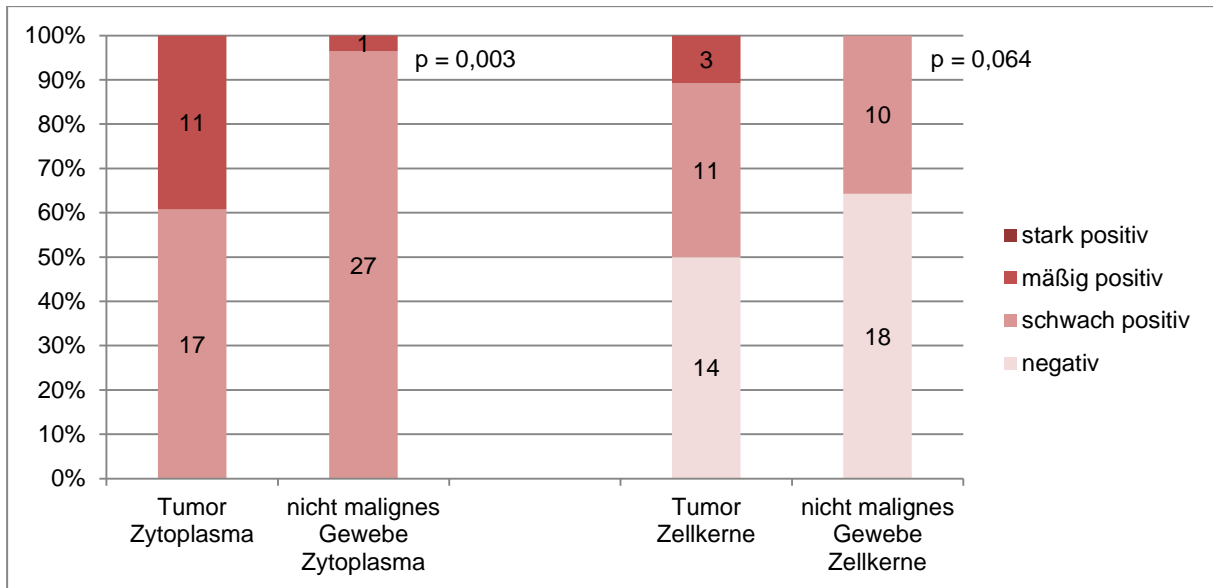


Abb. 9: Intensität der TRAIL-R2-Expression in Tumor und nicht malignem Gewebe. Die Intensität der TRAIL-R2-Expression in Tumor und nicht malignem peritumoralem Gewebe wurde jeweils getrennt für Zytosoma (linke Seite) und Zellkerne (rechte Seite) verglichen. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl der Patienten (Gesamtanzahl = 28 Patienten). Die entsprechenden p-Werte (p) wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ermittelt.

4.3.5 TRAIL-R2-Expression in Lymphknotenmetastasen

Von 17 Patienten wurden zusätzlich zum Tumorgewebe auch Lymphknotenmetastasen untersucht. TRAIL-R2 wurde in 76,5 % der Lymphknotenmetastasen im Zytosoma und in 11,8 % der Metastasen im Zellkern exprimiert. Beim Vergleich mit den entsprechenden Primärtumoren zeigte sich eine signifikant stärkere Intensität der TRAIL-R2-Expression in den Primärtumoren als in den Lymphknotenmetastasen und zwar sowohl im Zytosoma ($p < 0,001$) als auch in den Zellkernen ($p = 0,028$) (siehe Abb. 10).

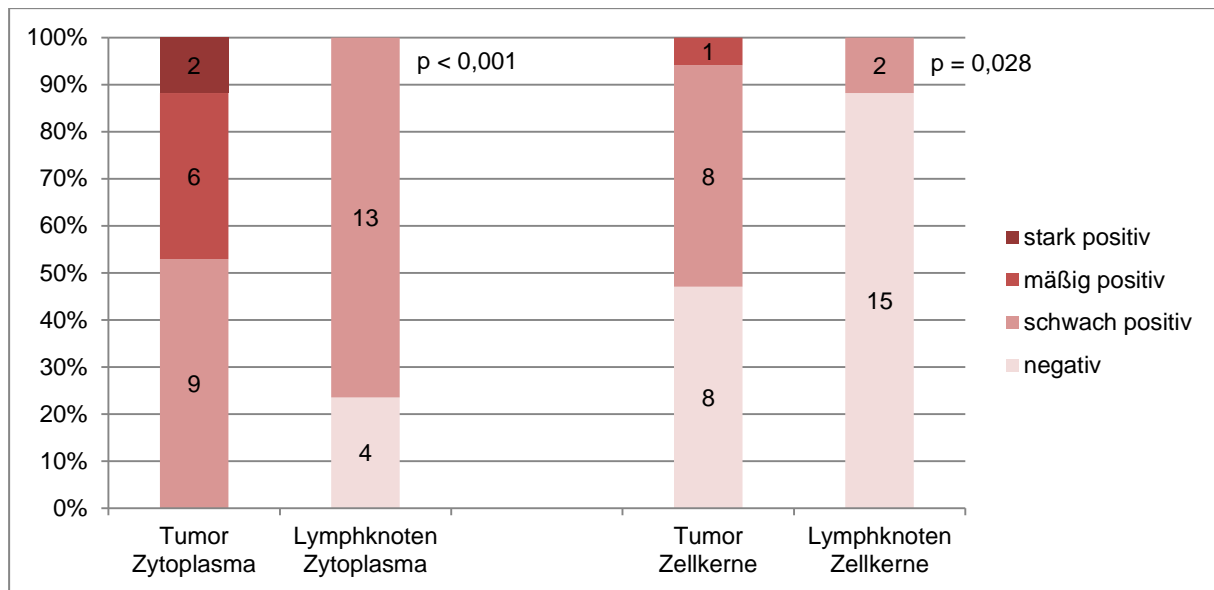


Abbildung 10: Intensität der TRAIL-R2-Expression in Tumor und Lymphknotenmetastasen. Die Intensität der TRAIL-R2-Expression in Tumor und Lymphknotenmetastasen wurde jeweils getrennt für Zytosoma (linke Seite) und Zellkerne (rechte Seite) verglichen. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl der Patienten (Gesamtanzahl = 17 Patienten). Die entsprechenden p-Werte (p) wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ermittelt.

4.4 TRAIL-R4

4.4.1 TRAIL-R4-Expression in Pankreastumoren

Alle Pankreastumoren exprimierten TRAIL-R4 im Zytosoma. In 27,4 % der Fälle war die Expression schwach, in 50,9 % mäßig und in 21,7 % stark positiv. In 89,6 % der Karzinome exprimierten über 80 % der Zellen im Zytosoma TRAIL-R4. Eine nukleäre Expression von TRAIL-R4 zeigten 83 % der untersuchten Tumore, wobei diese in 37,7 % der Fälle schwach, in 34 % der Fälle mäßig und in 11,3 % der stark positiv war (siehe Tab. 10 und Abb. 11). In 36,8 % der Fälle exprimierten mehr als die Hälfte der Zellkerne eines Tumors TRAIL-R4. Zudem fiel eine starke TRAIL-R4-Expression in den Erythrozyten auf. Diese waren in der Negativkontrolle nicht angefärbt. Außerdem zeigte in einigen Tumoren das direkt um die Tumorzellen herum liegende Bindegewebe eine starke Anfärbung, wohingegen tumorfernes Bindegewebe negativ oder nur schwach positiv war. Eine TRAIL-R4-Expression an den Zellmembranen der Tumorzellen war nicht zu erkennen.

Tab. 10: TRAIL-R4-Expression in den 106 Pankreaskarziomen

Die Färbeintensität, die Anzahl positiver Zellen und der daraus berechnete Summenscore wurde jeweils getrennt für das Zytoplasma und für die Zellkerne ermittelt.

Färbeparameter	Zytoplasma Anzahl der Tumoren	Zellkern Anzahl der Tumoren
<u>Färbeintensität</u>		
negativ	0 (0,0 %)	18 (17,0 %)
schwach positiv	29 (27,4 %)	40 (37,7 %)
mäßig positiv	54 (50,9 %)	36 (34,0 %)
stark positiv	23 (21,7 %)	12 (11,3 %)
<u>Anzahl positiver Zellen</u>		
0 %	0 (0,0 %)	18 (17,0 %)
< 10 %	0 (0,0 %)	21 (19,8 %)
11 - 50 %	2 (1,9 %)	28 (26,4 %)
51 - 80 %	9 (8,5 %)	27 (25,5 %)
> 80 %	95 (89,6 %)	12 (11,3 %)
<u>Summenscore</u>		
0	0 (0,0 %)	18 (17,0 %)
2	0 (0,0 %)	18 (17,0 %)
3 - 4	9 (8,5 %)	33 (31,2 %)
5 - 6	74 (69,9 %)	34 (32,0 %)
7	23 (21,7 %)	3 (2,8 %)

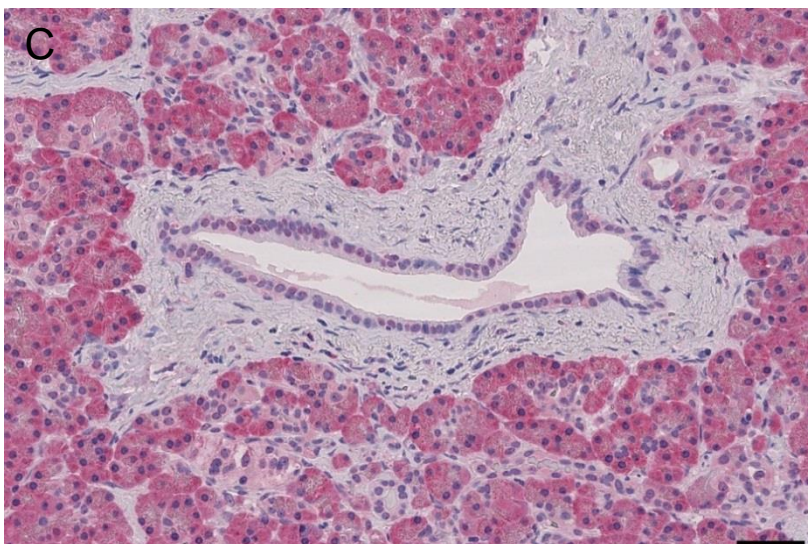
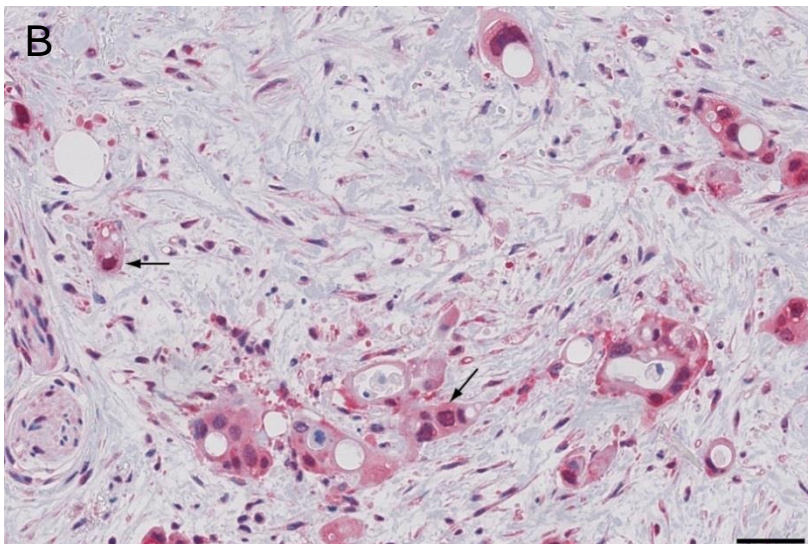
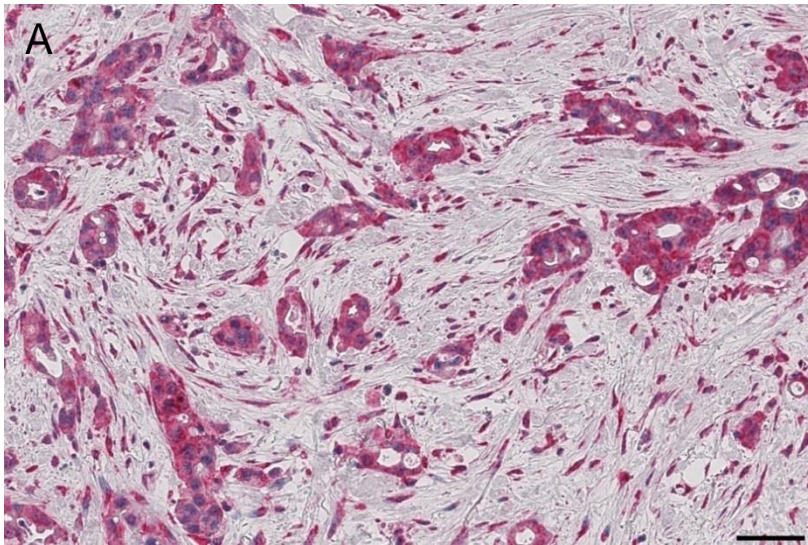


Abb.11: Immunohistochemische Färbungen von TRAIL-R4 an Pankreasgewebe. TRAIL-R4 wird sowohl im Zytoplasma (A, B) als auch in den Zellkernen (B) von duktalem Pankreasadenokarzinomzellen exprimiert. Die Pfeile zeigen auf positive Zellkerne. Zudem zeigt sich eine starke Expression im peritumoralen Bindegewebe (A). Eine schwache TRAIL-R4-Expression findet sich in nicht-malignen Pankreasgangzellen (C). Die schwarzen Balken entsprechen 50 µm (200fache Vergrößerung).

4.4.2 Korrelation der TRAIL-R4-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Zwischen der TRAIL-R4-Expression in den 106 Pankreastumoren und den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern Tumorstadium (T), Nodalstatus (N), Fernmetastasen (M), Differenzierungsgrad (G), Lymphgefäßinvasion (L), Blutgefäßinvasion (V) sowie Perineuralscheideninvasion (Pn) zeigte sich keine signifikante Korrelation (siehe Tab. 11).

Tab. 11: Korrelation der TRAIL-R4-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Es werden jeweils der Korrelationskoeffizient Kendalls τ sowie die Signifikanz der Korrelation angegeben.

