

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie  
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Jakob R. Izbicki

**Neoexpression von Netrin-1, UNC5H3, DCC und Neogenin in  
duktalen Adenokarzinomen des Pankreas.  
Mögliche prognostische Marker mit therapeutischer Relevanz?**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Matthias Schreiber  
aus Mühlhausen

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 10.06.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin  
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, 1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. E. Yekebas

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. H.-E. Laack

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. med. D. Reuter

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1	Zielsetzung der Arbeit .....	5
1.2.	Pankreas.....	6
1.3.	Pankreaskarzinom.....	7
1.4.	Netrin – 1 und die Rezeptoren DCC, Neogenin und UNC5H3.....	16
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1.	Material.....	19
2.2.	Chemikalien/ Reagenzien .....	20
2.3.	Pufferlösungen/ Farbstoffsubstrat .....	21
2.4.	Verdünnungsmedien.....	22
2.5.	Antikörper und Negativkontrollen .....	22
2.6.	Immunhistochemie .....	23
2.6.1.	Prinzip der Immunhistochemie.....	23
2.6.2.	Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode .....	24
2.6.3.	Gewebefixierung .....	24
2.6.4.	Paraffineinbettung .....	25
2.6.5.	Herstellung der Paraffinpräparate.....	25
2.6.6.	Nachweis von Netrin- 1 (N18) .....	26
2.6.7.	Nachweis von DCC .....	28
2.6.8.	Nachweis von Neogenin (C20).....	30
2.6.9.	Nachweis von UNC5H3 .....	32
2.7.	Hämatoxylin – Eosin – Übersichtsfärbung.....	34
2.8.	Histologische Auswertung und Quantifizierung der Färbungen .....	34
2.9.	Patientendaten.....	38
2.10.	Statistische Analyse.....	38
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1.	Patientendaten und pathologisch-anatomische Befunde .....	40
3.2.	Pathologisch-anatomische Befunde und Prognose.....	40
3.3.	Immunhistochemische Ergebnisse .....	48

3.3.1.	Netrin -1.....	48
3.3.2.	DCC.....	54
3.3.3.	Neogenin.....	56
3.3.4.	UNC5H3.....	58
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>79</b>
<b>9.</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>80</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1. Zielsetzung der Arbeit**

Charakteristisch für das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist die neurale Invasion [38,88]. Netrine sind neurale Wachstumsfaktoren, die an die Rezeptoren UNC5H3, DCC und Neogenin binden [16,42,51,100]. Die Affinität der Tumorzellen beim duktales Adenokarzinom des Pankreas zu neuralem Gewebe könnte assoziiert sein mit dem Vorkommen von neuronalen Wachstumsfaktoren und der Expression der entsprechenden Rezeptoren auf den Tumorzellen. Daher könnten Netrin-1, UNC5H3, DCC und Neogenin wichtige prognostische Marker für das duktales Adenokarzinom des Pankreas darstellen.

In dieser Arbeit werden diese Faktoren immunhistochemisch untersucht und die Ergebnisse mit den klinischen Verlaufsdaten, wie beispielsweise dem Tumorstadium, dem Tumorgrading, dem Lymphknotenstatus, dem Fernmetastasenstatus, dem rezidivfreien Überleben bzw. dem Gesamtüberleben und der Mikrometastasierung in das Knochenmark bzw. in die Lymphknoten korreliert.

Des Weiteren wird ein Zusammenhang zwischen der neuronalen Invasion bzw. der Angioinvasion und den verschiedenen Faktoren untersucht.

## 1.2. Pankreas

Das Pankreas ist ein etwa 70 – 90 Gramm schweres drüsiges Organ, das sich im mittleren bzw. linken Oberbauch befindet. Entwicklungsgeschichtlich bildet es sich aus dem Endoderm der Duodenalanlage. Dabei vereinigen sich eine ventrale und dorsale Anlage. Durch die Verlagerung des Mesogastriums dorsale kommt es zur Anlagerung an die hintere Bauchwand und damit zur retroperitonealen Lage.

Das Pankreas wird makroskopisch in Caput-, Corpus-, und Cauda pancreatis gegliedert, wobei jeder Anteil sowohl exokrine als auch endokrine Drüsenanteile besitzt. Exokrine Sekrete werden über den Ductus pancreaticus major und minor an den entsprechende Papillen in das Duodenum drainiert. Endokrine Substanzen werden autokrin in das Blut sezerniert. Histologisch besteht das exokrine Pankreas aus tausenden von Acini, die durch Bindegewebsstrukturen eine Läppchenstruktur bilden. Diese Acini sind über Schaltstücken mit dem Ausführungsgangsystem verbunden. Der endokrine Anteil des Pankreas wird aus Insulae pancreatica (Langerhanssche Inseln) gebildet. Sie betragen etwa 2% des Gesamtgewichts des Pankreas.

Funktionell unterscheiden sich exokriner und endokriner Anteil erheblich. Das exokrine Pankreas produziert in seinen Acinuszellen und den kleinen Gängen etwa 1 -1,5 Liter Pankreassekret täglich. Diese Verdauungsenzyme bestehen aus Proteasen, Glykosiden, Nukleasen und Lipasen. Desweiteren werden Bikarbonationen sezerniert, die den pH-Wert des Pankreassekrets auf etwa 8 aufrechterhalten. Im endokrinen Anteil des Pankreas befinden sich  $\beta$ -Zellen, zur lebensnotwendigen Insulinproduktion, A-Zellen zur Glukagonproduktion, D-Zellen zur Somatostatinproduktion und PP-Zellen für das pankreatische Polypeptid [17].

### 1.3. Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom wurde erstmals von Mondier im Jahr 1936 beschrieben. Seit dieser Zeit ist eine ständige Zunahme der Inzidenz der Erkrankung zu verzeichnen. Es tritt vor allem in den westlichen Industriestaaten und bei Personen des höheren Lebensalters auf. Nach neuesten Erkenntnissen besteht kein substantieller Unterschied zwischen den Geschlechtern, das Verhältnis beträgt derzeit 1,3 Männer : 1,0 Frauen, damit erkranken Männer etwas häufiger als Frauen. In Deutschland beträgt die Inzidenz derzeit 7 pro 100 000 bei Männern und 5 pro 100 000 bei Frauen und Jahr, wobei ein Häufigkeitsgipfel zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr zu erkennen ist. Insgesamt liegt die Häufigkeit in der westlichen Welt bei 10/100 000 pro Jahr. Die Mortalitätsrate dieser aggressiven Tumorerkrankung entspricht in etwa der Inzidenz, bezogen auf die gesamten westlichen Industrienationen, und beträgt bei Männern 10/100 000 bzw. bei Frauen 7,2 pro 100 000 pro Jahr. Dies ist darauf zurückzuführen, da die 5 Jahres-Überlebensrate nach diagnostiziertem Pankreaskarzinom im Durchschnitt < 5% beträgt. Damit nimmt dieser Tumor, nach dem Bronchial-, Prostata- und Kolonkarzinom in der Krebsodstatistik den vierten Platz bei Männern und den sechsten Platz bei Frauen ein [31,55,63,84].

Weltweit ist ein regionärer Unterschied zu sehen. Die höchsten Inzidenzen, mit bis zu 20 Fällen pro 100 000 Einwohner weisen die farbigen amerikanischen Männer auf. Indien, Singapur und Kuwait weisen mit 1 Fall pro 100 000 Einwohner hingegen die geringste Häufigkeit auf [12].

Die Ätiologie des dukalen Adenokarzinoms und anderer exokriner Pankreastumore ist weitgehend ungeklärt. Gesicherte Faktoren, welche die Entstehung des Tumor begünstigen, sind Rauchen, die Ernährung mit einem hohen Fett- und Fleischanteil und chronische Pankreatitis [57,58,83]. Beim Rauchen kommt es durch N- Nitrosamine zur Reaktion mit der DNA, wodurch es zu Fehlkodierungen und zur Aktivierung spezifischer Onkogene, wie z.B. k-ras kommt [83]. Als Wirkungsmechanismus bei erhöhter Fettzufuhr wird die Freisetzung von gastrointestinalen Hormonen wie z.B. Sekretin und Cholecystokinin vermutet. Diese Hormone wirken hyperplastisch auf das Pankreas [21]. Auch genetische Prädispositionen sind bekannt [25]. Nach bisherigen Untersuchungen werden rund 10 % der Pankreaskarzinome einer vererbten Erkrankung

zugeordnet. So konnte bei erhöhter Pankreaskarzinomfrequenz ein Zusammenhang zwischen Keimzellmutationen der Tumorsuppressorgene p16 und brca 2, wie sie beim Melanom bzw. familiären Mammakarzinom vorkommen, festgestellt werden [92,98]. Weitere hereditäre Erkrankungen, die ein erhöhtes Pankreaskarzinomrisiko aufweisen können, sind das Peutz – Jeghers – Syndrom (100-130-fach erhöhtes Risiko), die Hereditäre Pankreatitis (70-100-fach), das Familial atypical multiple-mole melanome FAMMM (10–70-fach), das familiäre Pankreskarzinom (60-fach), die Zystische Fibrose, die chronische Pankreatitis, die familiäre Polyposis coli und das von Hippel-Lindau-Syndrom.

Weiterhin werden Diabetes mellitus, Magenteilresektionen, Cholecystektomie und berufliche Expositionen mit Chemikalien, wie Benzidin, Benzinderivaten und DDT, als mögliche prädisponierende Faktoren diskutiert. Hier konnte jedoch noch keine eindeutige Pathogenese belegt werden [3,21,28,96]. Für Alkohol- und Kaffeekonsum konnte kein Zusammenhang mit der Entstehung eines Pankreaskarzinoms nachgewiesen werden [21].

Ähnlich, wie bei anderen malignen epithelialen Tumoren, findet man auch beim Pankreaskarzinom verschiedene Vorläuferstadien bis zur Entstehung des Tumors. Man teilt diese Stadien nach der PanIN – Klassifikation ein [36]. Dabei unterscheidet man hyperplastische Veränderungen, die flachen muzinösen (PanIN 1A) oder papillären (PanIN 1B) Charakter zeigen, von Dysplasien, die über ein Carcinoma in situ in ein invasives Karzinom übergehen können. Dysplasien werden in low grade(PanIN 2) und high grade(PanIN 3) unterteilt. [Abb.1] Dieses pathologische Wachstum beruht auf einer Aktivierung von Onkogenen und einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Daraus resultiert, dass Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren vermehrt bzw. vermindert exprimiert werden, und damit die Kanzerogenese aktiviert wird [68,86]. Eine Übersicht zu Wachstumsfaktoren bzw. Rezeptoren mit Auswirkungen auf das Wachstum von Pankreastumoren, stellt Tabelle 1 dar. Für das Pankreaskarzinom ist das k-ras Onkogen von besonderer Bedeutung. Es ist in bis zu 100% der Tumoren mutiert [74,77]. Bei den Tumorsuppressorgenen sind v.a. p53, p16, dpc4 und brca2 zu erwähnen, die durch Veränderungen, besonders im Zellzyklus oder in verschiedenen

Signalwegen zur Karzinogenese führen. Dabei haben p16 und dpc4 im Pankreaskarzinom eine besonders hohe Inaktivierungsfrequenz [33,82].

**Tabelle 1. Wachstumsfaktoren und deren Eigenschaften bei Pankreaskarzinomen**

Eigenschaften malignen Wachstums	Pankreaskarzinom
Autonome Wachstumskontrolle	verstärkte Expression von EGF, FGF, DGF, IGF und deren Rezeptoren
Resistenz gegenüber Wachstumsinhibierung	verstärkte Expression von TGF- $\beta$ u. deren Rezeptoren, Smad 4-Mutationen, Smad 6 u. 7 Überexpression
Apoptoseresistenz	verstärkte Expression von EGF, IGF und deren Rezeptoren
Angiogenese	verstärkte Expression von VEGF, FGF-2 und deren Rezeptoren
Invasion und Metastasierung	verstärkte Expression von HGF, TGF- $\beta$ s, NGF und deren Rezeptoren

Typisch für diese Tumorentität ist die frühe Tumorausbreitung in das peripankreatische Gewebe, insbesondere die Infiltration von Gallenwegen, Duodenum, Gefäßen und Nerven. Des Weiteren findet eine frühe Metastasierung statt, sodass zum Operationszeitpunkt bereits in einem Großteil der Fälle Lymphknotenmetastasen bestehen. Fernmetastasen sind v.a. in der Leber, dem Peritoneum, der Pleura, dem Skelettsystem und der Lunge zu finden [9,21].

Mehr als 90 % der Pankreaskarzinome haben ihren Ursprung in den exokrinen Organanteilen. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um duktales Adenokarzinome (90 %). Speziell diese duktales Adenokarzinome entstehen mit 70 – 80% v.a. im Pankreaskopf, und sind zum Diagnosezeitpunkt bereits zu 80 % im metastasierten Zustand [13].

Der Tumor ist makroskopisch, besonders wenn er sehr klein ist, schwer zu erkennen, da er oft von einer peritumorösen Begleitpankreatitis maskiert wird.

Histologisch unterscheidet man verschiedene Typen der exokrinen Pankreastumoren. Diese sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Des Weiteren werden die Karzinome nach ihrem histopathologischen Differenzierungsgrad unterschieden, der jedoch für die Prognose weniger relevant erscheint. Dabei steht Grad 1 für ein hochdifferenziertes Karzinom. Es stellt etwa 40 % der Tumore dar. Grad 2(50 %) entspricht einem mässig differenzierten und Grad 3(10 %) einem wenig oder undifferenzierten Karzinom [44].

Ein Standard des Tumorstagings von exokrinen Pankreastumoren stellt die TNM-Klassifikation der UICC und Residualtumorklassifikation der UICC dar. Diese Einteilungen sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt. Für die Prognose bedeutsam ist die Ermittlung des Tumorstadiums. Dieses wird von der UICC durch Kombination der T-, N-, M- Kategorien ermittelt, und ist in Tabelle 5 dargestellt. Dabei stellt das Stadium I die geringste Tumorausbreitung dar, das Stadium IV steht für einen weit fortgeschrittenen Tumor mit Fernmetastasen.