Färbe-parameter	T	N	M	G	L	V	Pn
Intensität Zytoplasma	$\tau=-0,065$ $p=0,479$	$\tau=-0,045$ $p=0,627$	$\tau=0,110$ $p=0,303$	$\tau=-0,079$ $p=0,378$	$\tau=0,024$ $p=0,800$	$\tau=-0,002$ $p=0,986$	$\tau=-0,143$ $p=0,138$
Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma	$\tau=0,060$ $p=0,534$	$\tau=-0,024$ $p=0,802$	$\tau=0,158$ $p=0,157$	$\tau=0,031$ $p=0,740$	$\tau=-0,015$ $p=0,880$	$\tau=0,092$ $p=0,347$	$\tau=-0,094$ $p=0,350$
Summenscore Zytoplasma	$\tau=-0,045$ $p=0,618$	$\tau=-0,046$ $p=0,612$	$\tau=-0,062$ $p=0,552$	$\tau=-0,064$ $p=0,464$	$\tau=0,011$ $p=0,907$	$\tau=0,019$ $p=0,839$	$\tau=-0,160$ $p=0,089$
Intensität Zellkerne	$\tau=-0,007$ $p=0,941$	$\tau=0,116$ $p=0,200$	$\tau=0,038$ $p=0,717$	$\tau=-0,057$ $p=0,510$	$\tau=-0,037$ $p=0,690$	$\tau=-0,019$ $p=0,836$	$\tau=0,173$ $p=0,065$
Anzahl pos. Zellkerne	$\tau=-0,020$ $p=0,818$	$\tau=0,012$ $p=0,892$	$\tau=0,052$ $p=0,606$	$\tau=-0,027$ $p=0,745$	$\tau=-0,044$ $p=0,623$	$\tau=-0,107$ $p=0,229$	$\tau=0,078$ $p=0,392$
Summenscore Zellkerne	$\tau=-0,029$ $p=0,731$	$\tau=0,067$ $p=0,438$	$\tau=0,068$ $p=0,496$	$\tau=-0,033$ $p=0,687$	$\tau=-0,046$ $p=0,603$	$\tau=-0,068$ $p=0,423$	$\tau=0,116$ $p=0,194$

τ Kendalls τ , p p-Wert, T Tumorstadium, N Nodalstatus, M Fernmetastasen, G Differenzierungsgrad, L Lymphgefäßinvasion, V Blutgefäßinvasion, Pn Perineuralscheideninvasion

4.4.3 TRAIL-R4-Expression und Patientenüberleben

Intensität, Anzahl und Summenscore der zytoplasmatischen TRAIL-R4-Expression korrelierten nicht signifikant mit dem medianen Patientenüberleben (siehe Tab. 12). Bei der nukleären TRAIL-R4-Expression zeigten Patienten mit einem hohen Summenscore über 4 Punkten ein signifikant kürzeres medianes Überleben von 10 Monaten im Vergleich zu 17 Monaten in der Patientengruppe mit einem geringeren nukleären Summenscore ($p = 0,027$) (siehe Abb. 12). Beim Vergleich von Patienten mit TRAIL-R4-Expression in den Zellkernen mit denen ohne TRAIL-R4-Expression im Zellkern zeigte sich kein signifikanter Überlebensunterschied. Ebenso wenig

zeigten Patienten mit mehr als 10 % positiven Zellkernen ein signifikant kürzeres Überleben im Vergleich zu den Patienten mit weniger oder keinen positiven Zellkernen.

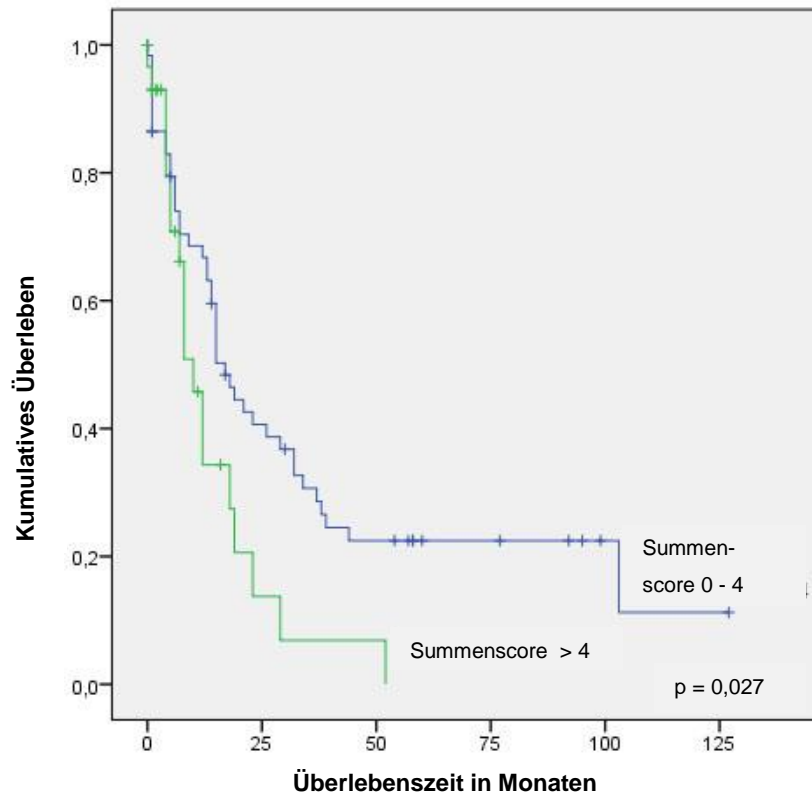


Abb. 12: Kaplan-Meier-Analyse des kumulativen Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Summenscore der TRAIL-R4-Expression in den Zellkernen. Die zugehörige Signifikanz (p) wurde mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Tab. 12: Patientenüberleben in Abhängigkeit der TRAIL-R4-Expression

Die zugehörigen Signifikanzen wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Färbeparameter	Gesamtanzahl der Patienten	Anzahl der verstorbenen Patienten	Medianes Gesamtüberleben \pm SF (95 % KI) in Monaten	p-Wert
<u>Färbeintensität Zytoplasma</u> neg. bis schwach pos. mäßig bis stark pos.	25 64	18 44	13 \pm 3,382 (6,371 - 19,629) 15 \pm 2,431 (10,235 - 19,765)	0,726
<u>Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma</u> < 80 % > 80 %	11 78	10 52	13 \pm 3,162 (6,802 - 19,198) 15 \pm 2,326 (10,442 - 19,558)	0,565
<u>Sumenscore Zytoplasma</u> \leq 5 > 5	27 62	20 42	15 \pm 1,740 (11,589 - 18,411) 15 \pm 2,757 (9,595 - 20,405)	0,831
<u>Intensität Zellkerne</u> neg. pos.	15 74	11 51	15 \pm 5,936 (3,365 - 26,635) 15 \pm 2,783 (9,546 - 20,454)	0,940
<u>Anzahl pos. Zellkerne</u> < 10 % > 10 %	51 38	37 25	15 \pm 1,598 (11,868 - 18,132) 12 \pm 4,047 (4,069 - 19,931)	0,876
<u>Summenscore Zellkerne</u> \leq 4 > 4	60 29	43 19	17 \pm 2,232 (12,625 - 21,375) 10 \pm 1,711 (6,646 - 13,354)	0,027

SF Standardfehler, KI Konfidenzintervall, neg. negativ, pos. positiv

4.4.4 TRAIL-R4-Expression in nicht malignem Pankreasgewebe

Von 28 Patienten wurde zusätzlich zum Tumorgewebe auch nicht malignes peritumorales Gewebe untersucht. Hierbei wurde TRAIL-R4 im nicht malignen Gewebe in 89,3 % der Fälle im Zytoplasma und in 42,9 % der Fälle im Zellkern exprimiert (siehe Abb. 11C). Beim Vergleich mit den entsprechenden Tumoren war die Intensität der zytoplasmatischen sowie der nukleären TRAIL-R4-Expression im Tumorgewebe signifikant stärker als im nicht malignen Gewebe ($p < 0,001$) (siehe Abb. 13).

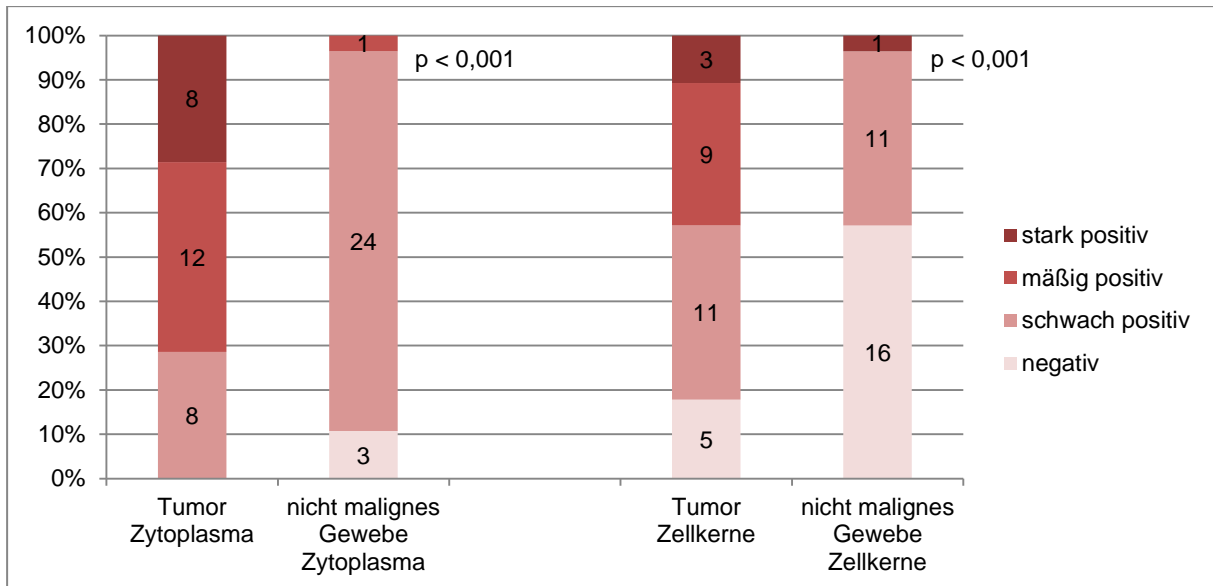


Abb. 13: Intensität der TRAIL-R4-Expression in Tumor und nicht malignem Gewebe. Die Intensität der TRAIL-R4-Expression in Tumor und nicht malignem peritumoralem Gewebe wurde jeweils getrennt für Zytoplasma (linke Seite) und Zellkerne (rechte Seite) verglichen. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl der Patienten (Gesamtanzahl = 28 Patienten). Die entsprechenden p-Werte (p) wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ermittelt.

4.4.5 TRAIL-R4-Expression in Lymphknotenmetastasen

Von 17 Patienten wurden zusätzlich zum Tumorgewebe auch Lymphknotenmetastasen untersucht. In diesen wurde TRAIL-R4 in allen Fällen im Zytoplasma und in 64,7 % der Fälle in den Zellkernen exprimiert. Beim Vergleich der Lymphknotenmetastasen mit den entsprechenden Primärtumoren zeigte sich eine signifikant stärkere Intensität der TRAIL-R4-Expression in den Primärtumoren, sowohl im Zytoplasma ($p = 0,028$) als auch in den Zellkernen ($p = 0,007$) (siehe Abb. 14).

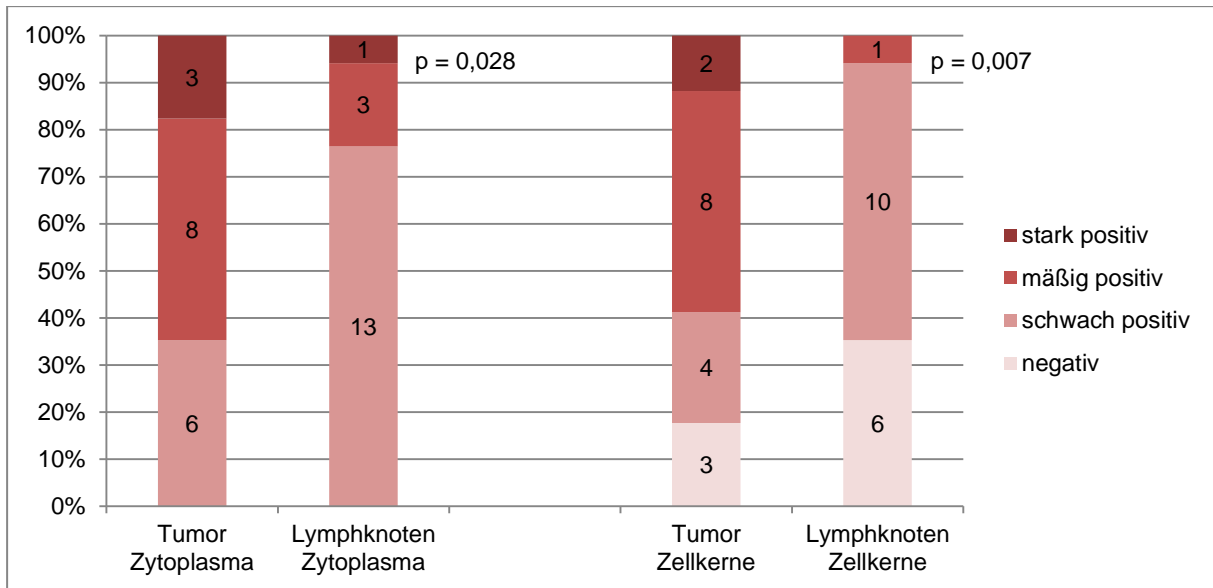


Abbildung 14: Intensität der TRAIL-R4-Expression in Tumor und Lymphknotenmetastasen. Die Intensität der TRAIL-R4-Expression in Tumor und Lymphknotenmetastasen wurde jeweils getrennt für Zytosoma (linke Seite) und Zellkerne (rechte Seite) verglichen. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl der Patienten (Gesamtanzahl = 17 Patienten). Die entsprechenden p-Werte (p) wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ermittelt.

4.5 HMGA2

4.5.1 HMGA2-Expression in Pankreastumoren

Im Großteil der 106 Pankreastumoren wurde HMGA2 im Zytosoma (86,8 %) und im Zellkern (98,1 %) exprimiert, wobei die nukleäre Expression deutlich stärker war. So zeigten nur 3,8 % der Tumoren eine mäßige und kein Tumor eine starke Anfärbung im Zytosoma, wohingegen die Kernfärbung der Tumorzellen in 58,5 % der Präparate mäßig oder stark positiv war. In 76,5 % der Fälle waren mehr als die Hälfte aller Zellkerne positiv, in 79,3 % der Tumoren exprimierten mehr als die Hälfte der Tumorzellen HMGA2 im Zytosoma (siehe Tab. 13 und Abb. 15).

Tab. 13: HMGA2-Expression in den 106 Pankreastumoren

Die Färbeintensität, die Anzahl positiver Zellen und der daraus berechnete Summenscore wurde jeweils getrennt für das Zytoplasma und für die Zellkerne ermittelt.

Färbeparameter	Zytoplasma Anzahl der Tumoren	Zellkerne Anzahl der Tumoren
<u>Färbeintensität</u>		
negativ	14 (13,2 %)	2 (1,9 %)
schwach positiv	88 (83,0 %)	42 (39,6 %)
mäßig positiv	4 (3,8 %)	35 (33,0 %)
stark positiv	0 (0 %)	27 (25,5 %)
<u>Anzahl positiver Zellen</u>		
0 %	14 (13,2 %)	2 (1,9 %)
< 10%	0 (0,0 %)	2 (1,9 %)
11 - 50 %	8 (7,5 %)	21 (19,8 %)
51 - 80 %	22 (20,8 %)	22 (20,8 %)
> 80 %	62 (58,5 %)	59 (55,7 %)
<u>Summenscore</u>		
0	14 (13,2 %)	2 (1,9 %)
2	0 (0 %)	1 (0,9 %)
3 - 4	30 (28,3 %)	25 (23,6 %)
5 - 6	62 (58,5 %)	57 (53,7 %)
7	0 (0 %)	21 (19,8 %)

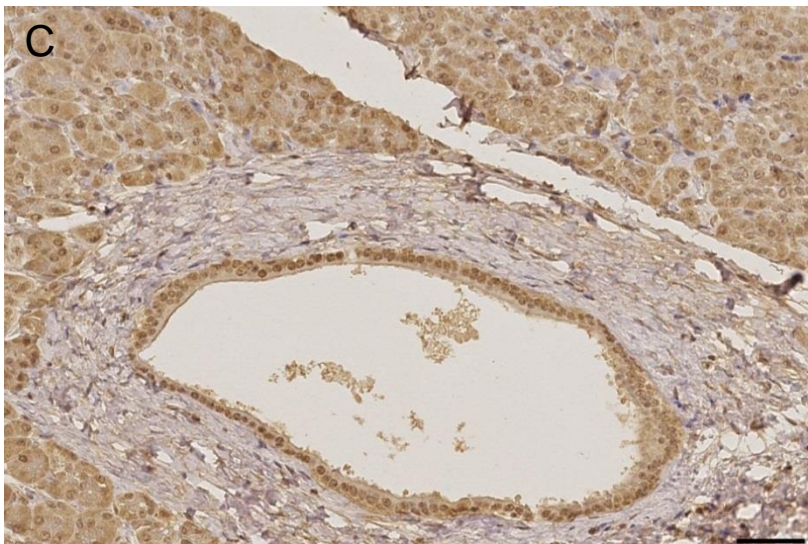
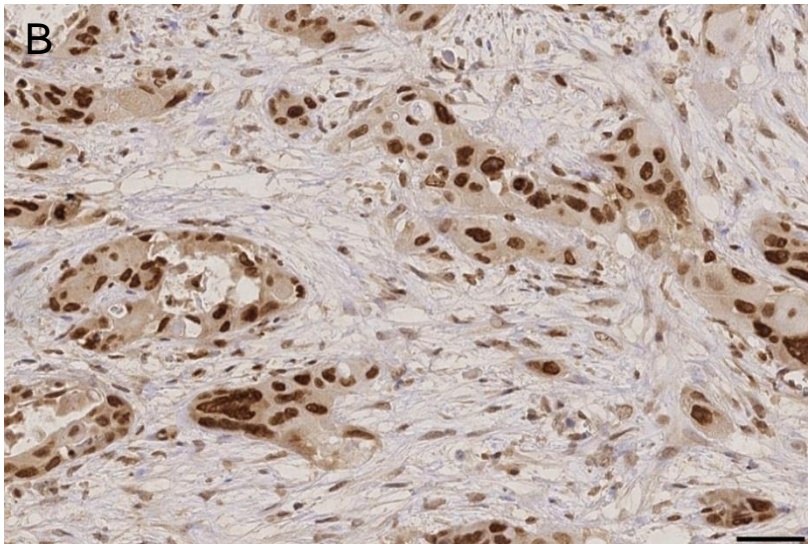
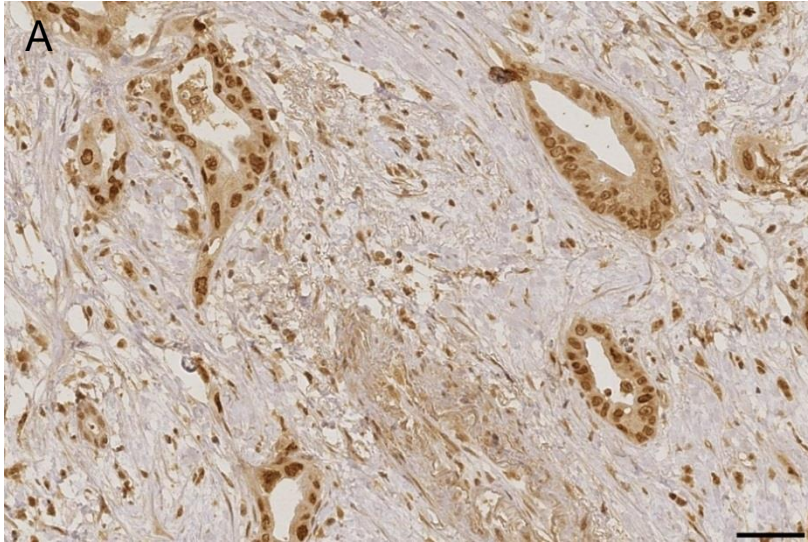


Abb.15: Immunhistochemische Färbungen von HMGA2 an Pankreasgewebe. HMGA2 wird vor allem in den Zellkernen (A, B) aber auch im Zytoplasma (A) von duktalem Pankreasadenokarzinomzellen exprimiert. Eine schwache HMGA2-Expression findet sich auch in den Kernen von nicht-malignen Pankreasgangzellen (C). Die schwarzen Balken entsprechen 50 μm (200fache Vergrößerung).

4.5.2 Korrelation der HMGA2-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Für HMGA2 konnte ein positiv gerichteter Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad und der Intensität der nukleären Expression beobachtet werden ($p = 0,028$), das heißt schlechter differenzierte Tumore zeigten eine stärkere HMGA2-Expression im Zellkern. Desweiteren zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Intensität der HMGA2-Expression im Zytoplasma und der Lymphgefäßinvasion ($p = 0,004$), sowie ein positiv gerichteter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Zellen mit HMGA2 im Zytoplasma und der Blutgefäßinvasion ($p = 0,046$) (siehe Tab. 14).

Tab. 14: Korrelation der HMGA2-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Es werden jeweils der Korrelationskoeffizient Kendalls τ sowie die Signifikanz der Korrelation angegeben.

Färbe-parameter	T	N	M	G	L	V	Pn
Intensität Zytoplasma	$\tau=0,033$ $p=0,731$	$\tau=-0,003$ $p=0,971$	$\tau=-0,135$ $p=0,224$	$\tau=-0,150$ $p=0,105$	$\tau=0,285$ $p=0,004$	$\tau=0,182$ $p=0,061$	$\tau=-0,041$ $p=0,680$
Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma	$\tau=-0,020$ $p=0,827$	$\tau=0,094$ $p=0,309$	$\tau=0,052$ $p=0,624$	$\tau=-0,120$ $p=0,174$	$\tau=0,096$ $p=0,309$	$\tau=0,185$ $p=0,046$	$\tau=0,002$ $p=0,980$
Summenscore Zytoplasma	$\tau=0,004$ $p=0,961$	$\tau=0,083$ $p=0,359$	$\tau=0,024$ $p=0,818$	$\tau=-0,098$ $p=0,263$	$\tau=0,119$ $p=0,203$	$\tau=0,176$ $p=0,056$	$\tau=-0,007$ $p=0,942$
Intensität Zellkerne	$\tau=0,124$ $p=0,172$	$\tau=0,073$ $p=0,427$	$\tau=-0,178$ $p=0,092$	$\tau=0,193$ $p=0,028$	$\tau=-0,056$ $p=0,551$	$\tau=0,016$ $p=0,865$	$\tau=-0,065$ $p=0,494$
Anzahl pos. Zellkerne	$\tau=0,015$ $p=0,868$	$\tau=0,123$ $p=0,181$	$\tau=0,006$ $p=0,952$	$\tau=-0,006$ $p=0,948$	$\tau=-0,116$ $p=0,220$	$\tau=0,064$ $p=0,490$	$\tau=0,143$ $p=0,136$
Summenscore Zellkerne	$\tau=0,087$ $p=0,316$	$\tau=0,124$ $p=0,157$	$\tau=-0,125$ $p=0,214$	$\tau=0,103$ $p=0,223$	$\tau=-0,093$ $p=0,299$	$\tau=0,047$ $p=0,594$	$\tau=0,049$ $p=0,594$

τ Kendalls τ , p p-Wert, T Tumorstadium, N Nodalstatus, M Fernmetastasen, G Differenzierungsgrad, L Lymphgefäßinvasion, V Blutgefäßinvasion, Pn Perineuralscheideninvasion

4.5.3 HMGA2 Expression und Patientenüberleben

Intensität, Anzahl und Summenscore der zytoplasmatischen HMGA2-Expression hatten keinen signifikanten Einfluss auf das mediane Überleben (siehe Tab. 15). Patienten mit stark positiven Zellkernen zeigten hingegen mit 8 Monaten gegenüber 17 Monaten bei Patienten mit negativen oder weniger stark positiven Zellkernen ein deutlich kürzeres medianes Überleben ($p = 0,035$) (siehe Abb. 16). Die Anzahl

positiver Zellkerne sowie der gebildete Summenscore für die Zellkerne hatten keinen Einfluss auf das mediane Patientenüberleben.

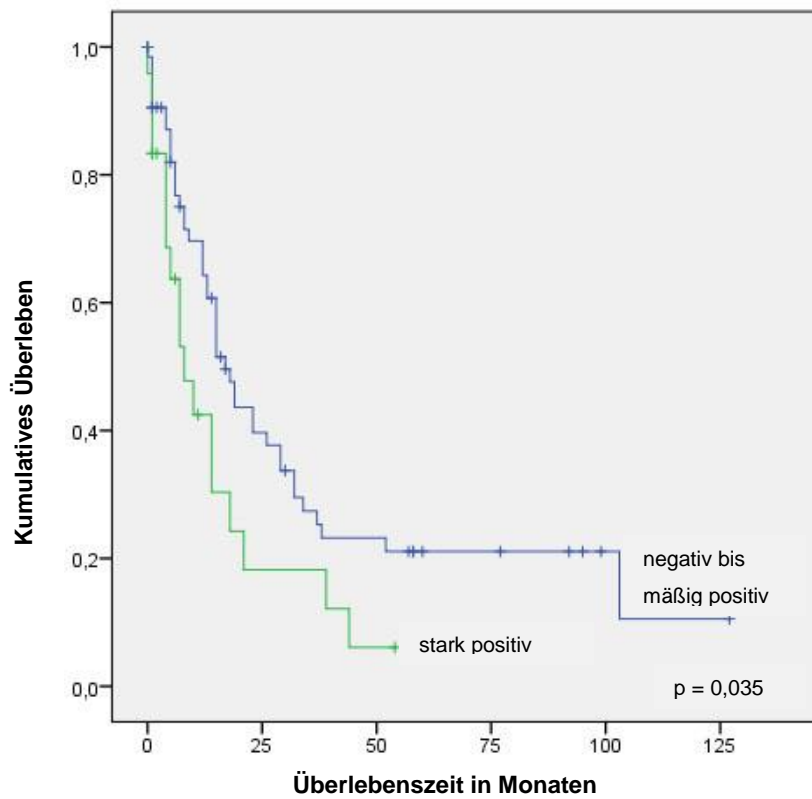


Abb. 16: Kaplan-Meier-Analyse des kumulativen Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der Intensität der HMGA2-Expression in den Zellkernen. Die zugehörige Signifikanz (p) wurde mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Tab. 15: Patientenüberleben in Abhängigkeit der HMGA2-Expression. Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Färbeparameter	Gesamtanzahl der Patienten	Anzahl der verstorbenen Patienten	Medianes Gesamtüberleben \pm SF (95 % KI) in Monaten	p-Wert
<u>Färbeintensität Zytoplasma</u> neg. pos.	10 79	7 55	6 \pm 2,519 (1,064 - 10,936) 15 \pm 2,151 (10,784 - 19,216)	0,278
<u>Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma</u> < 80 % > 80 %	37 52	29 33	15 \pm 2,597 (9,713 - 20,287) 15 \pm 3,035 (9,052 - 20,948)	0,512
<u>Sumenscore Zytoplasma</u> \leq 4 > 4	37 52	29 33	15 \pm 2,597 (9,713 - 20,287) 15 \pm 3,035 (9,052 - 20,948)	0,512
<u>Intensität Zellkerne</u> neg. bis mäßig positiv stark pos.	65 24	44 18	17 \pm 2,343 (12,407 - 21,593) 8 \pm 2,619 (2,866 - 13.134)	0,035
<u>Anzahl pos. Zellkerne</u> < 80 % > 80 %	44 45	35 27	14 \pm 1,061 (11,920 - 16,080) 21 \pm 7,056 (7,170 - 34,830)	0,345
<u>Summenscore Zellkerne</u> \leq 4 > 4	27 62	20 42	19 \pm 3,105 (12,914 - 25,086) 14 \pm 1,827 (10,419 - 17,581)	0,401

SF Standardfehler, KI Konfidenzintervall, neg. negativ, pos. positiv

4.5.4 HMGA2-Expression in nicht malignem Pankreasgewebe

Von 28 Patienten wurde zusätzlich zum Tumorgewebe auch nicht malignes peritumorales Gewebe untersucht. Hierbei zeigte sich im nicht malignen Gewebe eine HMGA2-Expression in 71,4 % der Fälle im Zytoplasma und in 82,1 % der Fälle im Zellkern (siehe Abb. 15C). Im Vergleich mit den korrespondierenden Tumoren war die Intensität der nukleären HMGA2-Expression im Tumorgewebe signifikant stärker als im nicht malignen Gewebe ($p = 0,003$). Im Zytoplasma der Tumorzellen hingegen zeigte sich keine stärkere Expression als im Zytoplasma der nicht malignen Pankreasgangzellen ($p = 0,5$) (siehe Abb. 17).