**Tabelle 2. WHO-Klassifikation 2000 von exokrinen Pankreastumoren**

---

**Benigne Tumoren**

---

Seröses Zystadenom  
Mucinöses Zystadenom  
Intraduktal papillär-muzinöses Adenom  
Zystisches Teratom

---

**Borderline Tumoren**

---

Muzinös zystischer Tumor mit mässiger Dysplasie  
Intraduktal papillär-muzinöser Tumor mit mässiger Dysplasie  
Solid- pseudopapillärer Tumor

---

**Maligne Tumoren**

---

Schwere duktale Dysplasie – carcinoma in situ  
Duktales Adenokarzinom  
Muzinöses nichtzystisches Karzinom  
Adenosquamöses Karzinom  
Anaplastisches Karzinom  
Gemischtes duktal-endokrines Karzinom  
Osteoklastenähnlicher Riesenzelltumor  
Seröses Zystadenokarzinom  
Muzinöses Zystadenokarzinom (nichtinvasiv/ invasiv)  
Intraduktal papillär-muzinöses Karzinom (nichtinvasiv/ invasiv)  
Azinuszellkarzinom  
Azinuszellcystadenokarzinom  
Gemischt -azinär-endokrines Karzinom  
Pankreatoblastom  
Solid-pseudopapilläres Karzinom

**Tabelle 3. TNM- Klassifikation exokriner Pankreaskarzinome nach UICC 2002**

<b>T – Primärtumor</b>	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T 0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T 1	Tumor auf Pankreas begrenzt, maximaler Durchmesser 2 cm
T 2	Tumor auf Pankreas begrenzt, maximaler Durchmesser > 2 cm
T 3	Tumor überschreitet die Organgrenzen, jedoch ohne Infiltration des Truncus coelicus oder der A. mesenterica superior
T 4	Tumorinfiltration von Nachbarorganen, mit Infiltration des Truncus coeliacus oder der A. mesenterica superior

<b>N – regionäre Lymphknoten</b>	
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N 0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N 1	Regionäre Lymphknotenmetastasen

<b>M – Fernmetastasen</b>	
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M 0	Keine Fernmetastasen
M 1	Fernmetastasen

**Tabelle 4. Residualtumorklassifikation der UICC 2002**

<b>Klassifikation</b>	<b>Residualtumor</b>
R X	Residualtumor kann nicht bestimmt werden
R 0	kein nachweisbarer Residualtumor nach operativer Therapie
R 1	mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor nach operativer Therapie
R 2	makroskopisch nachweisbarer Residualtumor nach operativer Therapie

**Tabelle 5. Stadiengruppierung exokriner Pankreaskarzinome nach UICC 2002**

<b>Stadium</b>	<b>TNM – Klassifikation</b>		
0	Tis	N 0	M 0
I A	T 1	N 0	M 0
I B	T 2	N 0	M 0
II A	T 3	N 0	M 0
II B	T1-T3	N 1	M 0
III	T4	jedes N	M 0
IV	jedes T	jedes N	M 1

Die schlechte Prognose exokriner Pankreastumoren hat eine ihrer wesentlichsten Ursachen in der schwierigen und dann oft zu späten Erkennung dieser Tumoren. Zu diesem Zeitpunkt ist eine kurative Therapie meist nicht mehr möglich. Der Grund einer zumeist späten Entdeckung ist das Fehlen eindeutiger Früh- und Leitsymptome. Gegebenenfalls kann die Symptomtrias aus Verschlussikterus, unspezifischen Oberbauchbeschwerden und Gewichtsverlust erste Hinweise auf diese Malignomerkrankung geben. Auch ein neu aufgetretener Diabetes mellitus oder eine akute Pankreatitis können in seltenen Fällen Anzeichen eines Karzinoms darstellen [2, 5,9,75].

Die Diagnostik des Pankreaskarzinoms erfolgt nahezu ausschließlich mittels bildgebenden Verfahren und histologischer Untersuchung. Es hat sich erwiesen, dass Bildgebung die Tumordetektion, die Dignitätsbeurteilung und die Resektabilität am besten bewertet. Dazu werden insbesondere die Oberbauchsonographie, die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie eingesetzt. Histologischer Aufschluss ist dann notwendig, wenn ein Malignom von anderen Neoplasien zu differenzieren ist. Laborchemische Parameter, Tumormarker und molekulargenetische Diagnoseverfahren, sind zur alleinigen Diagnosesicherung nicht geeignet. Um eine optimale Therapieplanung zu ermöglichen, kann man sich weiterer zusätzlicher diagnostischer Verfahren bedienen. Hierzu zählen Endosonographie, ERCP, MRCP und Angiographie. In Ausnahmefällen kann eine Laparoskopie zur Fragestellung der Resektabilität sinnvoll sein [1,9,26,53,78,91].

Somit kann man durch diagnostische Verfahren die Prognose eines Patienten mit Pankreaskarzinom einschätzen, und darauf basierend einen optimalen Therapieansatz planen. Für die rationale Therapieplanung ist es dabei sinnvoll das Pankreaskarzinom in drei Stufen einzuteilen.

1. lokalresizierbares Pankreaskarzinom
2. lokal fortgeschrittenes, irresektables Pankreaskarzinom, ohne Fernmetastasen
3. Pankreaskarzinom mit Nachweis von Fernmetastasen

Die Therapie des Pankreaskarzinoms ist bis zu heutigen Zeitpunkt unbefriedigend.

Die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit besteht bei lokalresizierbaren Karzinomen in der radikalen Resektion des Tumors. Dies setzt voraus, dass keine multiplen Fernmetastasen vorliegen. Da zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die

Erkrankung zumeist jedoch im fortgeschrittenen Stadium vorliegt, ist diese Form der Behandlung nur bei 15 bis 20 % der Patienten möglich. Im Anschluss kann bei diesen Patienten, zur Reduktion der Lokalrezidivrate, eine adjuvante Radio- oder Chemotherapie, oder deren Kombination eingesetzt werden [26,48,71,93].

Im Fall eines fortgeschrittenen, zunächst irresktablen Tumors ohne Metastasierung besteht die Möglichkeit einer neoadjuvanten Radio- Chemotherapie, womit eine kurative Resektion angestrebt werden kann [9,10,67].

Im Rahmen der Palliativbehandlung, d.h. bei Vorliegen von Fernmetastasen oder bei inoperablen fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen, wird derzeit eine Kombinationstherapie aus Radio- und Chemotherapie oder eine alleinige hochdosierte Chemotherapie angewandt. Hierbei werden sowohl Monochemotherapieverfahren als auch Polychemotherapieverfahren eingesetzt. Die Substanzen 5-Fluoruracil und Gemcitabine zeigen hier die beste Wirksamkeit. Eine weitere palliative Therapieoption besteht durch operative Verfahren. Hier kommen insbesondere Bypassoperationen, wie die Anlage einer biliodigestiven Anastomose bzw. eine Gastrojejunostomie zum Einsatz. Jedoch kann die Überlebenszeit bei all diesen Therapieverfahren nur gering verbessert werden [8,30,99].

Daher kommt einer supportiven Therapie, mit dem Ziel einer Verbesserung der Lebensqualität, eine besondere Rolle zu. Hier steht die Schmerztherapie an erster Stelle. Aber auch die Behandlung tumorassoziierter Symptome, wie Tumorkachexie, exokrine- und endokrine Pankreasinsuffizienz, Aszites, Verschlussikterus und Depression ist von entscheidender Bedeutung [26,69].

#### **1.4. Netrin-1 und die Rezeptoren DCC, Neogenin und UNC5H3**

Netrine, eine Familie der Lamininproteine, sind sezernierte Glykoproteine, die als Mediatoren der Regulation axonaler Entwicklung im ZNS bekannt geworden sind. Sie stellen chemotropische Moleküle dar, welche das Axonwachstum und die Axonorientierung bzw. neuronale Migration bei der neuronalen Entwicklung vermitteln [16,41, 42,100]. Neben dieser Funktion im neuronalen Gewebe konnte auch der Einfluss der Netrine auf Gefäßendothel und Gefäße glatter Muskelzellen festgestellt werden. Denn Netrine stimulieren Proliferation, induzieren Migration und fördern Adhesion [73].

In Anbetracht dessen, dass sowohl der neuronale als auch der vaskuläre Mechanismus bei der Tumorgenese eine entscheidende Rolle spielt, wird im großen Ausmass ein Einfluss der vermittelnden Zytokine dieser Effekte erforscht [6,14,18,29,34,39,97].

Die Funktion der Netrine wird durch zwei unterschiedliche Rezeptorfamilien vermittelt: die DCC Rezeptor- Familie, zu der auch Neogenin gehört und die UNC5H-Rezeptor- Familie [41,51,52]. Es wurde gezeigt, dass diese Rezeptoren, ebenso wie Netrin, in die Pathogenese von multiplen Tumoren einbezogen sind [11,20,46,64,65,89,90]. Das DCC-Rezeptor Gen (Deleted in Colorectal Cancer) wurde von Vogelstein und Kollegen auf Chromosom 18 (18 q21.2) entdeckt [23,24,35]. Aufgrund reduzierter oder fehlender Expression von DCC in diversen Karzinomen wird vermutet, dass DCC möglicherweise als ein Tumorsuppressor fungiert [23]. Experimentell konnte jedoch an Mäusen, denen eine Kopie des DCC-Gen fehlt, gezeigt werden, dass kein erhöhtes Tumorrisiko besteht, und somit der Charakter als Tumorsuppressor in Frage gestellt ist [22]. Mehlen und Kollegen berichteten, dass DCC in Abwesenheit von Netrin-1 Apoptose induziert. In Anwesenheit von Netrin-1 wurde die Apoptose hingegen gehemmt [62]. Daher wird DCC als ein sogenannter „dependence receptor“ betrachtet, d.h. in Abhängigkeit von seinem Liganden können unterschiedliche Vorgänge induziert bzw. gehemmt werden. In Hinblick auf das Überleben der Zellen zeigen diese „dependence receptor`s“ verschiedene funktionelle Eigenschaften, die durch An- bzw. Abwesenheit ihres jeweiligen Liganden bestimmt wird. Entsprechend des Bindungsstatus ihrer jeweiligen Liganden können sie Apoptose sowohl induzieren als auch inhibieren. Dieses Prinzip der abhängigen Regulation der

Apoptose wird ebenfalls für die verwandten Rezeptoren Neogenin und UNC5H3 angenommen [4,7,60,61]. Mazelin und Kollegen zeigten, dass eine Hemmung der Apoptose bei zunehmender Netrin-1 Expression im Gastrointestinaltrakt von Mäusen zu einer spontanen Entwicklung von hyperplastischen und neoplastischen Läsionen führte [59].

Der Neogenin- Rezeptor ist ebenfalls ein transmembranes Protein, welches DCC ähnelt und zu dessen Rezeptor-Familie gezählt wird. Aufgrund ihres strukturellen Aufbaus werden DCC und Neogenin-1 zu den zellulären Adhäsionsmolekülen (CAM) und der Immunglobulin- Superfamilie gezählt [23,40]. Zahlreiche Studien belegen, dass Neogenin, wie auch DCC eine bedeutsame Rolle für die intakte neuronale Entwicklung von Vertebraten spielt. Mittlerweile konnte Neogenin-1 auch in Epithelzellen von Lunge und Gastrointestinaltrakt detektiert werden [27]. Weiterhin konnten Srinivasan und Kollegen in vivo eine Interaktionen zwischen Neogenin und Netrin-1 in sich entwickelnden Brustdrüsen bei Mäusen nachweisen. Die Bindung von Netrin-1 an seinen Rezeptor Neogenin-1 war für die Zelladhäsion zwischen zwei Epithelschichten und somit für die regelrechte Morphogenese von Brustdrüsen essentiell. Bei Mutationen von Neogenin-1 und Netrin-1 konnten unorganisiertes Wachstum der Enddrüsen, Einbrüche der Basallamina und verstärkt Apoptose beobachtet werden. Neogenin ist scheinbar an Vorgängen der Signaltransduktion beteiligt [87].

Da Netrin- 1 auch als Ligand bei den Rezeptoren UNC5H1-3 fungiert und diese, wie DCC, zur Familie der „dependence“ Rezeptoren zählen, wird auch bei ihnen eine Beteiligung an Apoptose bzw. die Funktion eines Tumorsuppressors angenommen [4,7,52,60]. UNC5H-Rezeptoren sind beim Erwachsenen zwar deutlich stärker im Nervensystem exprimiert, konnten jedoch im Verlauf auch außerhalb des Nervensystems in diversen anderen Organen nachgewiesen werden. Eine herabgesetzte Expression der humanen UNC5H1-3 Rezeptoren konnte in unterschiedlichen Karzinomen beobachtet werden [4,61,89].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Gleichgewicht von Netrin-1 und seinen Rezeptoren einen bedeutenden Parameter für die Kontrolle von Tumorentwicklung darzustellen scheint. In dieser Arbeit soll nun immunhistochemisch das Vorhandensein von Netrin und seinen Rezeptoren DCC, Neogenin und UNC5H3 in dukta-

Adenokarzinomen des Pankreas nachgewiesen und retrospektiv mit klinischen und tumorspezifischen Daten des Patientenkollektivs korreliert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

Becherglas 500 ml/ 1000ml	Fa. Schott Duran
Deckgläser	Fa. MARIENFELD
Einmalpipetten	Fa. ELKAY, Ireland
Eppendorf Tubes 0,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Erlenmeierkolben 100ml/ 5000ml	Fa. Schott Duran
Filterpapier	Fa. Schleicher & Schnell, Dassel
Inkubator	Heraeus Instruments
Küvetten	Fa. C. Roth, Karlsruhe
Küvetteneinsatz	Fa. C. Roth, Karlsruhe
Labor pH-Meter	WTW GmbH & Co, Weilheim
Laboruhr	Fa. C. Roth, Karlsruhe
Magnetrührer	Fa. Gerhardt
Messzylinder 100 ml	Fa. Schott Duran
Messzylinder 1000ml	Fa. Brand
Mikroskop	Fa. Zeiss, Jena, Axioskop 40
Mikrowelle	Fa. Bosch
Objektträger	Fa. MARIENFELD
Paraffinausgussstation	Fa. Mikrom, Heidelberg
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt
Polystyrol – Pinzette	J. Söllner GmbH, Deggendorf
Schlittenmikrotom	Fa. Mikrom, Heidelberg
Waage	sartorius Laboratory
Wasserbad	Fa. Köttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen

## 2.2. Chemikalien/ Reagenzien

ABC kit, Elite PK – 6105	Vector Laboratories, Burlingane, USA
ABC kit, Elite PK – 6200	Vector Laboratories, Burlingane, USA
Citronensäuremonohydrat	Fa. MERCK, Darmstadt
DAB – Peroxidase Substrate kit SK – 4100	Vector Laboratories, Burlingane, USA
Ethanol 80%, 96%, 100%	Fa. Walter CMP GmbH&Co.
Eukitt	Fa.O. Kindler GmbH&Co, Freiburg
Formaldehyd	Fa. Merk, Darmstadt
Isopropanol 20%,40%,60%,80%,90%,100%	Fa.Walter CMP GmnH&Co.
Magermilchpulver	Fa. MERCK, Darmstadt
MAYER`s HEMATOXYLIN SOLUTION	Fa. SIGMA, Steinheim
Methanol	Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland
Natronlauge 1N / 2N	Fa. MERCK, Darmstadt
Paraffin	Fa. MERCK, Darmstadt
Roti – Histol	Fa. Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Salzsäure 1N / 2N	Fa. MERCK, Darmstadt
Sodium Chloride	Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland
Tri- Na- Citrat- Dihydrat	Fa. MERCK, Darmstadt
Trisma base, minimum 99,9% ige Titration	Fa. SIGMA, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30% ig	Fa. MERCK, Darmstadt
Xylol	Fa. VOTRE PARTENAIRE CHIMIE, Frankreich

## 2.3 Pufferlösungen/ Farbstoffsubstrat

**Citrat – Puffer**      Lösung A – 29,41 Gramm Citronensäuremonohydrat werden in  
1 Liter destilliertem Wasser gelöst

                                 Lösung B – 29,41 Gramm Tri- Na- Citrat Dihydrat werden in 1  
Liter destilliertem Wasser gelöst

Für 1 Liter Citratpuffer werden 18 ml Lösung A und 82 ml Lösung B mit 900 ml  
destilliertem Wasser gemischt und der pH – Wert auf 6 eingestellt.

### **TRIS – Puffer**

- **Ansatz für 5 Liter**
- 30 Gramm TRISMA – Pulver
- 42,5 Gramm Na Cl
- 100 ml HCl (2 N)
- Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 5 Liter
- pH – Wert auf 7,4 einstellen

### **DAB – Substrat**

- 5 ml destilliertes Wasser
- 2 Tropfen Buffer
- 4 Tropfen DAB Farbstoff
- 2 Tropfen Hydrogenparoxide

## 2.4. Verdünnungsmedien

1.) TRIS – Puffer

2.) TRIS – Puffer mit Magermilchpulver

- 1 % ig – 0,5 Gramm Magermilchpulver + 50 ml TRIS - Puffer

- 2,5 % ig – 1,25 Gramm Magermilchpulver + 50 ml TRIS - Puffer

- 10 % ig – 5 Gramm Magermilchpulver + 50 ml TRIS - Puffer

## 2.5. Antikörper und Negativkontrollen

### Antikörper

DCC	Purified mouse anti – human DCC, Cat. No 554223, Lot 0000050499, Fa. B&D Bioscience Pharmingen
Neogenin (C-20)	sc – 6536, Lot # G 210, goat polyclonal Ig G Fa. Santa Cruz Biotechnologie
Netrin – 1 (N-18)	sc – 9291, Lot # H 2604, goat polyclonal Ig G Fa. Santa Cruz Biotechnologie
UNC5H3	anti – h UNC5H3, Purified mouse monoclonal Ig G2b, Clone 200414, Katalog No. MAB 1005 Fa. R&D Systems

### Negativkontrollen

MOPC – 21	Mouse Ig G1, kappa, M 9269, Fa. SIGMA
MOPC – 141	Mouse Ig G2b, kappa, M 8894, Fa. SIGMA
normal goat Ig G	sc – 2028, Lot # G 1504, control Ig G Fa. Santa Cruz Biotechnologie

## **2.6. Immunhistochemie**

### **2.6.1. Prinzip der Immunhistochemie**

Immunhistochemische Verfahren haben seit der Einführung eine zunehmende Bedeutung in der Medizin und Biologie erreicht. Aufgrund der Verfeinerung der immunhistochemischen Techniken werden Sensitivität und Spezifität stetig verbessert. Heute ist diese Technik v.a. Bestandteil der Pathologie und Anatomie, wo zahlreiche histopathologische Fragestellungen erforscht und beantwortet werden. Das Prinzip der Immunhistochemie besteht darin, dass im Gewebe vorhandene antigene Determinanten mit spezifischen Antikörpern reagieren, und diese über ein Enzym oder einem fluoreszierenden Farbstoff im Mikroskop sichtbar gemacht werden. Diese Antikörper können monoklonal oder polyklonal sein und stammen von verschiedenen Tierspezies. Da monoklonale Antikörper nur gegen eine Determinante gerichtet sind, besitzen sie eine höhere Spezifität als polyklonale Antikörper.

Es gibt zahlreiche Methoden zur immunhistochemischen Darstellung. Bei der direkten Methode ist der Primärantikörper direkt mit einem Marker konjugiert. Dieses Verfahren ist sehr schnell, aber teuer, da Antikörper in hohen Konzentrationen eingesetzt werden müssen. Bei der indirekten Methode erfolgt der Nachweis mit einem weiteren Antikörper, dem so genannten Sekundärantikörper. Dieser ist mit einem Markerenzym konjugiert und stellt eine Brückenfunktion zwischen dem Primärantikörper und dem Farbstoffkomplex dar. Der Vorteil dieser Methode ist eine höhere Sensitivität und eine bessere Farbsignalgebung mit weniger Hintergrundfärbung.

In der Praxis finden v.a. die APAAP (alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase)- Methode, die PAP ( Peroxidase anti Peroxidase)- Methode und die ABC (Avidin Biotin Komplex)- Methode Anwendung.

### **2.6.2. Avidin-Biotin-Komplex (ABC) – Methode**

Die ABC-Methode stellt die gebräuchlichste indirekte Methode zum Nachweis von Antigenen dar. Der Name leitet sich vom Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex ab, der als ein wichtiger Schritt in dieser Untersuchung für die hohe Sensitivität verantwortlich ist. Zunächst reagiert wie bei allen anderen immunhistochemischen Verfahren der Primärantikörper mit dem gesuchten Antigen, und bildet einen Komplex. An diesen lagert sich der biotinylierte Sekundärantikörper an. Durch anschließende Inkubation mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, der an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet, kann das Antigen sichtbar gemacht werden. Dies geschieht dadurch, dass das Enzym Peroxidase des Komplexes mit dem Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) reagiert und so zu einer Braunfärbung des gesuchten Antigenes führt.

### **2.6.3. Gewebefixierung**

Die Pankreas-Gewebe wurden in einer wässrigen Formalinlösung fixiert. Dies stellt die gebräuchlichste Art der Gewebeerhaltung postoperationem dar. Hierzu wurden die Gewebe 8-18 Stunden bei Raumtemperatur in 10%iger, gepufferter Formalinlösung ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Formaldehyd 37%, destilliertes Wasser) fixiert und anschließend 2 bis 6 Stunden in Leitungswasser gespült.

#### **2.6.4. Paraffineinbettung**

Die fixierten Gewebe müssen, bevor sie geschnitten werden können, eingebettet werden. Dies erfolgte in Paraffin. Vor der Einbettung wurden folgende Dehydrierungsschritte durchgeführt:

- 45-60 Min. Isopropanol 20%ig
- 45-60 Min. Isopropanol 40%ig
- 45-60 Min. Isopropanol 60%ig
- 45-60 Min. Isopropanol 80%ig
- 45-60 Min. Isopropanol 90%ig
- 45-60 Min. Isopropanol 100%ig Nr. 1
- 45-60 Min. Isopropanol 100%ig Nr. 2
- 8-16 Stunden Isopropanol 100%ig Nr. 3
- 1 Stunde Xylol Nr. 1
- 1 Stunde Xylol Nr. 2
- 1 Stunde Xylol Nr. 3

Nach dem Durchlaufen der Dehydrierungsreihe erfolgte das Einbringen der Gewebe in das heiße Paraffin. Zunächst 4 Stunden in Paraffin Nr. 1, 55-65° Celsius, dann 8 bis 16 Stunden in Paraffin Nr.2, 55-65° Celsius und anschließend 4 Stunden in Paraffin Nr. 3, ebenfalls 55-65° Celsius. Aus dem Paraffin werden die Gewebe in Blöcke eingegossen und sind nach dem Erkalten gebrauchsfertig zum Schneiden.

#### **2.6.5. Herstellung der Paraffinpräparate**

Die Paraffinblöcke wurden an einem Schlittenmikrotom 6µm dick geschnitten. Die erhaltenen Schnitte wurden zunächst auf einem ca. 20° Celsius kaltem Wasserbad aufgefangen, dann auf einem ca. 45° Celsius heißem Wasserbad gestreckt und danach auf einen Objektträger glatt aufgezogen. Abschließend folgte das Trocknen der Schnittpräparate über Nacht bei ca. 37° bis 45° Celsius in einem Wärmeschrank.

### 2.6.6. Nachweis von Netrin-1 (N 18)

Zum Nachweis von Netrin-1 (N18) wurde das VECTASTAIN ABC KIT, Elite PK-6105, Goat Ig G verwendet. Folgendes Protokoll wurde benutzt:

2 x 5 Min.	Rotihistol
2 x 2 Min.	100 %iges Ethanol
2 x 2 Min.	96 %iges Ethanol
1 x 2 Min.	80 %iges Ethanol
3 x 5 Min.	in TRIS – Puffer waschen
20 Min.	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit Methanol + 3 %igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
3 x 5 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Blockierung unspezifischer Bindungen mit Normal Serum, rabbit, VECTASTAIN in einer Verdünnung 1:25 mit TRIS/ Magermilchpulver 1% im Wärmeschrank bei 37°C
60 Min.	Inkubation mit Netrin- 1 (N 18) in einer Verdünnung 1:25 mit TRIS/Magermilchpulver 1% im Wärmeschrank bei 37°C
2 x 3 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Inkubation mit Anti –Goat IgG, Biotinylated Antibody, VECTASTAIN in einer Verdünnung 1:50 mit TRIS/ Magermilchpulver im Wärmeschrank bei 37°C
2 x 3 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Inkubation des Avidin – Biotin – Komplexes in einer Verdünnung 1:25 mit TRIS – Puffer im Wärmeschrank bei 37°C
2 x 3 Min.	in TRIS – Puffer waschen
3 Min.	Färben mit DAB- Substratlösung
2 x kurz	in A.dest zum Stoppen der Färbung
1 Min.	Gegenfärben mit Mayer`s Hämatoxylin
2 x kurz	Spülen mit A. dest
5 Min.	Bläuen unter Leitungswasser
2 x kurz	Spülen mit A. dest

1 x 1 Min.	80 %iges Ethanol
2 x 1 Min.	96 %iges Ethanol
2 x 1 Min.	100 %iges Ethanol
5 Min.	Xylol

Eindeckung mit Eukitt

Als Negativkontrolle wurde analog zum Primärantikörper normal goat Ig G, sc – 2028, der Firma Santa Cruz Biotechnologie verwendet.

### 2.6.7. Nachweis von DCC

Zum Nachweis von DCC wurde das VECTASTAIN ABC KIT, Elite PK-6200, Universal verwendet. Folgendes Protokoll wurde benutzt:

2 x 5 Min.	Rotihistol
2 x 2 Min.	100 %iges Ethanol
2 x 2 Min.	96 %iges Ethanol
1 x 2 Min.	80 %iges Ethanol
3 x 5 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Vorbehandlung im Wasserbad bei 95°C im TRIS – Puffer
15 Min.	Auskühlen
20 Min.	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit Methanol + 3 %igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
3 x 5 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Blockierung unspezifischer Bindungen mit Normal Serum, horse, VECTASTAIN in einer Verdünnung 1:10 mit TRIS/ Magermilchpulver 2,5 % im Wärmeschränk bei 37°C
60 Min.	Inkubation mit anti – human DCC in einer Verdünnung 1:25 mit TRIS/ Magermilchpulver 2,5 % im Wärmeschränk bei 37°C
2 x 3 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Inkubation mit Made in Horse, Biotinylated Universal Antibody, VECTASTAIN in einer Verdünnung 1:50 mit TRIS/ Magermilch 2,5 % im Wärmeschränk bei 37°C
2 x 3 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Inkubation des Avidin – Biotin – Komplexes in einer Verdünnung 1:25 mit TRIS – Puffer im Wärmeschränk bei 37°C
2 x 3 Min.	in TRIS – Puffer waschen
3 Min.	Färben mit DAB- Substratlösung
2 x kurz	in A.dest zum Stoppen der Färbung
1 Min.	Gegenfärben mit Mayer`s Hämatoxylin
2 x kurz	Spülen mit A. dest

5 Min.	Bläuen unter Leitungswasser
2 x kurz	Spülen mit A. dest
1 x 1 Min.	80 %iges Ethanol
2 x 1 Min.	96 %iges Ethanol
2 x 1 Min.	100 %iges Ethanol
5 Min.	Xylol

Eindeckung mit Eukitt

Als Negativkontrolle wurde analog zum Primärantikörper MOPC 21, Mouse Ig G1, kappa, der Firma SIGMA verwendet.