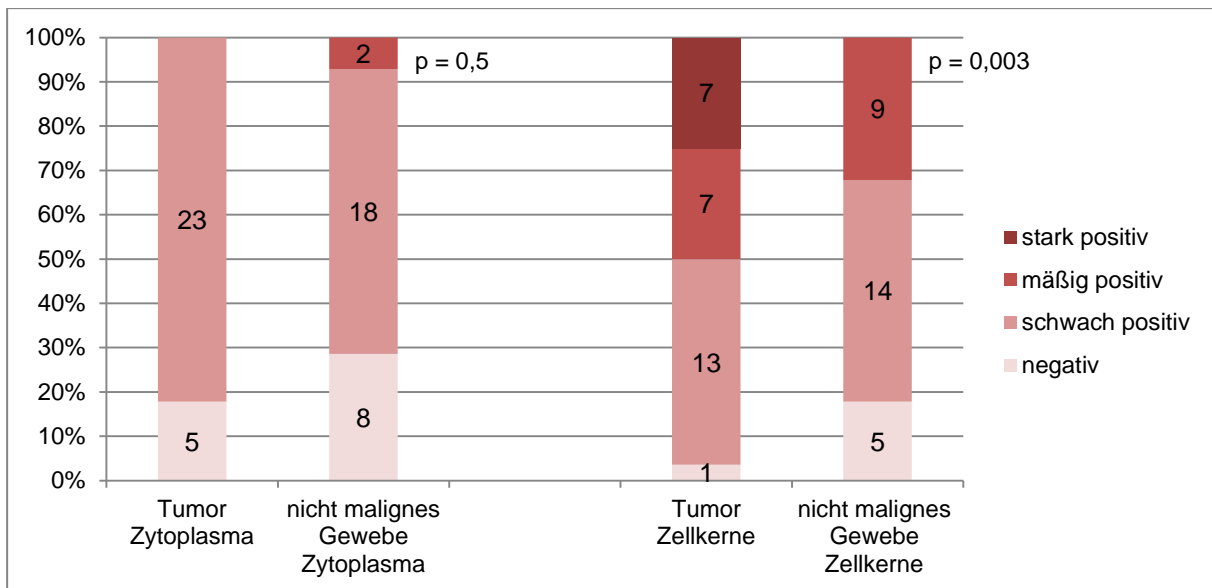


Abb. 17: Intensität der HMGA2-Expression in Tumor und nicht malignem Gewebe. Die Intensität der HMGA2-Expression in Tumor und nicht malignem peritumoralem Gewebe wurde jeweils getrennt für Zytoplasma (linke Seite) und Zellkerne (rechte Seite) verglichen. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl der Patienten (Gesamtanzahl = 28 Patienten). Die entsprechenden p-Werte (p) wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ermittelt.

4.5.5 HMGA2-Expression in Lymphknotenmetastasen

Von 17 Patienten wurden zusätzlich zum Tumorgewebe auch Lymphknotenmetastasen untersucht. In diesen wurde HMGA2 in 64,7 % der Fälle im Zytoplasma und in 94,1 % der Fälle in den Zellkernen exprimiert. Es zeigte sich zudem eine signifikant stärkere HMGA2-Expression in den Tumorzellkernen der Lymphknotenmetastasen als in den korrespondierenden Primärtumoren ($p = 0,049$). Für die zytoplasmatische HMGA2-Expression zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Lymphknotenmetastase und Primärtumor (siehe Abb. 18).

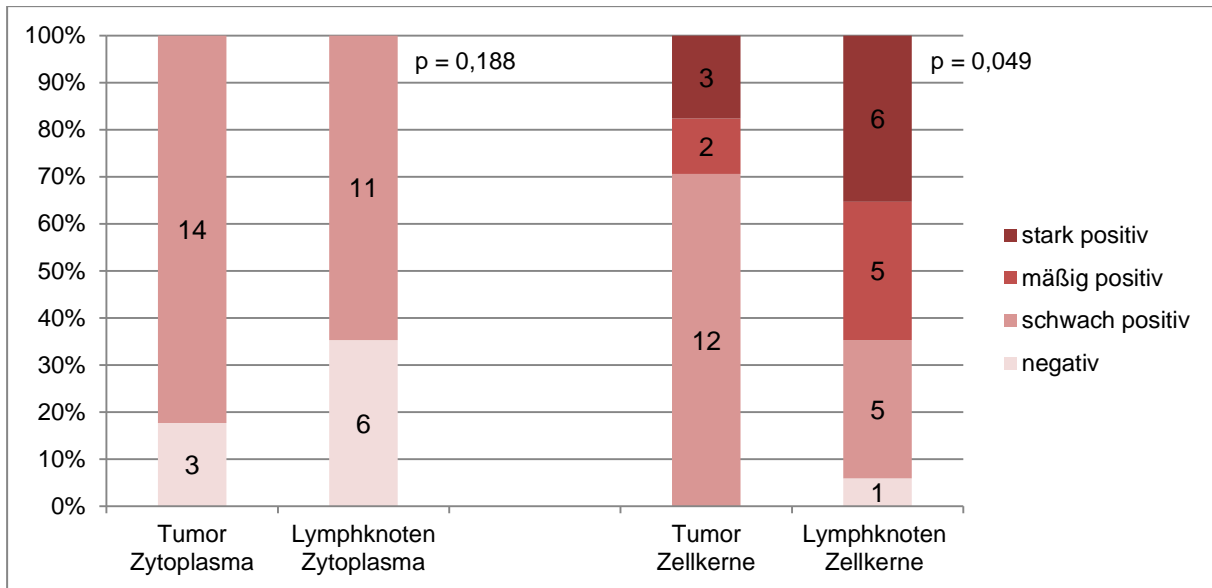


Abbildung 18: Intensität der HMGA2-Expression in Tumor und Lymphknotenmetastasen. Die Intensität der HMGA2-Expression in Tumor und Lymphknotenmetastasen wurde jeweils getrennt für Zytosoma (linke Seite) und Zellkerne (rechte Seite) verglichen. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl der Patienten (Gesamtanzahl = 17 Patienten). Die entsprechenden p-Werte (p) wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ermittelt.

4.6 Korrelation der untersuchten Marker untereinander

Es wurden Korrelationen der Expression der verschiedenen Marker untereinander untersucht. Hierfür wurden Färbeintensität, Anzahl positiver Zellen und Summenscore-Werte für Zytosoma und Zellkern von jeweils zwei verschiedenen Markern miteinander verglichen.

Zwischen HMGA2 und TRAIL-R1 korrelierte die Anzahl der Zellen mit positiver zytoplasmatischer Expression signifikant miteinander ($p < 0,001$). Summenscore und Intensität der zytoplasmatischen Expression korrelierten ebenfalls miteinander, erreichten mit $p = 0,053$ bzw. $p = 0,051$ aber keine signifikanten Werte. Die für die Kernfärbung erhobenen Parameter für HMGA2 und TRAIL-R1 korrelierten nicht signifikant miteinander. Zwischen HMGA2 und TRAIL-R2 korrelierte die zytoplasmatische Intensität ($p = 0,006$) und der Summenscore im Zytosoma ($p = 0,024$) miteinander. Für die Kernfärbung korrelierten alle erhobenen Parameter für HMGA2 und TRAIL-R2 signifikant miteinander ($p = 0,016$ für Intensität der Kernfärbung, $p = 0,017$ für die Anzahl positiver Zellkerne und $p = 0,003$ für die Summenscorewerte). Zwischen HMGA2 und TRAIL-R4 korrelierten die Anzahl der Zellen mit positivem Zytosoma ($p = 0,048$), die Summenscorewerte für die zytoplasmatische Färbung ($p = 0,011$) sowie die Anzahl der Zellen mit nukleärer

Antigen-Expression ($p = 0,043$) signifikant miteinander.

Der Vergleich der Expression der verschiedenen TRAIL-Rezeptoren untereinander führte zu folgenden Ergebnissen: Zwischen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 korrelierte die Anzahl von Zellen mit positivem Zytoplasma ($p = 0,021$) signifikant miteinander. Für die Kernfärbung korrelierten alle erhobenen Parameter, nämlich die Intensität der Kernfärbung ($p = 0,004$), die Anzahl positiver Zellkerne ($p = 0,024$) und die Summenscorewerte ($p = 0,018$) zwischen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 signifikant miteinander. Zwischen TRAIL-R1 und TRAIL-R4 korrelierte die Anzahl der Zellen mit positivem Zytoplasma signifikant miteinander ($p = 0,002$). Zwischen TRAIL-R2 und TRAIL-R4 lag eine signifikante Korrelation für die Anzahl von Zellen mit positivem Zytoplasma ($p < 0,001$) und dem Summscore im Zytoplasma ($p = 0,002$) vor. Die erhobenen Parameter für die Kernfärbung korrelierten nicht signifikant miteinander (siehe Tab. 16).

Tab. 16: Korrelation der erhobenen Färbeparameter von HMGA2, TRAIL-R1, TRAIL-R2 und TRAIL-R4 untereinander. Es wird jeweils der Korrelationskoeffizient Kendalls τ sowie die Signifikanz der Korrelation angegeben.

	Intensität Zytoplasma	Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma	Summenscore Zytoplasma	Intensität Zellkerne	Anzahl pos. Zellkerne	Summenscore Zellkerne
HMGA2 und TRAIL-R1	$\tau = 0,176$ $p = 0,051$	$\tau = 0,307$ $p < 0,001$	$\tau = 0,156$ $p = 0,053$	$\tau = 0,036$ $p = 0,685$	$\tau = 0,105$ $p = 0,230$	$\tau = 0,056$ $p = 0,502$
HMGA2 und TRAIL-R2	$\tau = 0,258$ $p = 0,006$	$\tau = 0,156$ $p = 0,087$	$\tau = 0,195$ $p = 0,024$	$\tau = 0,207$ $p = 0,016$	$\tau = 0,200$ $p = 0,017$	$\tau = 0,237$ $p = 0,003$
HMGA2 und TRAIL-R4	$\tau = 0,141$ $p = 0,122$	$\tau = 0,181$ $p = 0,048$	$\tau = 0,216$ $p = 0,011$	$\tau = -0,033$ $p = 0,695$	$\tau = 0,168$ $p = 0,043$	$\tau = 0,098$ $p = 0,206$
TRAIL-R1 und TRAIL-R2	$\tau = 0,069$ $p = 0,455$	$\tau = 0,209$ $p = 0,021$	$\tau = 0,158$ $p = 0,056$	$\tau = 0,258$ $p = 0,004$	$\tau = 0,190$ $p = 0,024$	$\tau = 0,195$ $p = 0,018$
TRAIL-R1 und TRAIL-R4	$\tau = 0,087$ $p = 0,319$	$\tau = 0,276$ $p = 0,002$	$\tau = 0,131$ $p = 0,105$	$\tau = 0,167$ $p = 0,057$	$\tau = -0,007$ $p = 0,936$	$\tau = 0,065$ $p = 0,425$
TRAIL-R4 und TRAIL-R2	$\tau = 0,136$ $p = 0,134$	$\tau = 0,425$ $p < 0,001$	$\tau = 0,268$ $p = 0,002$	$\tau = 0,147$ $p = 0,085$	$\tau = 0,031$ $p = 0,699$	$\tau = 0,056$ $p = 0,465$

p p-Wert, τ Korrelationskoeffizient Kendalls τ

5 Diskussion

Das Pankreaskarzinom hat mit einer 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von etwa 5 % eine überaus schlechte Prognose (7). Es ist durch frühzeitige Metastasierung und Resistenz gegenüber gängigen Therapieoptionen gekennzeichnet. Die Mechanismen, die dazu führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Das Verständnis dessen ist jedoch essentiell, um neue Therapieoptionen zu finden, die die Prognose von Pankreaskarzinompatienten verbessern könnten. In dieser Arbeit wurde mittels immunhistochemischer Untersuchungen die Expression der beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2, des Decoy-Rezeptors TRAIL-R4 und des nukleären Nicht-Histon Proteins HMGA2 bei 106 duktalem Pankreasadenokarzinomen sowie deren subzelluläre Lokalisation betrachtet. Ferner wurde untersucht, wie sich die Expression der TRAIL-Rezeptoren und des HMGA2-Proteins in den verschiedenen Zellkompartimenten auf prognostisch wichtige klinisch-pathologische Parameter auswirkt.

5.1 TRAIL-Rezeptoren

Der Ligand TRAIL ist durch Bindung an seine beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in der Lage selektiv in Tumorzellen Apoptose zu induzieren. Da dies optimale Voraussetzungen für ein Anti-Tumor-Medikament sind, werden agonistische Antikörper gegen TRAIL-R1 und gegen TRAIL-R2 derzeit in klinischen Studien getestet (9). Seit der Entdeckung von TRAIL-Rezeptoren Mitte der 1990er Jahre wurden jedoch auch TRAIL-vermittelte nicht-apoptotische Signalwege gefunden (41,42,73). Diese können zu Invasion und Metastasierung führen (44). Zudem konnte gezeigt werden, dass TRAIL-Rezeptor-Expression in einigen Tumoren mit höherem malignem Potenzial assoziiert war (18,45,46). Obwohl für all diese Signalwege membranständige TRAIL-Rezeptoren nötig sind, konnten TRAIL-Rezeptoren bereits im Zytoplasma (18,20,45,64) sowie im Zellkern (65–67) nachgewiesen werden. Ihre Funktion dort ist jedoch unklar. In dieser Arbeit konnten die drei untersuchten TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1, TRAIL-R2 und TRAIL-R4 in nahezu allen Tumoren im Zytoplasma und in einem Teil der Tumoren im Zellkern nachgewiesen werden.