### 2.6.8. Nachweis von Neogenin

Zum Nachweis von Neogenin wurde das VECTASTAIN ABC KIT, Elite PK-6105, Goat Ig G verwendet. Folgendes Protokoll wurde benutzt:

2 x 5 Min.	Rotihistol
2 x 2 Min.	100 %iges Ethanol
2 x 2 Min.	96 %iges Ethanol
1 x 2 Min.	80 %iges Ethanol
3 x 5 Min.	in TRIS – Puffer waschen
20 Min.	Vorbehandlung in Mikrowelle bei 800 Watt im TRIS - Puffer
15 Min.	Auskühlen
20 Min.	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit Methanol + 3 %igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
3 x 5 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Blockierung unspezifischer Bindungen mit Normal Serum, rabbit, VECTASTAIN in einer Verdünnung 1:10 mit TRIS/ Magermilchpulver 1 % im Wärmeschrank bei 37°C
60 Min.	Inkubation mit neogenin ( C-20) in einer Verdünnung 1:25 mit TRIS/ Magermilchpulver 1% im Wärmeschrank bei 37°C
2 x 3 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Inkubation mit Anti – Goat IgG, Biotinylated Antibody, VECTASTAIN in einer Verdünnung 1:50 mit TRIS/ Magermilch 1 % im Wärmeschrank bei 37°C
2 x 3 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Inkubation des Avidin – Biotin – Komplexes in eine Verdünnung 1:25 mit TRIS – Puffer im Wärmeschrank bei 37°C
2 x 3 Min.	in TRIS – Puffer waschen
3 Min.	Färben mit DAB- Substratlösung
2 x kurz	in A.dest zum Stoppen der Färbung
1 Min.	Gegenfärben mit Mayer`s Hämatoxylin
2 x kurz	Spülen mit A. dest

5 Min.	Bläuen unter Leitungswasser
2 x kurz	Spülen mit A. dest
1 x 1 Min.	80 %iges Ethanol
2 x 1 Min.	96 %iges Ethanol
2 x 1 Min.	100 %iges Ethanol
5 Min.	Xylol

Eindeckung mit Eukitt

Als Negativkontrolle wurde analog zum Primärantikörper normal goat Ig G, sc – 2028, der Firma Santa Cruz Biotechnology erwendet.

### 2.6.9. Nachweis von UNC5H3

Zum Nachweis von UNC5H3 wurde das VECTASTAIN ABC KIT, Elite PK-6200, Universal verwendet. Folgendes Protokoll wurde benutzt:

2 x 5 Min.	Rotihistol
2 x 2 Min.	100 %iges Ethanol
2 x 2 Min.	96 % Ethanol
1 x 2 Min.	80 % Ethanol
3 x 5 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Vorbehandlung im Wasserbad bei 95°C im Citrat – Puffer
15 Min.	Auskühlen
20 Min.	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit Methanol + 3 %igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
3 x 5 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Blockierung unspezifischer Bindungen mit Normal Serum, horse, VECTASTAIN in einer Verdünnung 1:10 mit TRIS/ Magermilchpulver 1 % im Wärmeschrank bei 37°C
60 Min.	Inkubation mit anti – h UNC5H3 in einer Verdünnung 1:50 mit TRIS/ Magermilchpulver 1 % im Wärmeschrank bei 37°C
2 x 3 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Inkubation mit Made in Horse, Biotinylated Universal Antibody, VECTASTAIN in einer Verdünnung 1:50 mit TRIS/ Magermilch 1 % im Wärmeschrank bei 37°C
2 x 3 Min.	in TRIS – Puffer waschen
30 Min.	Inkubation des Avidin – Biotin – Komplexes in einer Verdünnung 1:25 mit TRIS – Puffer im Wärmeschrank bei 37°C
2 x 3 Min.	in TRIS – Puffer waschen
2 Min.	Färben mit DAB- Substratlösung
2 x kurz	in A.dest zum Stoppen der Färbung

1 Min.	Gegenfärben mit Mayer`s Hämatoxylin
2 x kurz	Spülen mit A. dest
5 Min.	Bläuen unter Leitungswasser
2 x kurz	Spülen mit A. dest
1 x 1 Min.	80 %iges Ethanol
2 x 1 Min.	96 %iges Ethanol
2 x 1 Min.	100 %iges Ethanol
5 Min.	Xylol
Eindeckung mit Eukitt	

Als Negativkontrolle wurde analog zum Primärantikörper MOPC 141, Mouse Ig kappa, der Firma SIGMA verwendet.

## **2.7. Hämatoxylin – Eosin – Übersichtsfärbung**

Um die pathologischen Veränderungen der Gewebe beurteilen zu können, wurde von jedem Tumor ein Präparat in einer Hämatoxylin-Eosin Färbung angefertigt.

Die Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung ist eine Sukzedanfärbung, d.h. es wird nacheinander gefärbt. Sie basiert auf dem Prinzip der Durchtränkung und der elektrostatischen Absorption. Hämalaun wird üblicherweise progressiv gefärbt. D.h., daß der Färbegrad während der Färbung kontrolliert, und die Färbung bei gewünschtem Farbergebnis abgebrochen wird. Hämalaun ist positiv geladen und bindet sich an die sauren Bestandteile der DNS, hierdurch wird eine Kernfärbung erzielt. Eosin wird regressiv gefärbt, es wird also erst überfärbt und anschließend differenziert. Eosin ist negativ geladen und bindet sich an die positiven Gewebsbestandteile (Eiweiße), hierdurch wird eine Plasmafärbung erzielt.

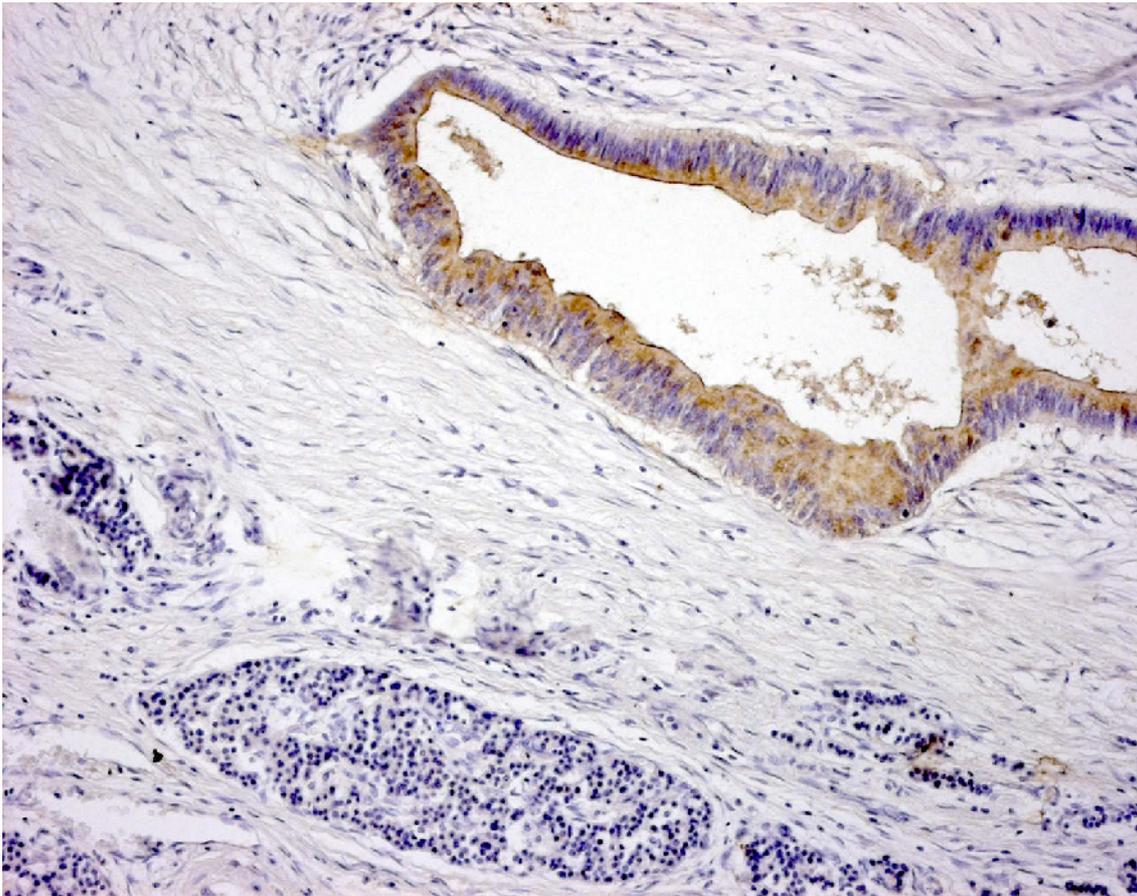
Zur H.E.-Übersichtsfärbung wurden die Paraffinschnitte zum Entparaffinieren zunächst für 2 mal 5 Minuten in Xylol eingebracht. Anschließend wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Dazu wurde 100 %iges, 96 %iges und 80 %iges Ethanol für jeweils 2 mal 2 Minuten verwendet. Danach wurden die Objektträger für 1 Minute in destilliertem Wasser gewaschen, um hiernach 1 Minute mit Mayer's Hämatoxylin gefärbt zu werden. Es folgte das Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser und anschließend das ca. 30 sekundige Färben in Eosin, wiederum von Spülen unter fließendem Leitungswasser gefolgt. Dann wurden die Schnitte dehydriert, zunächst mit 80%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol für jeweils 2 mal 2 Minuten und abschließend mit Xylol für 2 mal 5 Minuten. Das Eindecken und Konservieren der Präparate erfolgte mit Eukitt.

## **2.8. Histologische Auswertung und Quantifizierung der Färbungen**

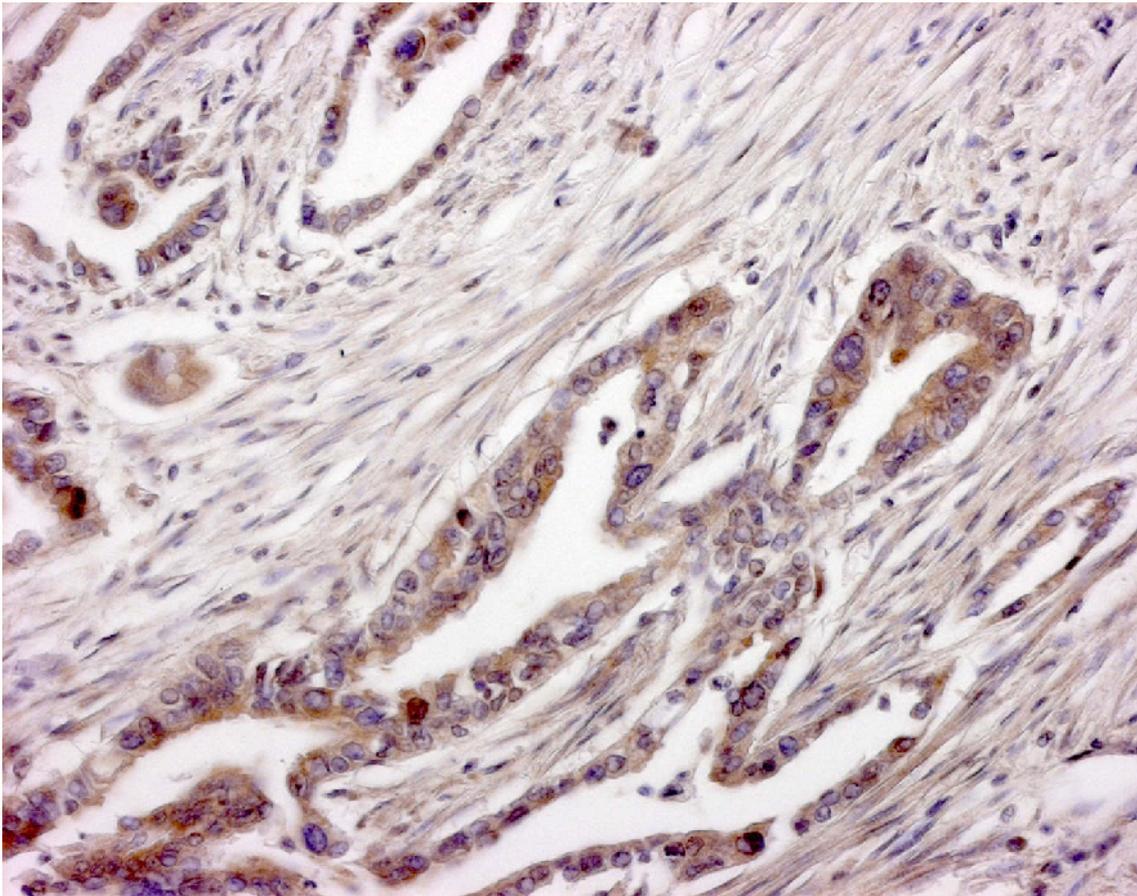
Alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden von zwei unabhängigen Pathologen beurteilt (U.R., S.P.). Dazu wurde ein Lichtmikroskop Axioskop 40 der Firma Zeiss benutzt. Die fotografische Dokumentation der Färbungen erfolgte mit einer dazugehörigen Digitalkamera.

Die Intensität der Färbungen wurde nach einem Grading eingestuft. Dabei steht 0 für keine Färbung, 1+ für schwach cytoplasmatisch gefärbt, 2+ für mäßig cytoplasmatisch gefärbt und 3+ für stark cytoplasmatisch gefärbt.

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen exemplarisch mäßig immunhistochemischpositive Färbungen von Netrin-1 und UNC5H3.



**Abb. 1** Immunhistochemie: Expression von Netrin-1 in den apicalen Bereichen der Zellen von duktalem Adenokarzinom des Pankreas, Färbung nach Avidin-Biotin Methode, Vergrößerung 1 : 100



**Abb. 2** Immunhistochemie: Expression von UNC5H3 in den apikalen Bereichen der Zellen von duktalem Adenokarzinomen des Pankreas, Färbung nach Avidin-Biotin Methode, Vergrößerung 1 : 100

## **2.9. Patienten**

In diese Studie wurden 82 Patienten mit resektablem Adenokarzinom des Pankreas, die sich im Zeitraum von April 1992 bis November 2002 im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf einer radikalen Pankreatikoduodenektomie unterzogen, eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden Patienten mit adjuvanter Chemotherapie bzw. Radiochemotherapie, Patienten mit R2-Resektion und Patienten die postoperativ innerhalb der ersten 90 Tage verstorben sind. Alle Patientendaten einschließlich Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Fernmetastasenstatus, Tumordifferenzierung, perineurale Invasion und Resektionsstatus wurden aus Datenbanken der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Thoraxchirurgie bzw. dem Institut für Pathologie der Universität Hamburg Eppendorf erhalten. Die klinischen Follow-up Daten wurden ebenfalls diesen Datenbanken entnommen, bzw. durch Kontakt von Patienten und Angehörigen und dem Hamburger Krebsregister vervollständigt. 7 Patienten konnten aufgrund fehlender Daten eines Tumorrezidives, nicht in die Berechnung der tumorrezidivfreien Zeit einbezogen werden.

## **2.10. Statistische Analyse und immunhistochemische Auswertung**

Die für die vorliegende Studie erhobenen Daten wurden unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel 2000-Programm erfasst. Alle statistischen Berechnungen wurden dann mit dem Statistical Package for Social Sciences (SPSS), Version 13 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Für alle Patienten wurde die Überlebenszeit vom Operationszeitpunkt bis zum Todesdatum errechnet. Bei Patienten mit Lokalrezidiven oder aufgetretenen Fernmetastasen wurde zusätzlich die rezidivfreie Zeit angegeben.

Die Schätzungen der Überlebensraten aus den beobachteten Überlebenszeiten und die dazugehörige graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode [66] mit einem Konfidenzintervall von 95% (CI95%,  $p=0,05$ ). Zum Vergleich der Überlebenskurven wurde der Log Rank-Test verwendet. Für die Berechnung signifikanter Zusammenhänge zwischen kategorischen Variablen wurde der Fisher exact Test mit seinen Kreuztabellen und Chi-Quadrat – Unabhängigkeitstest

verwendet. Kontinuierliche Variablen wurden mit dem nicht parametrischen Whitney U Test bewertet. Für alle Testverfahren galt jeweils die exakte zweiseitige Signifikanz. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als signifikant definiert. Die Ergebnisse zu den einzelnen untersuchten Proteinen Netrin-1 und deren Rezeptoren DCC, Neogenin und UNC5H3 werden in standardisierter Vorgehensweise vorgestellt.

Für jeden Marker wurden die folgenden Parameter untersucht:

- die Prognoserelevanz des jeweiligen Markers in Bezug zum Gesamtüberleben bzw. zum rezidivfreien Überleben
- die Assoziation der Expressionsstärke zum Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Fernmetastasenstatus, histologischen Grad und Resektionsstatus
- die Assoziation der Expressionsstärke zur perineuralen Invasion

Aufgrund nur leichter, statistisch unbedeutender Differenzen der Überlebensdaten zwischen Patienten mit negativer bzw. leicht positiver Expressionsstärke der verschiedenen Marker, haben wir diese zu einer Gruppe zusammengefasst. Das Gleiche gilt für Patienten deren Tumoren mittlere bzw. starke Expression aufwiesen. Sie wurden ebenfalls zu einer Gruppe zusammengefasst.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Patientendaten und pathologisch-anatomische Befunde**

Insgesamt erfüllten 82 Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas die Kriterien zum Einschluss in diese Arbeit. Ausgeschlossen wurden Patienten mit adjuvanter Radiochemo- oder Chemotherapie, Patienten mit R2-Resektion und Patienten, die innerhalb von 90 Tagen nach der Operation verstorben sind. Das Patientenkollektiv setzt sich aus 35(42.7%) Frauen und 47(57,3%) Männern zusammen, deren durchschnittliches Alter 62+10.9 Jahre (33-83 Jahre) betrug. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 15+19.9 Monate (4-108 Monate). Für das Tumorstadium wurde bei einem Patienten ein Karzinoma in situ(1.2%), bei 5(6.1%) Patienten ein pT1, bei 26(31.7%) Patienten ein pT2, bei 47(57.3%) Patienten ein pT3 und bei 3(3.7%) Patienten ein pT4 diagnostiziert. Lymphknotenmetastasen waren bei 49 Patienten (59.8%) positiv, Fernmetastasen wurden bei 3 Patienten (3.7%) diagnostiziert. Bei der Tumordifferenzierung betrug die Anzahl der gut bzw. mässig differenzierten Tumoren 31(47.8%), die der wenig differenzierten 51(62.2%). Des Weiteren wiesen 56 der Patienten (68.3%) eine perineurale Invasion auf. Eine Angioinvasion wurde bei 2 Patienten diagnostiziert.

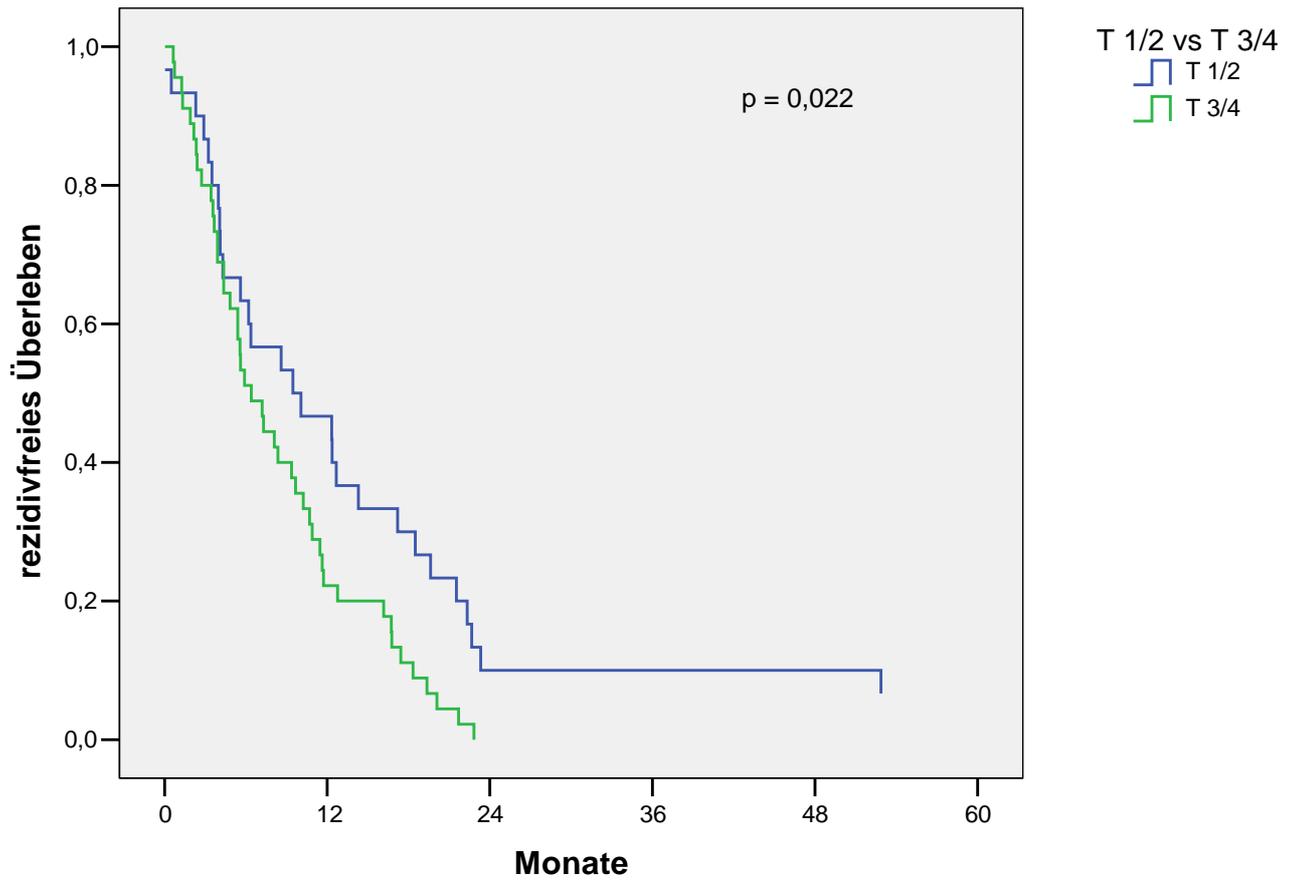
#### **3.2. Pathologisch-anatomische Befunde und Prognose**

In den Ergebnissen hat sich gezeigt, dass das pT-Stadium, das pN-Stadium und der histologische Differenzierungsgrad eng mit der Prognose assoziiert sind.

Bei der Zeit des rezidivfreien Überlebens wiesen die Variablen Lymphknotenstatus, Tumorstadium und Differenzierungsgrad signifikanten Einfluss auf. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (n=31) hatten eine mittlere rezidivfreie Überlebenszeit von 10.0 Monaten (95%CI, 3-17), während Patienten mit Lymphknotenmetastasen (n=44) 6.0 Monate (95%CI, 4-8; p=.015) rezidivfrei überlebten (Abb.4). Für das Tumorstadium konnte zwischen den zwei Gruppen der Patienten mit pT1 und pT2 (n= 30) versus pT3 und pT4 (n=45) eine Signifikanz festgestellt werden. Die Gruppe mit pT1 und pT2

Tumoren wies ein mittleres rezidivfreies Überleben von 10.0 Monaten (95%CI, 2-18) auf, die Gruppe mit pT3 und pT4 Tumoren eines von 6.0 Monaten (95%CI, 4-9;  $p=.022$ ) (Abb.3). Beim Differenzierungsgrad wiesen Patienten mit G1 und G2 Tumoren ( $n=31$ ) eine mittlere rezidivfreie Zeit von 12 Monaten auf (95%CI, 4-20). Diejenigen mit G3-Tumoren ( $n=51$ ) überlebten im Mittel 6 Monate (95%CI, 3-9;  $p=0,049$ ) rezidivfrei. Bei der Gesamtüberlebenszeit zeigte ebenfalls der Lymphknotenstatus und der histologische Differenzierungsgrad signifikanten Einfluss. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen ( $n=33$ ) hatten eine mittlere Gesamtüberlebenszeit von 21.0 Monaten (95%CI, 13-29), Patienten mit Lymphknotenmetastasen ( $n=49$ ) eine von 14.0 Monaten (95%CI, 9-19;  $p=.009$ ) (Abb.5). Das mittlere Gesamtüberleben für Patienten mit gut bzw. mässig differenzierten Tumoren ( $n=31$ ) betrug 23.0 Monate (95%CI, 17-29), das deren mit schlecht differenzierten Tumoren ( $n= 51$ ) 13.0 Monate (95%CI, 10-16;  $p=.021$ ) (Abb.6). Für die restlichen pathologisch-anatomischen Befunde, sowie für Alter und Geschlecht konnte keine Signifikanz gefunden werden (Tabelle 6).