TRAIL-R1 wurde bei 93,4 % der Pankreaskarzinome im Zytoplasma und bei 34 % der Tumoren im Zellkern nachgewiesen. Vorherige Studien konnten TRAIL-R1 immunhistochemisch ebenfalls in Pankreaskarzinomen nachweisen (74–76). Der

Anteil positiver Fälle an den untersuchten Tumoren wurde lediglich in zwei Arbeiten angegeben und lag bei 50 % (75) bzw. bei 77 % (76). Angaben über die intrazelluläre Lokalisation der TRAIL-Rezeptoren wurden nur in einer Studie gemacht. Dort konnte TRAIL-R1 im Zytoplasma sowie an der Zellmembran nachgewiesen werden (76).

Für die Detektion der TRAIL-R2-Expression wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus (TR2.21) verwendet. In Vorversuchen wurde dieser mit einem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen verglichen. Beide Antikörper lieferten vergleichbare Ergebnisse (siehe 8.3). Der monoklonale Antikörper aus der Maus erwies sich jedoch als geeigneter zur Detektion von TRAIL-Rezeptoren im Zellkern. Außerdem liegen bereits mehrere Studien an anderen Tumorentitäten unter Verwendung dieses Antikörpers vor (20,77), weshalb dieser Antikörper schließlich für die Färbung des gesamten Kollektivs verwendet wurde. TRAIL-R2 wurde in der vorliegenden Arbeit in allen 106 duktalem Pankreasadenokarzinomen im Zytoplasma nachgewiesen. Eine TRAIL-R2-Expression im Zellkern zeigte sich bei 64,2 % der untersuchten Karzinome. Wie TRAIL-R1 wurde auch TRAIL-R2 in vorherigen Studien bereits in Pankreaskarzinomen nachgewiesen (74–76). Angaben über die subzelluläre Lokalisation wurden wie auch bei TRAIL-R1 nur in der Studie von Gallmeier et al. gemacht. Hier wurde TRAIL-R2 überwiegend an der Zellmembran und in 31 % der Fälle im Zytoplasma nachgewiesen (76). Ungeachtet der subzellulären Lokalisation zeigten diese Studien eine TRAIL-R2-Expression in 75 % (75) bzw. 99 % (76) der jeweils untersuchten Pankreaskarzinome.

Neben den beiden Todesrezeptoren wurde in dieser Arbeit auch die TRAIL-R4-Expression untersucht. Alle untersuchten Pankreaskarzinome zeigten hierbei eine Immunreaktivität im Zytoplasma und in 83 % der Tumoren waren zusätzlich die Zellkerne positiv. Auch eine TRAIL-R4-Expression wurde im Pankreaskarzinom bereits beschrieben (74–76). In der bereits zitierten Arbeit von Stadel et al. konnte in 22 von 24 Pankreaskarzinomen TRAIL-R4 detektiert werden (75), in der Arbeit von Gallmeier et al. wurde TRAIL-R4 in 69 % der Tumoren im Zytoplasma nachgewiesen (76).

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin untersucht, inwiefern die Expression der verschiedenen TRAIL-Rezeptoren miteinander korreliert. Für die zytoplasmatische Expression korrelierte jeweils die Anzahl TRAIL-R1-, TRAIL-R2- und TRAIL-R4 positiver Zellen miteinander. Interessanterweise zeigte sich für die nukleäre

Expression nur eine signifikante Korrelation zwischen TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Eine vorherige Studie konnte am duktalem Pankreasadenokarzinom keine signifikanten Korrelationen der TRAIL-Rezeptor-Expression untereinander feststellen (74). Allerdings umfasst diese Studie nur 34 Karzinompatienten und auch die intrazelluläre Verteilung der Rezeptorexpression wurde nicht beachtet. Andere Untersuchungen konnten signifikante Korrelationen am Mammakarzinom zwischen der TRAIL-R2- und TRAIL-R4-Expression (20) sowie zwischen der Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 bzw. TRAIL-R4 (78) feststellen. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Bildung von heteromeren Rezeptor-Komplexen. So konnte gezeigt werden, dass TRAIL die Bildung von Komplexen aus TRAIL-R1 und TRAIL-R2 induziert (79). Für TRAIL-R2 und TRAIL-R4 ist sogar bekannt, dass diese unabhängig vom Liganden in der Lage sind heteromere Komplexe zu bilden (80).

5.1.1 Die Bedeutung zytoplasmatischer TRAIL-Rezeptoren

Die Detektion von zytoplasmatischen TRAIL-Rezeptoren beim Pankreaskarzinom deckt sich mit zahlreichen immunhistochemischen Untersuchungen an anderen Tumorentitäten (18,20,45,65). Da die bekannten Funktionen von TRAIL über membranständige TRAIL-Rezeptoren vermittelt werden, stellt sich die Frage, welche Bedeutung intrazellulär lokalisierte TRAIL-Rezeptoren haben. Zhang et al. konnten TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im Trans-Golgi-Netzwerk von Melanomzellen nachweisen. Nach Exposition gegenüber TRAIL zeigten diese Zellen zudem weniger zellmembranständige TRAIL-Rezeptoren und dafür eine diffuse zytoplasmatische TRAIL-Rezeptor-Expression (81). Passend zu diesen Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit TRAIL zu vermehrter Endozytose von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in verschiedenen Krebszelllinien führte (82,83). Somit könnte die zytoplasmatische Expression von TRAIL-Rezeptoren durch Endozytose infolge von Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand bedingt sein. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass es sich um neu synthetisierte Moleküle im Golgi-Apparat handelt, die noch nicht in die Plasmamembran eingebaut wurden (67). Zusammenfassend ist die genaue Bedeutung zytoplasmatischer TRAIL-Rezeptoren derzeit unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die prognostische Signifikanz der zytoplasmatischen TRAIL-Rezeptor-Expression betrachtet. Für TRAIL-R1 zeigte sich, dass Patienten, deren Tumoren in mehr als 80 % der Zellen TRAIL-R1

exprimierten, signifikant länger lebten als Patienten mit weniger TRAIL-R1-positiven Zellen ($p = 0,004$). Somit scheint die zytoplasmatische TRAIL-R1-Expression im Pankreaskarzinom mit einer besseren Prognose für die Patienten einherzugehen. In Übereinstimmung damit stehen Ergebnisse bezüglich des rezidivfreien Überlebens beim Blasenkrebs (64). Bei Patienten mit fortgeschrittenen Kolonkarzinomen hingegen ist hohe TRAIL-R1-Expression mit signifikant kürzerem Überleben assoziiert (45).

Bei der zytoplasmatischen TRAIL-R2-Expression verhält es sich ähnlich. Hier zeigte sich ein signifikant längeres postoperatives Überleben für Patienten mit mäßig oder stark TRAIL-R2-positiven Tumoren. Starke zytoplasmatische TRAIL-R2-Expression wäre somit ebenfalls ein positiver prognostischer Parameter. Betrachtet man hingegen die Lymphgefäßinvasion, die die Voraussetzung für lymphogene Metastasierung darstellt, zeigt sich eine positive Korrelation mit der Intensität der TRAIL-R2-Expression im Zytoplasma ($p = 0,001$). Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen selbst korrelierte ebenfalls mit der TRAIL-R2-Expression, wenn auch nicht signifikant ($p = 0,057$). Somit zeigt sich kein eindeutiges Bild bezüglich der Bedeutung der zytoplasmatischen TRAIL-R2-Expression in Pankreaskarzinomen. Untersuchungen an anderen Tumorentitäten kommen ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen: In Harnblasenkarzinomen geht zytoplasmatische TRAIL-R2-Expression mit längerem rezidivfreien Überleben einher (64), in Mammakarzinomen korreliert TRAIL-R2 mit undifferenzierteren Tumoren und Lymphknotenmetastasierung (20). Auch die Untersuchungen an kleinzelligen Bronchialkarzinomen sind widersprüchlich hinsichtlich des Einflusses von hoher zytoplasmatischer TRAIL-R2-Expression auf das Patientenüberleben (18,65).

Insgesamt sind die Ergebnisse der Studien, welche die prognostische Signifikanz von TRAIL-Rezeptoren an malignen Tumoren untersucht haben, sehr heterogen. Eine mögliche Erklärung dafür können die unterschiedlichen durch TRAIL-Rezeptoren vermittelten Signalwege sein. Je nachdem, ob pro-apoptotische oder pro-inflammatorische, Invasion fördernde Signalwege im Vordergrund stehen, ändert sich die Wirkung von TRAIL-Rezeptoren auf Tumorwachstum und Metastasierung. Interessanterweise konnte für Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden, dass diese weitgehend resistent gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sind und hier nicht-apoptotische Signalwege wie NF- κ B und Proteinkinase C eine besondere Rolle spielen (41,73). Dennoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl hohe

TRAIL-R1- als auch starke TRAIL-R2-Expression mit signifikant längerem postoperativem Gesamtüberleben assoziiert sind. Diese Ergebnisse machen weitere Untersuchung zur genauen Funktion zytoplasmatischer TRAIL-Rezeptoren am Pankreaskarzinom in vivo notwendig.

Die zytoplasmatische TRAIL-R4-Expression korrelierte in dieser Arbeit nicht signifikant mit den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern sowie dem postoperativen Gesamtüberleben. Untersuchungen zur prognostischen Signifikanz speziell zytoplasmatischer TRAIL-R4-Rezeptoren an anderen Tumorentitäten sind derzeit nicht verfügbar.

5.1.2 Die Bedeutung nukleärer TRAIL-Rezeptoren

In der vorliegenden Arbeit konnten TRAIL-Rezeptoren auch im Zellkern von Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden. Nukleäre TRAIL-Rezeptoren wurden bereits in Melanomzellen (81), Brustkrebszellen (67) und mittels Immunhistochemie in Bronchialkarzinomen (65) gefunden. Zudem fand sich TRAIL-R2 im Zellkern zweier humaner Krebszelllinien, wobei diese im Gegensatz zu Zellen ohne TRAIL-R2 im Zellkern resistent gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose waren (66). Dieses Ergebnis lässt auf einen Überlebensvorteil für Krebszellen durch nukleäre Expression von TRAIL-R2 schließen.

In dieser Arbeit konnte weder für TRAIL-R1 noch für TRAIL-R2 eine signifikante Korrelation zwischen TRAIL-Rezeptor-Expression und den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern sowie dem postoperativen Gesamtüberleben festgestellt werden. Untersuchungen an kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnten für TRAIL-R1 ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Expression im Zellkern und Differenzierungsgrad bzw. Gesamtüberleben finden. Für TRAIL-R2 hingegen zeigte diese Studie einen signifikanten Überlebensvorteil für Patienten mit hoher TRAIL-R2-Expression im Zellkern (65).

Für TRAIL-R4 hingegen zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit niedrigen nukleären Summenscorewerten. Untersuchungen an Brustkrebspatientinnen ergaben ebenfalls ein längeres Gesamtüberleben bei Patientinnen mit geringerer TRAIL-R4 Expression (20), allerdings wurde hier die gesamte TRAIL-R4-Expression in Zytoplasma und Zellkern zusammen betrachtet. TRAIL-R4 zählt zu den sogenannten Decoy-Rezeptoren. Überexpression von TRAIL-R4 schützt Tumorzellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose (23). Allerdings gilt dies für

membranständige TRAIL-Rezeptoren. Welche Funktion TRAIL-R4 im Zellkern hat, ist derzeit unklar. Interessanterweise konnten Zhang et al zeigen, dass sich die subzelluläre Verteilung von TRAIL-R4 nach Stimulation mit TRAIL änderte. Befand sich TRAIL-R4 zunächst vornehmlich im Zellkern, konnte nach Stimulation mit TRAIL der Rezeptor auch im Zytoplasma und an der Zellmembran nachgewiesen werden (81).

5.1.3 TRAIL-Rezeptoren in nicht malignen Pankreasgängen

TRAIL-Rezeptoren werden nicht nur in Tumoren, sondern auch in zahlreichen nicht maligne veränderten Geweben exprimiert (84). In der vorliegenden Arbeit konnten TRAIL-Rezeptoren ebenfalls im peritumoralen nicht maligne veränderten Pankreasgewebe nachgewiesen werden. Die zytoplasmatische Expression von TRAIL-R2 und TRAIL-R4 war jedoch in den Pankreastumoren signifikant stärker als im peritumoralen Gewebe. Interessanterweise galt dies nicht für TRAIL-R1. Betrachtet man die nukleäre Expression der TRAIL-Rezeptoren, ist diese für TRAIL-R1 und TRAIL-R4 im Tumorgewebe signifikant stärker als im nicht malignen Gewebe. Für TRAIL-R2 ist ein derartiger Zusammenhang auch erkennbar, jedoch ist der Unterschied statistisch nicht signifikant ($p = 0,064$), was durch die geringe Fallzahl von nur 28 Patienten begründet sein kann. TRAIL-Rezeptoren werden also sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellkernen von Pankreastumoren größtenteils überexprimiert. Eine verstärkte Expression der Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 konnte bereits für kolorektale Karzinome im Vergleich mit normaler Kolonmukosa gezeigt werden (19).

5.1.4 TRAIL-Rezeptoren in Lymphknotenmetastasen

In der vorliegenden Arbeit konnten TRAIL-R1, TRAIL-R2 und TRAIL-R4 im Großteil der 17 untersuchten Lymphknotenmetastasen im Zytoplasma und vereinzelt auch im Zellkern nachgewiesen werden. Interessanterweise war die zytoplasmatische Expression der verschiedenen TRAIL-Rezeptoren in den dazugehörigen Primärtumoren durchgehend signifikant stärker. Dies ist bemerkenswert, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Intensität der zytoplasmatischen TRAIL-R2-Expression signifikant mit der Lymphgefäßinvasion korreliert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TRAIL-R2 zwar im Prozess der lymphatischen Metastasierung eine Rolle spielt, die Expression des Rezeptors aber später wieder herunterreguliert wird.

Untersuchungen zur TRAIL-Rezeptor-Expression in Lymphknotenmetastasen gibt es bisher nur sehr wenige. Für Lymphknotenmetastasen von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen konnte gezeigt werden, dass diese in 96 % der Fälle TRAIL-R2 im Zytoplasma exprimierten (85). Eine Studie mit nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der zytoplasmatischen TRAIL-R2-Expression in Lymphknotenmetastasen und den dazugehörigen Primärtumoren (86).

Ebenso wie für die zytoplasmatische Expression zeigte sich auch für die Zellkerne eine signifikant stärkere Expression im Primärtumor im Vergleich zur Lymphknotenmetastase, die jedoch nur für TRAIL-R2 und für TRAIL-R4 statistisch signifikant war.