### pT - Stadium



**Abb.3** Einfluss des Tumorstadiums auf das rezidivfreie Überleben

### pN - Stadium

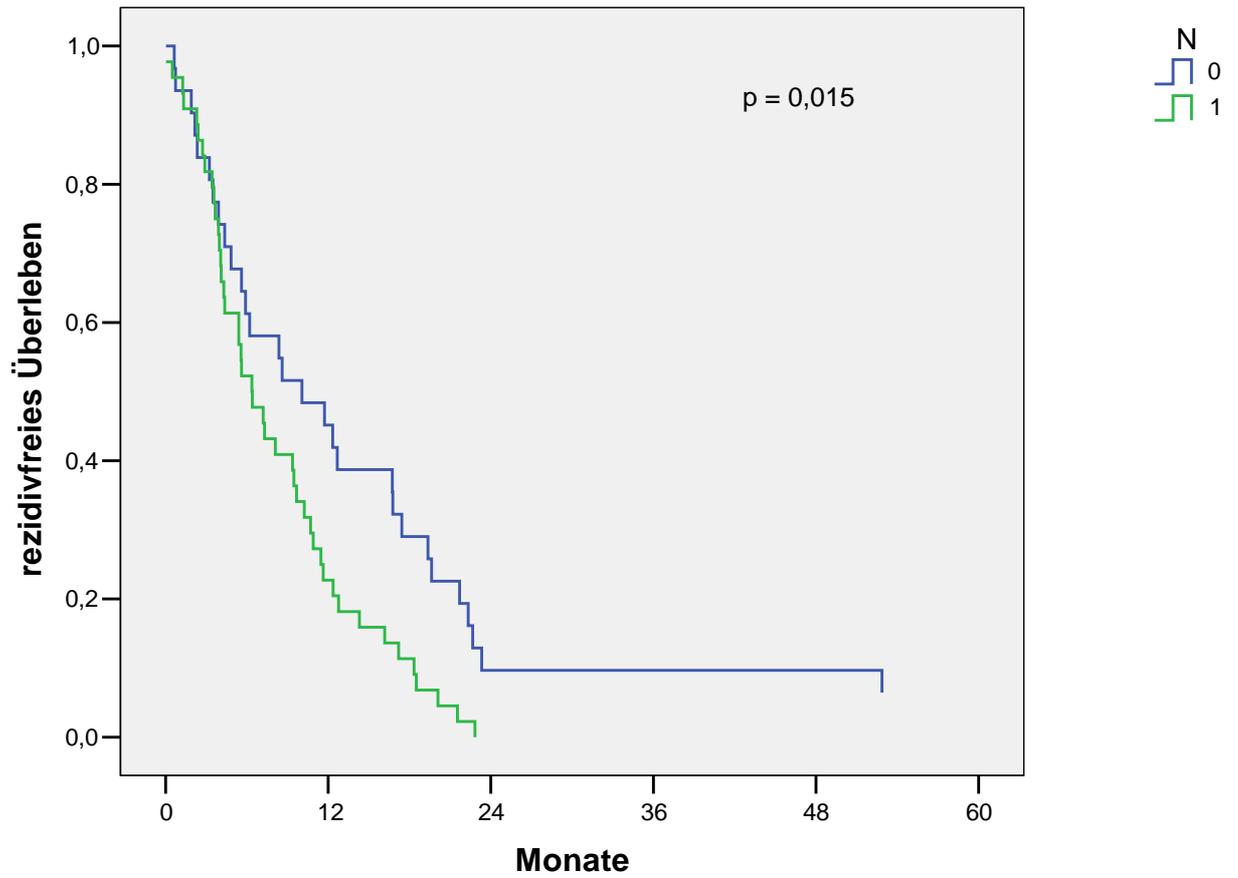


Abb. 4 Einfluss des Nodalstatus auf das rezidivfreie Überleben

### pN - Stadium

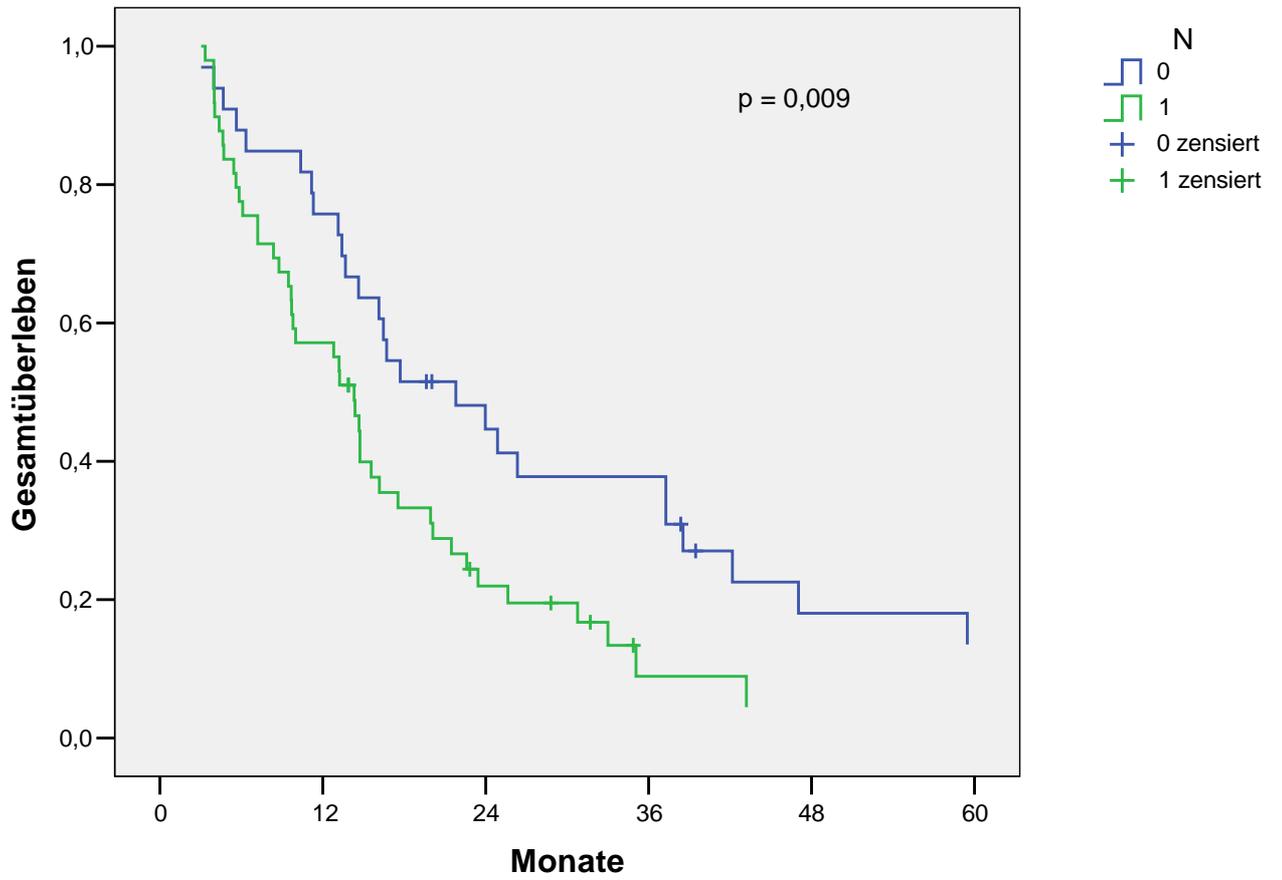


Abb. 5 Einfluss des Nodalstatus auf das Gesamtüberleben

### G - Status

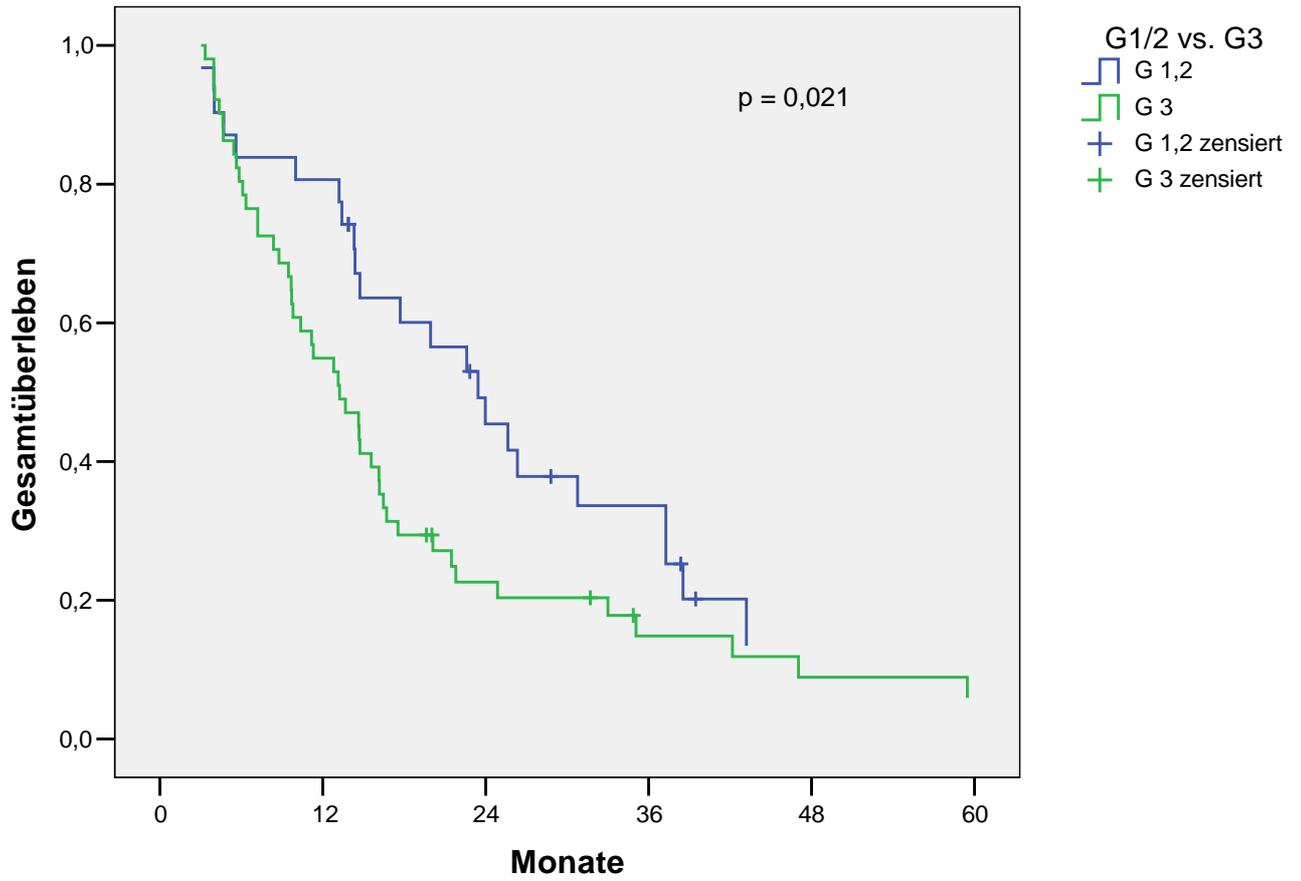


Abb. 6 Einfluss des Differenzierungsgrades (G-Status) auf das Gesamtüberleben

In Tabelle 6 werden die Patientencharakteristika in Bezug zum Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben dargestellt. Dabei konnte für das T-Stadium, den N-Status und den G-Status eine Signifikanz gefunden werden.

**Tabelle 6 Patientencharakteristika**

	Patienten		Gesamt- überleben	Rezidivfreies Überleben
	(n=82)	%	p -Wert	p – Wert
<b>Alter in Jahren</b>			0,585	0,252
Median	62,0			
Standard-abweichung	10.9			
<b>Geschlecht</b>			0,107	0,232
weiblich	35	42,7		
männlich	47	57,3		
<b>T - Stadium</b>			0,445	<b>0,022</b>
pT1/pT2	32	39,0		
pT3/pT4	50	61,0		
<b>N - Status</b>			<b>0,009</b>	<b>0,015</b>
pN0	33	40,2		
pN1	49	59,8		
<b>M - Status</b>			0,072	0,121
pM0	79	96,3		
pM1	3	3,7		
<b>G - Status</b>			<b>0,021</b>	<b>0,049</b>
G1/G2	31	37,8		

	<b>Patienten</b>		<b>Gesamt- überleben</b>	<b>Rezidivfreies Überleben</b>
	<b>(n=82)</b>	<b>%</b>	<b>p -Wert</b>	<b>p – Wert</b>
G3	51	68,3		
<b>R - Status</b>			0,401	0,128
R0	66	80,5		
R1	16	19,5		
<b>Neurale Invasion</b>			0,774	0,201
ja	56	68,3		
nein	26	31,7		

Darstellung der demographischen Daten und pathologisch-anatomische Ergebnisse und der Einfluss auf das Überleben.

### **3.3. Immunhistochemische Ergebnisse**

#### **3.3.1. Netrin - 1**

Patienten mit keiner bzw. schwacher Netrinexpression wiesen ein medianes Gesamtüberleben von 16,0 Monaten (95%CI, 13-19) auf, wobei Patienten mit mäßiger bzw. starker Expression durchschnittlich 9,0 Monate (95%CI, 3-15) überlebten ( $p=0,312$ )(Abb.7).

Für das rezidivfreie Überleben zeigte sich eine ähnliche Verteilung. Patienten mit keiner bzw. schwacher Netrinexpression hatten eine mediane rezidivfreie Zeit von 10,0 Monaten(95%CI, 7-13), Patienten mit mäßiger bzw. starker Expression hingegen eine von 4,0 Monaten(95%CI, 3-5) ( $p=0,003$ )(Abb.8).

Der Vergleich der Netrin-1 Expression mit den histologischen Parametern Tumorstadium, Nodalstatus und Fernmetastasenstatus stellte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang dar. Signifikante Unterschiede konnten jedoch beim Differenzierungsgrad gefunden werden. Bei der Untergruppe der schlecht differenzierten Tumoren wiesen mäßige bzw. starke Netrin-1 Expressionen auf eine signifikant geringere Gesamtüberlebenszeit hin. Somit hatten diese Patienten eine mediane Gesamtüberlebenszeit von 6,0 Monaten(95%CI, 2-10), Patienten mit keiner bzw. schwacher Netrinexpression hingegen eine von 9,0 Monaten(95%CI, 2-18;  $p=0,001$ )(Abb.9u.10).

Für den Resektionsstatus bzw. die perineurale Invasion ergaben unsere immunhistochemischen Untersuchungen keinen relevanten Zusammenhang (Tabelle 7). Die Multivariantenanalyse bestätigte den stark unabhängigen prognostischen Einfluss von mäßigen bzw. starken Netrin-1-Expressionen bei Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren. Das relative Risiko beträgt 6,9.

### Netrin - 1

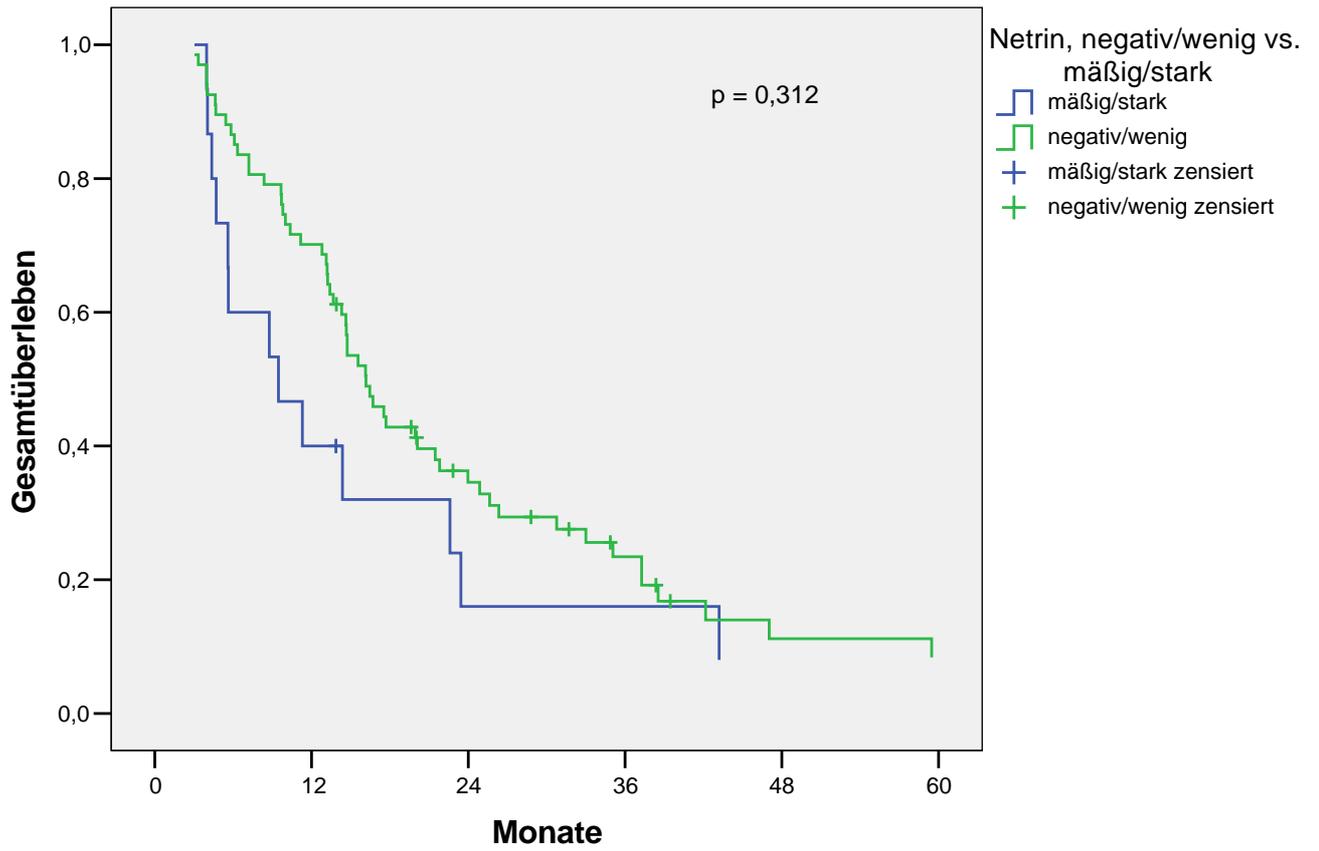
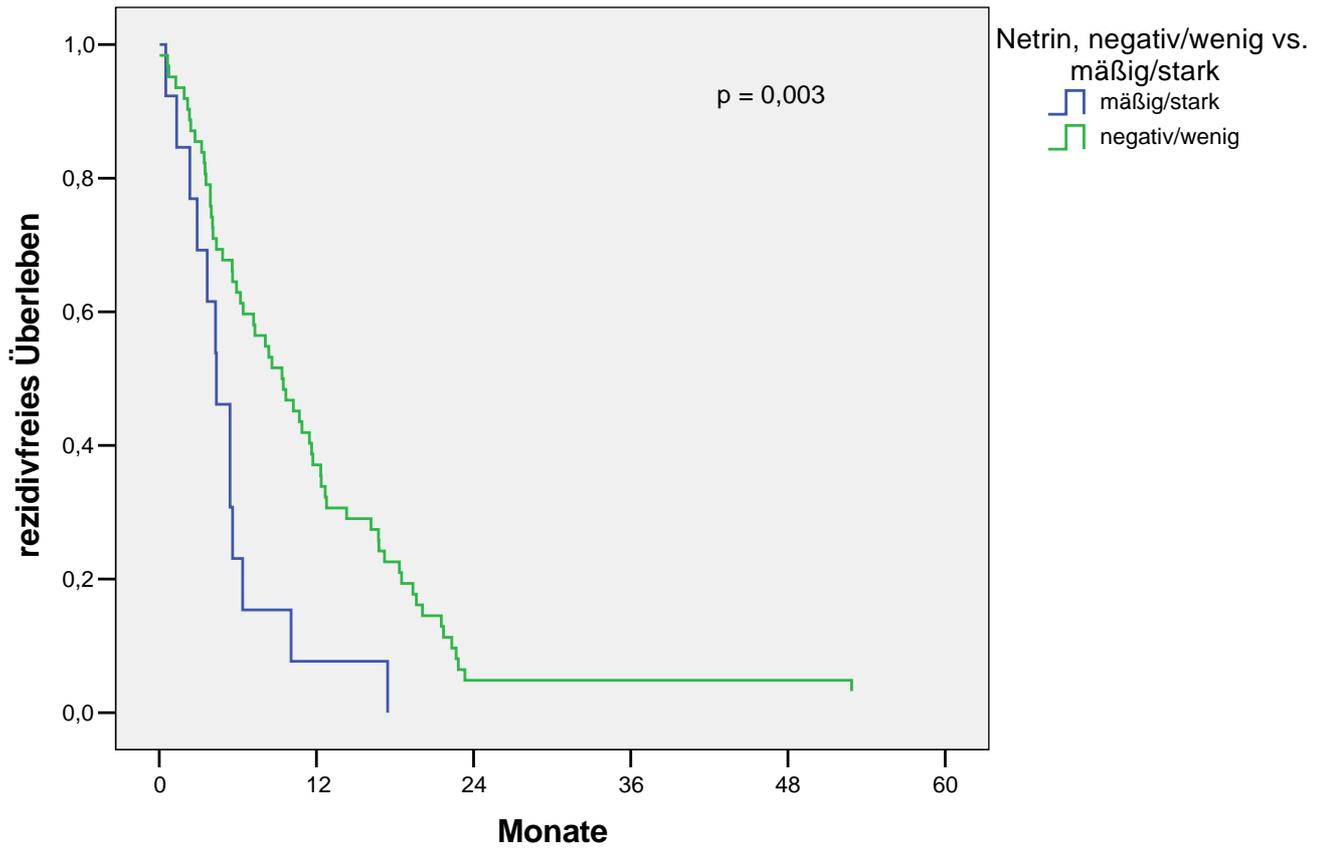


Abb.7 Einfluss der Netrin-1-Expression auf das Gesamtüberleben

### Netrin -1



**Abb.8** Einfluss der Netrin-1-Expression auf das rezidivfreie Überleben

### G 1/2 - Tumoren

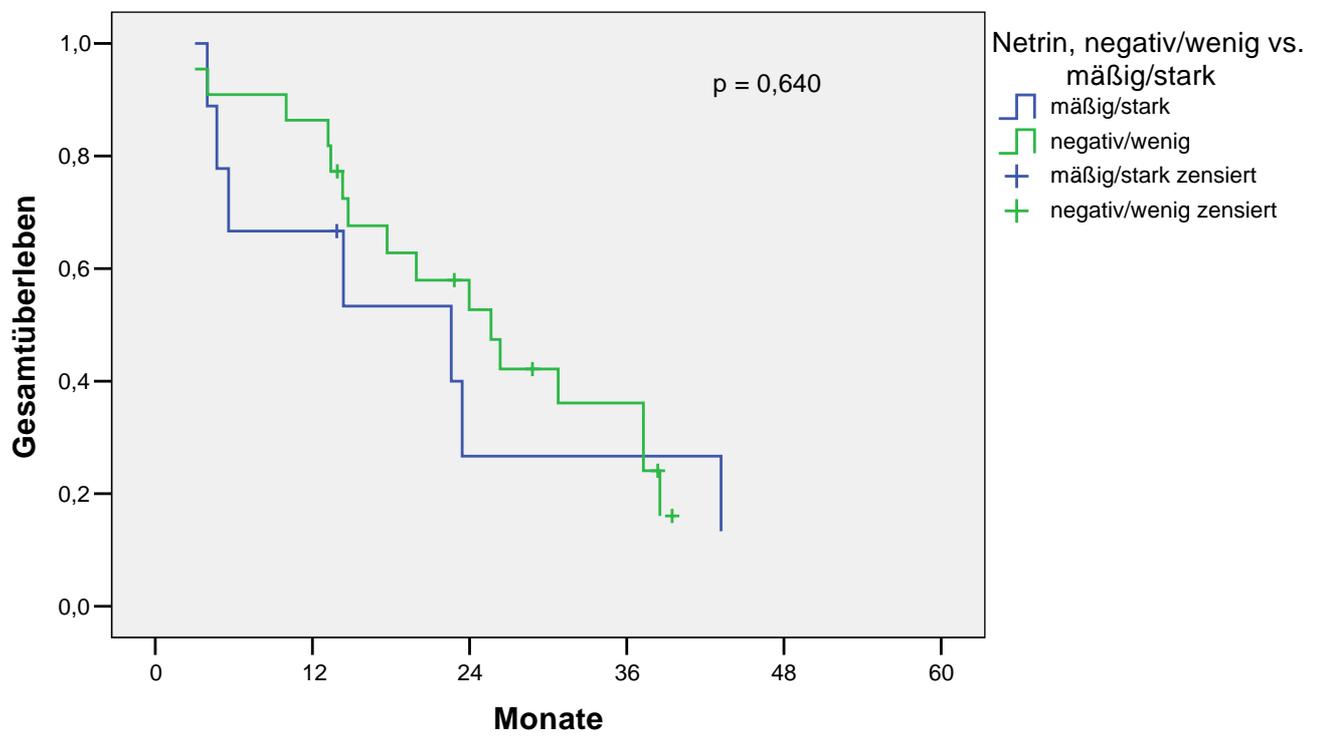


Abb.9) Einfluss der Netrin-1-Expression auf G1/2 Tumoren

### G 3 - Tumoren

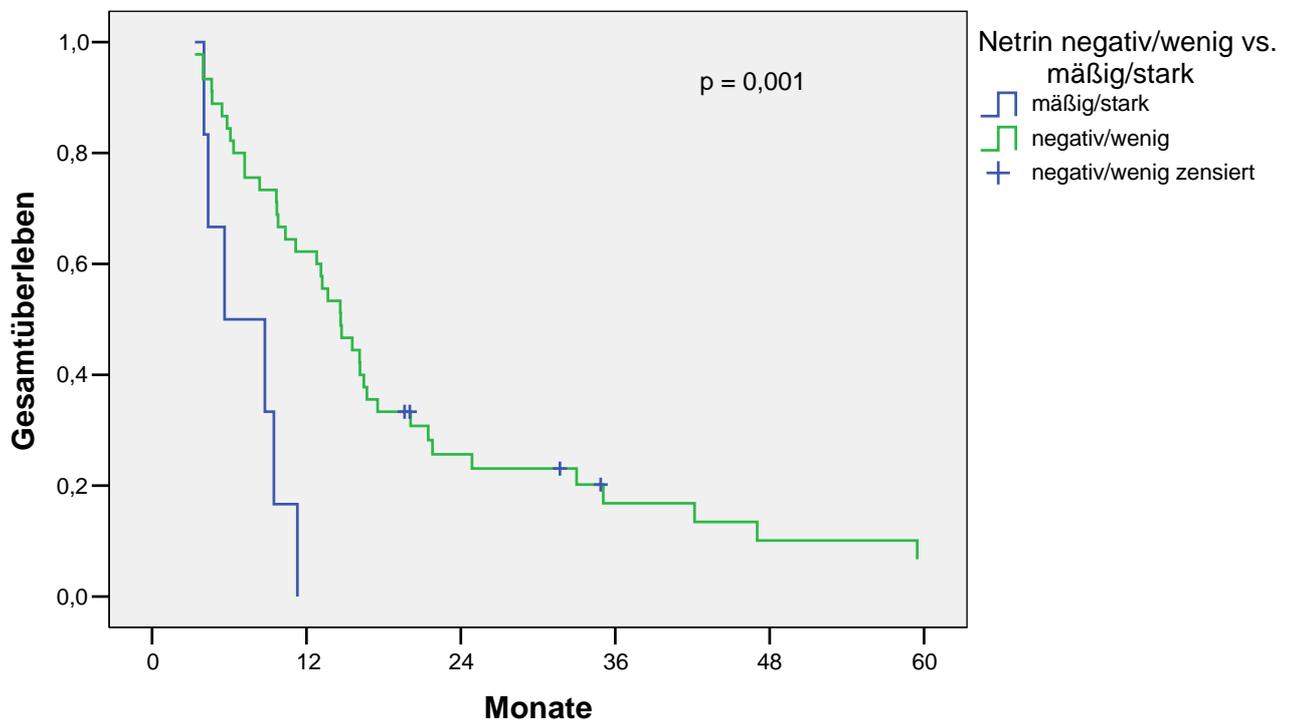


Abb.10) Einfluss der Netrin-1-Expression auf G3 Tumoren

Tabelle 7 zeigt Die Patientencharakteristika in Bezug zur Netrin – 1 Expression bei dem von uns untersuchten Patientenkollektiv. Dabei konnte eine Signifikanz beim histologischen Grad gezeigt werden.

**Tabelle 7: Netrin – 1 Expression**

		n gesamt	negativ/ schwach	in %	mäßig/ stark	in %	p-Wert
<b>T</b>	<b>1/2</b>	32	26	81,3	6	18,7	0,576
	<b>3/4</b>	50	41	82,0	9	18,0	
<b>N</b>	<b>0</b>	33	30	90,9	3	9,1	0,067
	<b>1</b>	49	37	75,5	12	24,5	
<b>M</b>	<b>0</b>	79	65	82,3	4	13,7	0,459
	<b>1</b>	3	2	66,7	1	33,3	
<b>G</b>	<b>1/2</b>	31	22	71,0	9	29,0	0,049
	<b>3</b>	51	45	88,2	6	11,8	
<b>R</b>	<b>0</b>	66	54	81,8	12	18,2	0,603
	<b>1</b>	16	13	81,3	3	18,7	
<b>Neurale Invasion</b>	<b>ja</b>	56	44	78,6	12	21,4	0,224
	<b>nein</b>	26	23	88,5	3	11,5	

Darstellung der Beziehung der Expressionsstärke von Netrin-1 zum pT/pN/pM – Stadium, dem histologischem Grad, dem Resektionsstatus und der neuralen Invasion

Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass hohe Netrin-1 Expressionen in duktalem Adenokarzinomen des Pankreas eine ungünstigere Prognose auf das Gesamtüberleben als auch auf das rezidivfreie Überleben aufweisen, und insbesondere ein niedriger Differenzierungsgrad die Prognose weiter verschlechtert.