5.2 HMGA2

Normalerweise wird HMGA2 während der Embryonalentwicklung exprimiert und ist in adulten, differenzierten Geweben nicht nachweisbar (54). Während der malignen Transformation von Zellen scheint HMGA2 jedoch wieder hochreguliert zu werden. So konnte HMGA2 bereits in zahlreichen Tumorentitäten nachgewiesen werden (59,60,87,88). In dieser Arbeit konnte HMGA2 in 98,1 % der untersuchten Pankreaskarzinome im Zellkern nachgewiesen werden. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ergaben Werte zwischen 44,4 % (53) und 100 % (89). Eine solche Spanne ist durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper gegen HMGA2 zu erklären. In der vorliegenden Arbeit wurde neben der nukleären auch die zytoplasmatische HMGA2-Expression semiquantitativ ausgewertet. Hierbei wurde einem Großteil der Pankreaskarzinome zytoplasmatische HMGA2-Immunreaktivität beobachtet, die überwiegend schwach und in vier Fällen mäßig stark ausgeprägt war. Diese wurde in anderen Studien bereits beschrieben, aber als Artefakt bewertet und nicht in die Auswertung einbezogen (90). In dieser Arbeit wurde aufgrund der eindeutigen zytoplasmatische Färbung (siehe Abb. 20) diese als eigenständiges Phänomen betrachtet und somit auch separat deren prognostische Signifikanz untersucht.

Bei Untersuchung der prognostischen Signifikanz der HMGA2-Expression in Pankreastumoren zeigte sich ein signifikanter positiv gerichteter Zusammenhang zwischen der Intensität der nukleären HMGA2-Expression und dem Tumorgrading. Schlechter differenzierte Tumoren exprimieren also vermehrt HMGA2. Dieses

Ergebnis ist in Einklang mit den Studien von Hristov et al. und Piscuoglio et al., in denen gezeigt werden konnte, dass die HMGA2-Expression in Pankreaskarzinomen mit Tumorgrading und Lymphknotenmetastasierung korreliert (53,60). Einen signifikanten Einfluss der HMGA2-Expression auf das Patientenüberleben konnten beide Studien hingegen nicht nachweisen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der HMGA2-Expression und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen. Es konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass starke nukleäre HMGA2-Expression zu signifikant kürzeren Überlebenszeiten von Pankreaskarzinompatienten führt. Diese Ergebnisse lassen sich durch die onkogene Wirkung von HMGA2 durch seine Rolle in Zellzyklusregulation, Proliferation und EMT erklären (61,91).

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Korrelation der zytoplasmatischen HMGA2-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Intensität der zytoplasmatischen HMGA2-Expression und dem Vorliegen einer Lymphgefäßinvasion sowie zwischen der Anzahl von Zellen mit HMGA2-positivem Zytoplasma und der Blutgefäßinvasion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zytoplasmatisches HMGA2 die Invasion von Tumorzellen fördern könnte. Über eine mögliche Funktion von HMGA2 in anderen Zellkompartimenten außerhalb des Zellkerns ist allerdings bisher nichts bekannt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein anderes Mitglied der High-mobility-group-Familie, HMGA1, in Mitochondrien von Tumorzellen lokalisiert ist und dort die p53-vermittelte Apoptose hemmt, indem es die Bindung von p53 an den anti-apoptotischen Faktor Bcl-2 verhindert (92). Für HMGA2 konnte in dieser Studie von Esposito et al. jedoch keine Lokalisation außerhalb des Zellkerns nachgewiesen werden. Dennoch ist vor diesem Hintergrund denkbar, dass auch HMGA2 mögliche Funktionen außerhalb des Zellkerns hat, die in Einklang mit der Korrelation zwischen zytoplasmatischem HMGA2 und vermehrter Invasion der Tumorzellen steht. Hier sind weitere Untersuchungen an einem breiteren Spektrum von Tumorzellen notwendig.

Der Vergleich zwischen Tumor und nicht malignem Pankreasgewebe ergab eine signifikant stärkere Expression von HMGA2 in Tumorzellkernen als in Zellkernen nicht maligne veränderter Pankreasgangzellen. Dieses Ergebnis bestätigt die vermutete Überexpression von HMGA2 in Pankreaskarzinomen. Obwohl HMGA2 in

adulten, differenzierten Geweben normalerweise nicht exprimiert wird, konnte es in einem Teil der nicht malignen Pankreasgänge nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das nicht maligne Pankreasgewebe in dieser Arbeit ausschließlich von den untersuchten Pankreaskarzinompatienten stammte. Es handelt sich um peritumorales Gewebe, welches noch keine histologischen Zeichen der Entdifferenzierung und malignen Entartung zeigte. In vorherigen Arbeiten wurde HMGA2 ebenfalls in geringem Umfang auch in nicht malignen Pankreasgängen nachgewiesen (60,89).

Neben Primärtumoren und peritumoralem nicht malignem Gewebe wurden in dieser Arbeit auch einige Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch untersucht. Die Intensität der Kernfärbung war in den Lymphknotenmetastasen signifikant stärker als in den dazugehörigen Primärtumoren. Dies könnte Ausdruck der Epithelial-mesenchymalen Transition sein, die es Krebszellen ermöglicht zu metastasieren (93) und in der HMGA2 eine Rolle spielt (61). Die Zahl der Patienten, von denen Lymphknotenmetastasen untersucht werden konnten, war mit 17 Patienten sehr gering. Studien mit größeren Fallzahlen wären interessant, um diesen Zusammenhang weiter zu untersuchen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass HMGA2 in Pankreaskarzinomen überexprimiert wird und mit schlechterem Differenzierungsgrad assoziiert ist. Starke HMGA2-Expression korreliert mit signifikant kürzeren Überlebenszeiten der Patienten. Diese Ergebnisse sprechen für die Bedeutung von HMGA2 als diagnostischer und prognostischer Marker im duktalem Pankreasadenokarzinom.

5.3 Zusammenhang zwischen TRAIL-Rezeptoren und HMGA2

Untersuchungen der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Trauzold (Institut für Experimentelle Tumorforschung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) konnten einen Zusammenhang zwischen den beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 und dem nukleären Protein HMGA2 aufdecken. Es konnte gezeigt werden, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im Zellkern von Pankreaskarzinomzellen lokalisiert sind und dort die Reifung der microRNA let-7 hemmen, was zu verstärkter Expression von HMGA2 führt (68). Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem, die Koexpression von TRAIL-Rezeptoren und HMGA2 in Pankreastumoren zu untersuchen. Dafür wurden die Schnitte bei der Herstellung nummeriert und in einer definierten

Reihenfolge immunhistochemisch untersucht (siehe 3.2). Auf diese Weise sollte eine direkte Kolo­kalisierung von TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2 und HMGA2 möglich sein. Bei der mikroskopischen Auswertung gelang dies jedoch nicht, da in den meisten Fällen keine direkten Stufenschnitte angefertigt wurden und der Abstand zwischen zwei Schnitten zu groß war, um die Expression beider Antigene innerhalb Zelle direkt zu vergleichen, da die Gewebebeschaffenheit teilweise keine Anfertigung von direkten Serienschnitten zuließ. Um dennoch Informationen über einen Zusammenhang zwischen der Expression von HMGA2 und den verschiedenen TRAIL-Rezeptoren zu erhalten, wurde statistisch ausgewertet, ob signifikante Korrelationen vorliegen. Zwischen HMGA2 und TRAIL-R1 zeigte sich eine signifikante Korrelation nur für die Anzahl der Zellen mit positivem Zytoplasma, die nukleäre Expression korrelierte nicht miteinander. Zwischen HMGA2 und TRAIL-R2 hingegen korrelierten Intensität und Summenscore der zytoplasmatischen Expression sowie alle für die nukleäre Expression erhobenen Parameter signifikant miteinander. Zwar lassen sich mit Korrelationskoeffizienten keine Angaben über Kolo­kalisierungen oder gar ursächliche Zusammenhänge machen, aber dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass in Tumoren mit starker TRAIL-R2-Expression im Zellkern auch die nukleäre HMGA2-Expression stärker ist als in Tumoren mit schwacher TRAIL-R2-Expression im Zellkern. Somit stehen diese Ergebnisse in Einklang mit den bisherigen Forschungsergebnissen über den Zusammenhang zwischen HMGA2 und TRAIL-R2. Eine Korrelation zwischen der nukleären Expression von HMGA2 und TRAIL-R1 hingegen konnte nicht gefunden werden.

6 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist weitgehend resistent gegenüber gängigen Therapien. Als mögliche Therapieoption werden derzeit der rekombinante Ligand TRAIL sowie agonistische Antikörper gegen TRAIL-Rezeptoren in klinischen Studien getestet (9). Obwohl die meisten bekannten Funktionen von TRAIL-Rezeptoren wie z.B. die Induktion von Apoptose über membranständige Rezeptoren vermittelt werden, konnten die verschiedenen TRAIL-Rezeptoren im Zytoplasma und auch im Zellkern nachgewiesen werden (64–67). In der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Trauzold (Institut für Experimentelle Tumorforschung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) konnte gezeigt werden, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im Zellkern von zahlreichen Krebszelllinien zu verstärkter Expression des nukleären nicht-Histon-Proteins HMGA2 führen. HMGA2 spielt wiederum eine Rolle in der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen (53,61).

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels immunhistochemischer Untersuchungen die Expression sowie erstmals auch die subzelluläre Lokalisation der beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2, des Decoy-Rezeptors TRAIL-R4 und des nukleären HMGA2-Proteins in 106 duktalem Pankreasadenokarzinomen analysiert. Es wurde untersucht, ob die Expression der TRAIL-Rezeptoren und des HMGA2-Proteins in den verschiedenen Zellkompartimenten untereinander sowie mit prognostisch wichtigen klinisch-pathologischen Parametern korreliert.

Die drei untersuchten TRAIL-Rezeptoren konnten in nahezu allen duktalem Pankreasadenokarzinomen im Zytoplasma sowie erstmals bei einem Teil dieser Tumorentität auch im Zellkern nachgewiesen werden. Hohe TRAIL-R1-Expression im Zytoplasma der Tumorzellen war ebenso wie eine starke zytoplasmatische TRAIL-R2-Expression jeweils mit signifikant längerem postoperativem Gesamtüberleben assoziiert. Hingegen korrelierte auch die Lymphgefäßinvasion positiv mit der Intensität der zytoplasmatischen TRAIL-R2-Expression. Somit ist die Bedeutung von TRAIL-R2 im Zytoplasma von Pankreaskarzinomzellen nicht eindeutig. Die Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im Zellkern korrelierte in dieser Kohorte nicht signifikant mit den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern. Jedoch zeigte sich für Patienten mit geringer TRAIL-R4-Expression in den Zellkernen der Tumorzellen ein signifikanter Überlebensvorteil. TRAIL-R4 im Zellkern scheint somit eine onkogene Wirkung zu haben. Der Vergleich zwischen Tumorgewebe und

peritumoralem nicht malignem Gewebe zeigte für TRAIL-R2 und TRAIL-R4 im Zytoplasma sowie für TRAIL-R1 und TRAIL-R4 in den Zellkernen eine signifikant stärkere Expression im Tumorgewebe gegenüber dem nicht malignen Pankreasgewebe. Die Untersuchung von Lymphknotenmetastasen ergab, dass TRAIL-Rezeptoren auch dort im Zytoplasma und im Zellkern exprimiert werden, jedoch weniger stark als in den korrespondierenden Primärtumoren.

HMGA2 konnte in der vorliegenden Arbeit in fast allen Karzinomen im Zellkern nachgewiesen werden. Erstmals konnte gezeigt werden, dass eine starke nukleäre HMGA2-Expression in duktalem Pankreasadenokarzinomen mit signifikant kürzerem Überleben der Patienten korreliert. Die Intensität der nukleären HMGA2-Expression war mit schlechterem Differenzierungsgrad der Karzinome assoziiert. Im Vergleich mit nicht-malignem Pankreasgewebe zeigte sich eine deutliche Überexpression von HMGA2 in den Zellkernen von Pankreaskarzinomzellen. In den untersuchten Lymphknotenmetastasen war die nukleäre HMGA2-Expression signifikant stärker als in den korrespondierenden Primärtumoren, was zur bekannten Rolle von HMGA2 in der Metastasierung passt. Alle diese Ergebnisse sprechen für eine Rolle von HMGA2 als einen neuen diagnostischen und prognostischen Marker in duktalem Pankreasadenokarzinomen.

Die Expression von HMGA2 und TRAIL-R2 korrelierte sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellkernen signifikant miteinander. Für TRAIL-R1 und HMGA2 konnte ein derartiger Zusammenhang nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den bisherigen Forschungsergebnissen über den Zusammenhang zwischen TRAIL-R2 und HMGA2 und somit wird die „onkogene“ Funktion von TRAIL-R2 spezifiziert (68).

7 Literaturverzeichnis

1. Han H, Von Hoff DD. SnapShot: pancreatic cancer. *Cancer cell*. 2013 Mar 18;23(3):424–424.e1.
2. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Berlin: Robert Koch Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg); 2012.
3. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013 Jun;144(6):1252–61.
4. Sharma C, Eltawil KM, Renfrew PD, Walsh MJ, Molinari M. Advances in diagnosis, treatment and palliation of pancreatic carcinoma: 1990-2010. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011 Feb 21;17(7):867–97.
5. Guo X-Z, Cui Z-M, Liu X. Current developments, problems and solutions in the non-surgical treatment of pancreatic cancer. *World journal of gastrointestinal oncology*. 2013 Mar 15;5(2):20–8.
6. Ying J-E, Zhu L-M, Liu B-X. Developments in metastatic pancreatic cancer: is gemcitabine still the standard? *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012 Feb 28;18(8):736–45.
7. Yeo TP, Lowenfels AB. Demographics and epidemiology of pancreatic cancer. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*. 2012;18(6):477–84.
8. Röder C, Trauzold A, Kalthoff H. Impact of death receptor signaling on the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *European journal of cell biology*. 2010;90(6-7):450–5.
9. Dimberg LY, Anderson CK, Camidge R, Behbakht K, Thorburn A, Ford HL. On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene*. 2012 May 14;
10. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995 Dec;3(6):673–82.
11. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *The Journal of biological chemistry*. 1996 May 31;271(22):12687–90.

12. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Jul;104(2):155–62.
13. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature medicine*. 1999 Feb;5(2):157–63.
14. Lamhamedi-Cherradi S-E, Zheng S-J, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. *Nature immunology*. 2003 Mar;4(3):255–60.
15. Lub-de Hooge MN, De Vries EGE, De Jong S, Bijl M. Soluble TRAIL concentrations are raised in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005 Jun;64(6):854–8.
16. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science (New York, N.Y.)*. 1997 Apr 4;276(5309):111–3.
17. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science (New York, N.Y.)*. 1997 Aug 8;277(5327):815–8.
18. Spierings DCJ, De Vries EGE, Timens W, Groen HJM, Boezen HM, De Jong S. Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003 Aug 15;9(9):3397–405.
19. Bavi P, Prabhakaran SE, Abubaker J, Qadri Z, George T, Al-Sanea N, et al. Prognostic significance of TRAIL death receptors in Middle Eastern colorectal carcinomas and their correlation to oncogenic KRAS alterations. *Molecular cancer*. 2010 Jan;9:203.
20. Ganten TM, Sykora J, Koschny R, Batke E, Aulmann S, Mansmann U, et al. Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2009 Oct;87(10):995–1007.
21. Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, et al. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *The Journal of experimental medicine*. 1997 Oct 6;186(7):1165–70.
22. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*. 1997 Dec;7(6):813–20.

23. Morizot A, Mérino D, Lalaoui N, Jacquemin G, Granci V, Iessi E, et al. Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell death and differentiation*. 2011 Apr;18(4):700–11.
24. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309–19.
25. Baud'huin M, Duplomb L, Teletchea S, Lamoureux F, Ruiz-Velasco C, Maillason M, et al. Osteoprotegerin: Multiple partners for multiple functions. *Cytokine & growth factor reviews*. 2013 Jul 1;
26. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972 Aug;26(4):239–57.
27. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):43–50.
28. Dickens LS, Powley IR, Hughes MA, MacFarlane M. The “complexities” of life and death: death receptor signalling platforms. *Experimental cell research*. 2012 Jul 1;318(11):1269–77.
29. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal*. 1995 Nov 15;14(22):5579–88.
30. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998 Aug 21;94(4):491–501.
31. Pradelli LA, Bénétteau M, Ricci J-E. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2010 May;67(10):1589–97.
32. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2008 Jan;9(1):47–59.
33. Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E, et al. Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene*. 2000 Nov 16;19(48):5477–86.
34. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal*. 1998 Mar 16;17(6):1675–87.

35. Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, et al. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity*. 1997 Dec;7(6):831–6.
36. Varfolomeev E, Maecker H, Sharp D, Lawrence D, Renz M, Vucic D, et al. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Dec 9;280(49):40599–608.
37. Jin Z, El-Deiry WS. Distinct signaling pathways in TRAIL- versus tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 2006 Nov;26(21):8136–48.
38. Prasad S, Ravindran J, Aggarwal BB. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Molecular and cellular biochemistry*. 2010 Mar;336(1-2):25–37.
39. Gonzalvez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene*. 2010 Aug 26;29(34):4752–65.
40. Morel J, Audo R, Hahne M, Combe B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Apr 22;280(16):15709–18.
41. Trauzold A, Wermann H, Arlt A, Schütze S, Schäfer H, Oestern S, et al. CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 2001 Jul 12;20(31):4258–69.
42. Zauli G, Sancilio S, Cataldi A, Sabatini N, Bosco D, Di Pietro R. PI-3K/Akt and NF-kappaB/IkappaBalpha pathways are activated in Jurkat T cells in response to TRAIL treatment. *Journal of cellular physiology*. 2005 Mar;202(3):900–11.
43. Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, Hiscott J, Debatin K-M, Jeremias I. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. *Oncogene*. 2003 Jun 19;22(25):3842–52.
44. Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, Sipos B, Egberts J, Zorenkov D, et al. TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2006 Nov 30;25(56):7434–9.
45. Van Geelen CM, Westra JL, De Vries EG, Boersma-van Ek W, Zwart N, Hollema H, et al. Prognostic significance of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in adjuvantly treated stage III colon cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006 Nov 1;24(31):4998–5004.

46. McCarthy MM, Sznol M, DiVito KA, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM. Evaluating the expression and prognostic value of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005 Jul 15;11(14):5188–94.
47. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science (New York, N.Y.)*. 2007 Mar 16;315(5818):1576–9.
48. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes & development*. 2007 May 1;21(9):1025–30.
49. Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1973 Oct 21;38(1):14–9.
50. Thanos D, Maniatis T. The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. *Cell*. 1992 Dec 27;71(5):777–89.
51. Bewley CA, Gronenborn AM, Clore GM. Minor groove-binding architectural proteins: structure, function, and DNA recognition. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 1998 Jan;27:105–31.
52. Solomon MJ, Strauss F, Varshavsky A. A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A.T base pairs in duplex DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986 Mar;83(5):1276–80.
53. Hristov AC, Cope L, Reyes MD, Singh M, Iacobuzio-Donahue C, Maitra A, et al. HMGA2 protein expression correlates with lymph node metastasis and increased tumor grade in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2009 Jan;22(1):43–9.
54. Rogalla P, Drechsler K, Frey G, Hennig Y, Helmke B, Bonk U, et al. HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *The American journal of pathology*. 1996 Oct;149(3):775–9.
55. Dreux N, Marty M, Chibon F, Vélasco V, Hostein I, Ranchère-Vince D, et al. Value and limitation of immunohistochemical expression of HMGA2 in mesenchymal tumors: about a series of 1052 cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2010 Dec;23(12):1657–66.
56. Tallini G, Vanni R, Manfioletti G, Kazmierczak B, Faa G, Pauwels P, et al. HMGI-C and HMGI(Y) immunoreactivity correlates with cytogenetic abnormalities in lipomas, pulmonary chondroid hamartomas, endometrial polyps, and uterine leiomyomas and is compatible with rearrangement of the

- HMGI-C and HMGI(Y) genes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000 Mar;80(3):359–69.
57. Califano D, Pignata S, Losito NS, Ottaiano A, Greggi S, De Simone V, et al. High HMGA2 expression and high body mass index negatively affect the prognosis of patients with ovarian cancer. *Journal of cellular physiology*. 2013 Jun 14;
 58. Rizzi C, Cataldi P, Iop A, Isola M, Sgarra R, Manfioletti G, et al. The expression of the high-mobility group A2 protein in colorectal cancer and surrounding fibroblasts is linked to tumor invasiveness. *Human pathology*. 2013 Jan;44(1):122–32.
 59. Rogalla P, Drechsler K, Kazmierczak B, Rippe V, Bonk U, Bullerdiek J. Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: relationship to histologic grade. *Molecular carcinogenesis*. 1997 Jul;19(3):153–6.
 60. Piscuoglio S, Zlobec I, Pallante P, Sepe R, Esposito F, Zimmermann A, et al. HMGA1 and HMGA2 protein expression correlates with advanced tumour grade and lymph node metastasis in pancreatic adenocarcinoma. *Histopathology*. 2012 Feb;60(3):397–404.
 61. Watanabe S, Ueda Y, Akaboshi S, Hino Y, Sekita Y, Nakao M. HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. *The American journal of pathology*. 2009 Mar;174(3):854–68.
 62. Luo Y, Li W, Liao H. HMGA2 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology letters*. 2013 Apr;5(4):1353–6.
 63. Wang Y, Shang Y. Epigenetic control of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer metastasis. *Experimental cell research*. 2013 Jan 15;319(2):160–9.
 64. Li Y, Jin X, Li J, Jin X, Yu J, Sun X, et al. Expression of TRAIL, DR4, and DR5 in bladder cancer: correlation with response to adjuvant therapy and implications of prognosis. *Urology*. 2012 Apr;79(4):968.e7–15.
 65. Leithner K, Stacher E, Wurm R, Ploner F, Quehenberger F, Wohlkoenig C, et al. Nuclear and cytoplasmic death receptor 5 as prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2009 Jul;65(1):98–104.
 66. Kojima Y, Nakayama M, Nishina T, Nakano H, Koyanagi M, Takeda K, et al. Importin β 1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells. *The Journal of biological chemistry*. 2011 Dec 16;286(50):43383–93.

67. Chen J-J, Shen H-CJ, Rivera Rosado LA, Zhang Y, Di X, Zhang B. Mislocalization of death receptors correlates with cellular resistance to their cognate ligands in human breast cancer cells. *Oncotarget*. 2012 Aug;3(8):833–42.
68. Haselmann V, Kurz A, Bertsch U, Hübner S, Olempska-Müller M, Fritsch J, et al. Nuclear Death Receptor TRAIL-R2 Inhibits Maturation of Let-7 and Promotes Proliferation of Pancreatic and Other Tumor Cells. *Gastroenterology*. 2014 Jan;146(1):278–90.
69. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1979 Aug;27(8):1131–9.
70. Noll S, Schaub-Kuhnen S, Höfler H, Müller KM. *Praxis der Immunhistochemie*. Urban & Fischer Verlag; 2000.
71. Nichirei Bioscience. Advantages of Histofine Simple Stain. http://www.nichirei.co.jp/bio/english/tech_info/adv/hss14.html (21.01.2014)
72. Wittekind C, Meyer H-J. *TNM: Klassifikation Maligner Tumoren*. 7. Auflage. Weinheim: Wiley VCH; 2010.
73. Siegmund D, Klohe S, Zhou D, Baumann B, Röder C, Kalthoff H, et al. Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells. *Cellular signalling*. 2007 Jun;19(6):1172–84.
74. Sanlioglu AD, Dirice E, Elpek O, Korcum AF, Ozdogan M, Suleymanlar I, et al. High TRAIL death receptor 4 and decoy receptor 2 expression correlates with significant cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Pancreas*. 2009 Mar;38(2):154–60.
75. Stadel D, Mohr A, Ref C, MacFarlane M, Zhou S, Humphreys R, et al. TRAIL-induced apoptosis is preferentially mediated via TRAIL receptor 1 in pancreatic carcinoma cells and profoundly enhanced by XIAP inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010 Dec 1;16(23):5734–49.
76. Gallmeier E, Bader DC, Kriegl L, Berezowska S, Seeliger H, Göke B, et al. Loss of TRAIL-receptors is a recurrent feature in pancreatic cancer and determines the prognosis of patients with no nodal metastasis after surgery. *PloS one*. 2013 Jan;8(2):e56760.
77. Koschny R, Holland H, Sykora J, Erdal H, Krupp W, Bauer M, et al. Bortezomib sensitizes primary human esthesioneuroblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Journal of neuro-oncology*. 2010 Apr;97(2):171–85.
78. Sanlioglu AD, Korcum AF, Pestereli E, Erdogan G, Karaveli S, Savas B, et al. TRAIL death receptor-4 expression positively correlates with the tumor grade in

- breast cancer patients with invasive ductal carcinoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2007 Nov 1;69(3):716–23.
79. Lemke J, Noack A, Adam D, Tchikov V, Bertsch U, Röder C, et al. TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2010 Jul;88(7):729–40.
 80. Clancy L, Mruk K, Archer K, Woelfel M, Mongkolsapaya J, Screaton G, et al. Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Dec 13;102(50):18099–104.
 81. Zhang XD, Franco A V, Nguyen T, Gray CP, Hersey P. Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2000 Apr 15;164(8):3961–70.
 82. Kohlhaas SL, Craxton A, Sun X-M, Pinkoski MJ, Cohen GM. Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2007 Apr 27;282(17):12831–41.
 83. Zhang Y, Yoshida T, Zhang B. TRAIL induces endocytosis of its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer biology & therapy*. 2009 May;8(10):917–22.
 84. Spierings DC, De Vries EG, Vellenga E, Van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2004 Jun;52(6):821–31.
 85. Elrod HA, Fan S, Muller S, Chen GZ, Pan L, Tighiouart M, et al. Analysis of death receptor 5 and caspase-8 expression in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma and their prognostic impact. *PLoS one*. 2010 Jan;5(8):e12178.
 86. Cooper WA, Kohonen-Corish MRJ, Zhuang L, McCaughan B, Kennedy C, Screaton G, et al. Role and prognostic significance of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptor DR5 in nonsmall-cell lung cancer and precursor lesions. *Cancer*. 2008 Jul 1;113(1):135–42.
 87. Sarhadi VK, Wikman H, Salmenkivi K, Kuosma E, Sioris T, Salo J, et al. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *The Journal of pathology*. 2006 Jun;209(2):206–12.
 88. Tamimi Y, Van der Poel HG, Denyn MM, Umbas R, Karthaus HF, Debruyne FM, et al. Increased expression of high mobility group protein I(Y) in high grade

prostatic cancer determined by in situ hybridization. *Cancer research*. 1993 Nov 15;53(22):5512–6.

89. Abe N, Watanabe T, Suzuki Y, Matsumoto N, Masaki T, Mori T, et al. An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. *British journal of cancer*. 2003 Dec 1;89(11):2104–9.
90. Rahman MM, Qian ZR, Wang EL, Sultana R, Kudo E, Nakasono M, et al. Frequent overexpression of HMGA1 and 2 in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours and its relationship to let-7 downregulation. *British journal of cancer*. 2009 Feb 10;100(3):501–10.
91. Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nature reviews. Cancer*. 2007 Dec;7(12):899–910.
92. Esposito F, Tornincasa M, Federico A, Chiappetta G, Pierantoni GM, Fusco A. High-mobility group A1 protein inhibits p53-mediated intrinsic apoptosis by interacting with Bcl-2 at mitochondria. *Cell death & disease*. 2012 Jan;3:e383.
93. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009 Jun;119(6):1420–8.

8 Anhang

8.1 Etablierung der Antikörper

8.1.1 TRAIL-R1

Zunächst wurde das Gewebe von 5 Mammakarzinomen nach dem Protokoll von Ganten et al. (20) mit der Avidin-Biotin-Methode immunhistochemisch gefärbt. Zugleich wurden an den Mammakarzinomen mittels eines Polymersystems (siehe 3.2.3.2) immunhistochemische Färbungen durchgeführt bei einer Antikörperversdünnung von 1:50. Die Gewebeschnitte, die mittels Avidin-Biotin-Methode gefärbt wurden, zeigten eine deutlichere Anfärbung der Tumorzellen bei weniger unspezifischer Hintergrundfärbung. Mit diesem Protokoll wurde weitergearbeitet. Um die leichte Hintergrundfärbung weiter zu minimieren wurde die Einwirkzeit des Avidin-Biotin-Blocks von jeweils 15 auf jeweils 30 Minuten verlängert, was jedoch keine Verbesserung der Färbeergebnisse mit sich brachte, weshalb die Einwirkzeit wieder auf 15 Minuten reduziert wurde. Anschließend wurde die immunhistochemische Färbung erstmals an Pankreaskarzinomgewebe durchgeführt. Hier wurden Verdünnungen von 1:50, 1:100, 1:200 und 1:400 ausprobiert, wobei das beste Ergebnis mit deutlicher Anfärbung der Tumorzellen bei möglichst geringer Hintergrundfärbung bei einer Verdünnung von 1:200 lag.

8.1.2 TRAIL-R2

Auch dieser Antikörper wurde bereits von Ganten et al. (20) an Mammakarzinomen verwendet. Im ersten Schritt wurden nach dem publizierten Protokoll 5 Mammakarzinomproben immunhistochemisch gefärbt. Aufgrund starker Hintergrundfärbung wurde als Nächstes eine Vorbehandlung für 5 Minuten im Schnellkochtopf bei 120°C in Citratpuffer (pH = 6,0) gewählt, welche in einigen Präparaten eine Kernfärbung demaskierte. Zudem wurde die Einwirkzeit der Avidin-Biotin-Blockierung auf jeweils 30 Minuten erhöht. Dann wurden an Pankreaskarzinomen immunhistochemische Färbungen bei Verdünnungen von 1:100, 1:150, 1:200 und 1:400 durchgeführt. Gleichzeitig wurde mit einem Polymersystem (siehe 3.2.3.2) bei gleicher Vorbehandlung in den Verdünnungen 1:50, 1:100 und 1:200 gearbeitet. Insgesamt lieferte die Antigendetektion mit dem Polymersystem spezifischere Ergebnisse. Bei einer Verdünnung von 1:100 zeigte sich die beste Tumoranfärbung mit der geringsten Hintergrundfärbung.

8.1.3 TRAIL-R3

Auch hier wurden zunächst am Gewebe von 5 Mammakarzinomen nach dem Protokoll von Ganten et al. (20) mit der Avidin-Biotin-Methode immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Hier zeigte sich keine Anfärbung des Tumorgewebes. Daraufhin wurde in einem nächsten Schritt nach der Hitzedemaskierung noch eine 15-minütige enzymatische Vorbehandlung mit einer Proteinase K (Fa. Zytomed Systems) durchgeführt. Hier zeigte sich erneut keine Anfärbung des Tumorgewebes. Dann wurde die Hitzedemaskierung der Antigene durch 5-minütige Vorbehandlung im Schnellkochtopf bei 120°C in Citratpuffer einmal mit einem pH-Wert von 6,0 und einmal mit einem pH-Wert von 9,0 versucht. Auch hier färbte sich das Tumorgewebe nicht an. Um eine eventuelle Beschädigung des Antikörpers auszuschließen, wurden weitere Färbedurchgänge mit einer neuen Charge des Antikörpers durchgeführt. Auch hier zeigte sich keinerlei Immunreaktivität.

8.1.4 TRAIL-R4

Zur Etablierung des Antikörpers gegen TRAIL-R4 wurde ebenfalls an Mammakarzinomgewebe mit dem von Ganten et al. beschriebenen Protokoll (20) begonnen. Bei 25-minütiger Vorbehandlung im Wasserbad bei 99°C in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 zeigte sich hier nur eine schwache Anfärbung der Tumorzellen. In einem nächsten Schritt wurde die Antikörperkonzentration auf 1:100 verdoppelt, was das Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen kaum veränderte. Dann wurde die Vorbehandlung statt im Wasserbad im Schnellkochtopf für 5 Minuten bei 120°C ebenfalls in Citratpuffer (pH=6,0) durchgeführt. Hier zeigte sich eine starke Anfärbung der Tumorzellen sowie eine kräftige unspezifische Hintergrundfärbung. Deshalb wurde in einem nächsten Schritt die Antikörperkonzentration auf 1:400 verringert, wobei die gleichen Tumoren keine Anfärbung mehr zeigten. Daraufhin wurde die Konzentration wieder auf 1:200 angehoben und die Einwirkzeit der Avidin-Biotin-Blockierung auf jeweils 30 Minuten verlängert. Dann wurden an Pankreaskarzinomen verschiedene Verdünnungen des Primärantikörpers getestet, wobei sich das beste Ergebnis auch hier bei einer Verdünnung von 1:200 zeigte.

8.1.5 HMGA2

Zur Etablierung des Antikörpers gegen HMGA2 wurde zunächst ein gegen Maus und Kaninchen gerichtetes Peroxidase-gekoppeltes Polymer verwendet (siehe 3.2.3.2).

Da der Antikörper gegen HMGA2 jedoch aus der Ziege stammt, wurde zusätzlich ein Brückenantikörper verwendet. Zunächst wurden die Gewebeschnitte 5 Minuten im Schnellkochtopf bei 120°C in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 vorbehandelt. Der Primärantikörper wurde 1:100 verdünnt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Färbeergebnis waren schwach zytoplasmatisch positive Tumorzellen. Deshalb wurde in einem nächsten Schritt die Antikörper-Konzentration auf 1:50 erhöht, was das Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen minimal verbesserte. Verschiedene andere Vorbehandlungen (20 Minuten im Wasserbad bei 99°C in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0, 5 Minuten bei 120°C im Schnellkochtopf in EDTA-Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 9,3 bzw in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 9,0, 15-minütige enzymatische Vorbehandlung mit einer Proteinase) führten ebenfalls zu Ergebnissen mit sehr schwach positiven Tumorzellen. Nach 15-minütiger Antigendemaskierung im Schnellkochtopf bei 120°C in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 zeigten sich schließlich positive Tumorzellkerne. Um die immunhistochemische Färbung weiter zu verstärken wurde der Ultra-V-Block weggelassen und ein Enhancer (Primary Antibody Enhancer, Thermo Scientific) ausprobiert, der jedoch zu starker Hintergrundfärbung führte. Anschließend wurde die Inkubationszeit variiert, einmal auf 2 Stunden bei Raumtemperatur und einmal auf 30 Minuten bei Raumtemperatur mit anschließender Inkubation über Nacht bei 4°C. Bei 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur zeigte sich schließlich das beste Färbeergebnis mit deutlicher Kernfärbung und wenig Hintergrund. Anschließend wurde das Polymersystem ausgetauscht gegen ein direkt gegen die Ziege gerichtetes Polymer, wodurch der Brückenantikörper ebenfalls nicht mehr benötigt wurde.

8.2 Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL



ETHIK-KOMMISSION

An
Herrn Prof. Dr. B. Kremer
Direktor der Klinik für
Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
Arnold- Heller- Str. 7

Universitäts-Kinderklinik
Schwanenweg 20
24105 Kiel
Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-18 31

28.4.1999

24105 Kiel

Nachrichtlich: 1.) Herrn Prof. Dr. G. Klöppel, Institut für Allgemeine Pathologie und
Pathologische Anatomie der CAU zu Kiel, Michaelisstr. 11, 24105 Kiel
2.) Herrn Prof. Dr. H. Kalthoff, Klinik für Allgemeine Chirurgie und
Thoraxchirurgie der CAU zu Kiel, Arnold- Heller- Str. 7, 24105 Kiel

AZ: A 110/99

**Studienplan: Forschungs- und Zusammenarbeitsvertrag vom 15.12.1998
Forschungsprojekt : „ Aufbau einer Krebsgewebe-
sammlung “**

Antragsteller: Prof. Dr. Kremer, Prof. Dr. Kalthoff, Prof. Dr. Klöppel

Datum des

Antrages: 16.2.1999

Datum des

überarb. Antrages: 23.4.1999

Bestätigung

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die zu dem oben bezeichneten Versuchsplan eingereichten Unterlagen auf mögliche berufsethische und berufsrechtliche Bedenken hin überprüft.

Die Kommission stimmt darin überein, daß gegen die Durchführung der Studie nunmehr keine Bedenken bestehen.

Es wird darauf hingewiesen, daß künftig eventuell für zweckmäßig und notwendig erachtete Änderungen und Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

Nach Abschluß der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

J. Schaub

Prof. Dr. Jürgen Schaub
Vorsitzender der Ethik-Kommission
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel

8.3 Vergleich der beiden Antikörper gegen TRAIL-R2

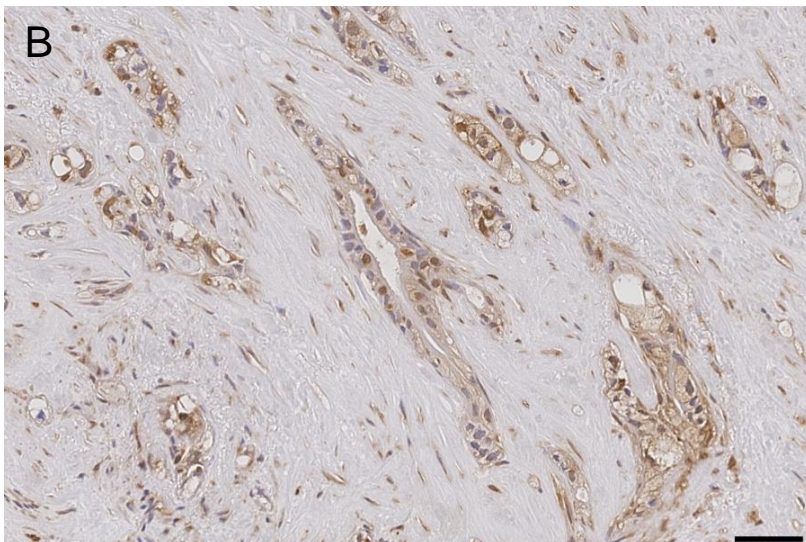
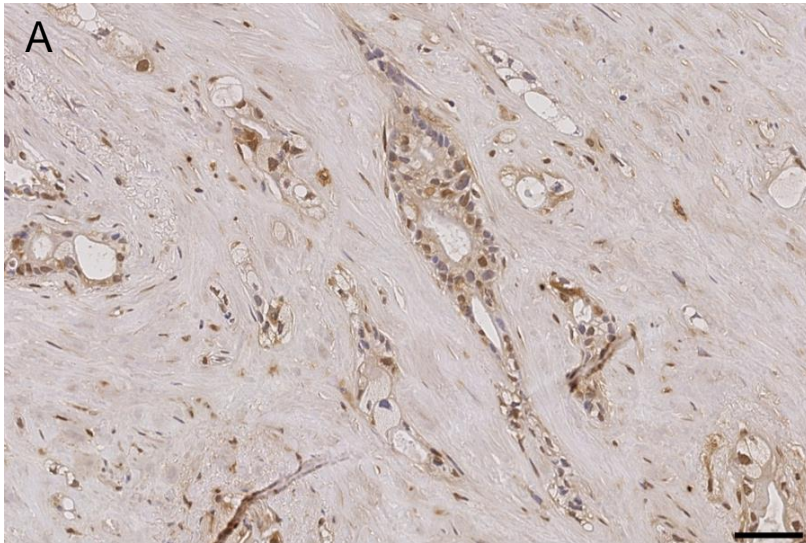


Abb.7: Immunhistochemische Färbungen eines dukalen Pankreasadenokarzinoms mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen TRAIL-R2. In Vorversuchen wurden zwei verschiedenen Antikörper gegen TRAIL-R2 miteinander verglichen. Beide Bilder zeigen den gleichen Tumor, einmal wurde für die immunhistochemische Färbung ein monoklonaler Antikörper aus der Maus (A), einmal ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (B) verwendet. Beide Antikörper zeigten sowohl eine zytoplasmatische als auch eine nukleäre TRAIL-R2-Expression. Für die Untersuchung des gesamten Kollektivs wurde schließlich der monoklonale Antikörper aus der Maus verwendet. Die schwarzen Balken entsprechen 50 µm (200fache Vergrößerung).

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff für die Überlassung des Themas sowie für die stets sehr gute Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Röcken danke ich sehr für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Gewebeproben aus dem Archiv des Instituts für Pathologie sowie für die fachkundige Hilfe bei der Beurteilung schwieriger Präparate.

Frau Dr. med. Christine Böger danke ich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit. Sie war mir eine unverzichtbare Hilfe bei der Auswahl des Kollektivs, bei der Etablierung der Antikörper und bei der Interpretation der immunhistochemischen Färbungen. Sie stand mir bei allen Fragen des wissenschaftlichen Arbeitens stets mit ihrem fachlichen und persönlichen Rat zur Seite.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. rer. nat. Christian Röder für die wertvolle Hilfe bei der Beschaffung der Patientendaten, bei der statistischen Auswertung der Daten sowie bei der Darstellung der Ergebnisse.

Frau PD Dr. rer. nat. Ania Trauzold danke ich sehr für die Vermittlung ihres Wissens über TRAIL-Rezeptoren sowie für Anregungen zur Gestaltung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Sandra Krüger und Frau Ann-Kristin Linning, die mir bei der täglichen Arbeit im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir meine gesamte Ausbildung ermöglicht haben. Sie und mein Lebenspartner Marc André Schlegel haben mich stets liebevoll unterstützt und waren immer für mich da. Vielen Dank für Alles!

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Franka Maria Annewanter
Geburtsdatum: 03.03.1987
Geburtsort: Flensburg

Studium

10/2007 bis heute Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
02/2012 bis 06/2012 Studium der Humanmedizin an der Université de Picardie Jules Verne in Amiens
08/2009 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2006 bis 09/2007 Studium der Meteorologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schulbildung

08/1997 bis 06/2006 Goethe-Schule Flensburg, Abschluss: Abitur
08/1993 bis 07/1997 Friedheim-Schule Flensburg

Promotion

08/2010 bis heute Experimentelle Doktorarbeit in der Sektion Molekulare Onkologie des Instituts für Experimentelle Tumorforschung an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Veröffentlichung:

Haselmann V, Kurz A, Bertsch U, Hübner S, Olempska-Müller M, Fritsch J, Häsler R, Pickl A, Fritsche H, Annewanter F, Engler C, Fleig B, Bernt A, Röder C, Schmidt H, Gelhaus C, Hauser C, Egberts JH, Heneweer C, Rohde AM, Böger C, Knippschild U, Röcken C, Adam D, Walczak H, Schütze S, Janssen O, Wulczyn FG, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A. Nuclear Death Receptor TRAILR2 Inhibits Maturation of Let-7 and Promotes Proliferation of Pancreatic and Other Tumor cells. *Gastroenterology*. 2014 Jan;146(1):278–90.