### 3.3.2. DCC

Eine signifikante Prognoserelevanz für DCC konnte weder für das Gesamtüberleben ( $p=0,783$ ) noch für das rezidivfreie Überleben ( $p=0,724$ ) festgestellt werden.

Auch der Vergleich zwischen der DCC Expression und dem Tumorstadium, dem Nodalstatus, dem Fernmetastasenstatus, dem histologischen Differenzierungsgrad, dem Resektionstatus und der perineuralen Invasion zeigte keinen signifikanten Zusammenhang (Tabelle 8).

**Tabelle 8: DCC Expression**

		n gesamt	negativ/ schwach	in %	mäßig/ stark	in %	p-Wert
<b>T</b>	<b>1/2</b>	32	29	90,6	3	9,4	0,435
	<b>3/4</b>	50	47	94,0	3	6,0	
<b>N</b>	<b>0</b>	33	30	90,9	3	9,1	0,461
	<b>1</b>	49	46	93,9	3	6,1	
<b>M</b>	<b>0</b>	79	73	92,4	6	7,6	0,794
	<b>1</b>	3	3	100	0	-	
<b>G</b>	<b>1/2</b>	31	29	93,5	2	6,5	0,591
	<b>3</b>	51	47	92,2	4	7,8	
<b>R</b>	<b>0</b>	66	60	90,9	6	9,1	0,259
	<b>1</b>	16	16	100	0	-	
<b>Neurale Invasion</b>	<b>ja</b>	56	52	92,9	4	7,1	0,624
	<b>nein</b>	26	24	92,3	2	7,7	

Darstellung der Beziehung der Expressionsstärke von DCC zum pT/pN/pM – Stadium, dem histologischem Grad, dem Resektionsstatus und der neuralen Invasion

Dementsprechend ist aus unseren Ergebnissen zu schlussfolgern, dass der Rezeptor DCC keinen prognostischen Marker bei duktalem Adenokarzinom des Pankreas darstellt.

### 3.3.3. Neogenin

Auch bei dem Rezeptor Neogenin konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke und dem Gesamtüberleben ( $p=0,561$ ) bzw. dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,560$ ) gezeigt werden.

Der Vergleich zwischen der Neogenin Expression und dem Tumorstadium, dem Nodalstatus, dem Fernmetastasenstatus, dem histologischen Differenzierungsgrad, dem Resektionstatus und der perineuralen Invasion zeigte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Zusammenhang (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Neogenin Expression**

		<b>n gesamt</b>	<b>negativ/ schwach</b>	<b>in %</b>	<b>mäßig/ stark</b>	<b>in %</b>	<b>p-Wert</b>
<b>T</b>	<b>1/2</b>	32	30	93,8	2	6,2	0,652
	<b>3/4</b>	50	47	94,0	3	6,0	
<b>N</b>	<b>0</b>	33	30	90,9	3	9,1	0,317
	<b>1</b>	49	47	95,9	2	4,1	
<b>M</b>	<b>0</b>	79	74	93,7	5	6,3	0,826
		3	3	100	0	-	
<b>G</b>	<b>1/2</b>	31	27	87,1	4	12,9	0,065
	<b>3</b>	51	50	98,0	1	2,0	
<b>R</b>	<b>0</b>	66	61	92,4	5	7,6	0,328
	<b>1</b>	16	16	100	0	-	
<b>Neurale Invasion</b>	<b>ja</b>	56	52	92,9	4	7,1	0,490
	<b>nein</b>	26	25	96,2	1	3,8	

Darstellung der Beziehung der Expressionsstärke von Neogenin zum pT/pN/pM – Stadium, dem histologischem Grad, dem Resektionsstatus und der neuralen Invasion

Dementsprechend kann auch hier gesagt werden, dass der Rezeptor Neogenin keinen prognostischen Marker bei duktalem Adenokarzinom des Pankreas darstellt.

### 3.3.4. UNC5H3

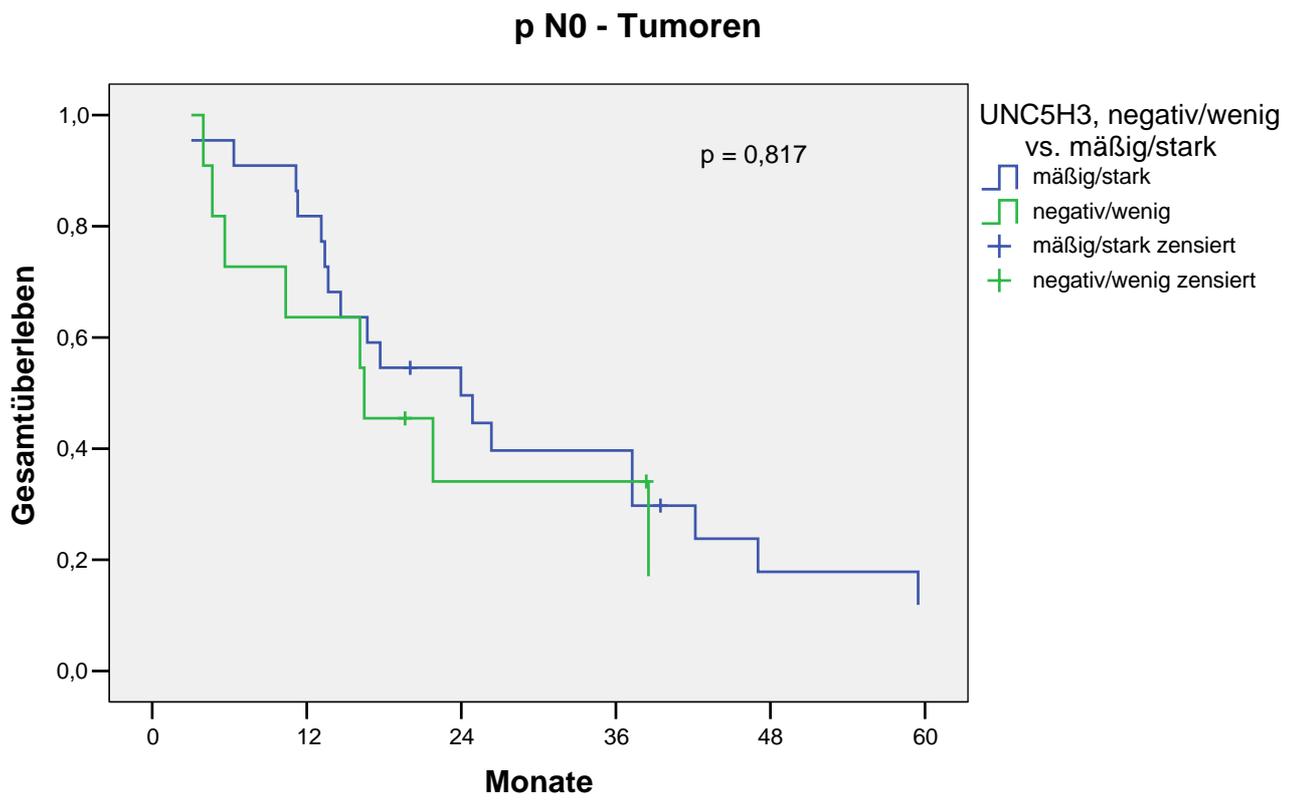
Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von UNC5H3 und dem Gesamtüberleben ( $p=0,263$ ) bzw. dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,540$ ) nachgewiesen werden.

Der Vergleich der UNC5H3-Expression mit dem histologischen Phänotyp ergab einen Zusammenhang mit dem Tumorstadium ( $p= 0,006$ ). Dabei nahm die Expressionsstärke von UNC5H3 mit zunehmendem Tumorstadium ab (Tabelle 10).

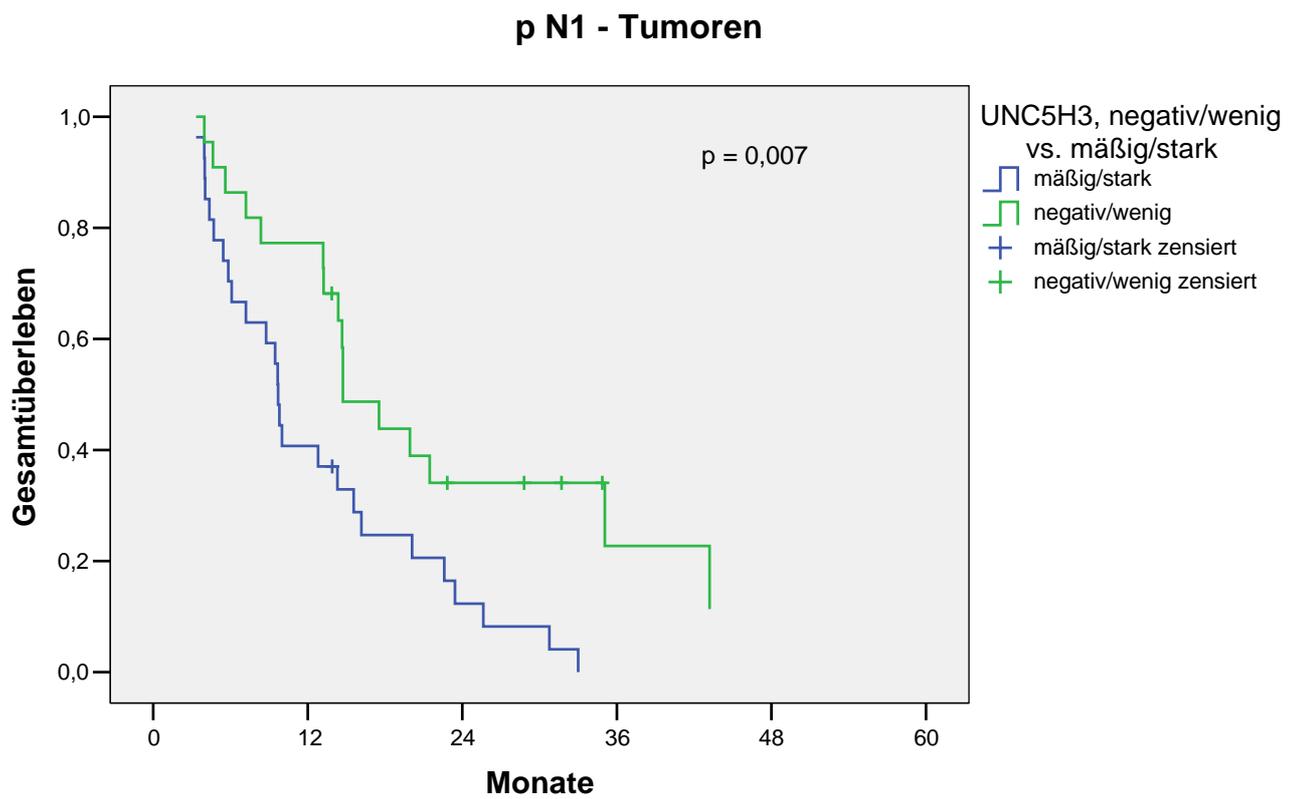
Für die anderen Parameter, wie dem Nodalstatus, dem Fernmetastasenstatus, dem histologischen Differenzierungsgrad, dem Resektionsstatus und der neuralen Invasion ergab der Vergleich keinen signifikanten Zusammenhang. (Tabelle 10)

In einer Untergruppe bei Patienten mit positivem Lymphknotenstatus konnte gezeigt werden, dass keine bzw. schwache UNC5H3-Expressionen mit einem längeren Gesamtüberleben verbunden waren. Diese Patienten hatten eine mediane Gesamtüberlebenszeit von 14,0 Monaten(95%CI, 11-19), wobei Patienten mit Lymphknotenmetastasen und mäßigen bzw. hohen UNC5H3-Expressionen durchschnittlich 9,0 Monate(95CI, 9-10;  $p=0,007$ ) überlebten (Abb.11u.12).

In der Multivariantenanalyse konnten mäßige bzw. starke UNC5H3-Expressionen als ein unabhängiger Prognosefaktor, mit signifikantem Einfluss auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit positivem Lymphknotenstatus, bestätigt werden. Das relative Risiko beträgt 2,73.



**Abb.11)** Einfluss der UNC5H3-Expression auf pN0 – Tumoren



**Abb.12)** Einfluss der UNC5H3-Expression auf pN1 – Tumoren

Tabelle 10 zeigt die Patientencharakteristika in Bezug zur UNC5H3 Expression bei dem von uns untersuchten Patientenkollektiv. Dabei konnte eine Signifikanz beim T-Stadium gezeigt werden.

**Tabelle 10: UNC5H3 Expression**

		N gesamt	Negativ/ schwach	in %	Mäßig/ stark	in %	p-Wert
<b>T</b>	<b>1/2</b>	32	7	21,9	25	78,1	0,006
	<b>3/4</b>	50	26	52,0	24	48,0	
<b>N</b>	<b>0</b>	33	11	33,3	22	66,7	0,207
	<b>1</b>	49	22	44,9	27	55,1	
<b>M</b>	<b>0</b>	79	33	41,8	46	58,2	0,208
	<b>1</b>	3	0	-	3	100	
<b>G</b>	<b>1/2</b>	31	12	38,7	19	61,3	0,506
		51	21	41,2	30	59,8	
<b>R</b>	<b>0</b>	66	27	40,9	39	59,1	0,518
	<b>1</b>	16	6	37,5	10	62,5	
<b>Neurale Invasion</b>	<b>ja</b>	56	22	39,3	34	60,7	0,491
	<b>nein</b>	26	11	42,3	15	57,7	

Darstellung der Beziehung der Expressionsstärke von UNC5H3 zum pT/pN/pM – Stadium, dem histologischen Grad, dem Resektionsstatus und der neuralen Invasion

Schlussfolgernd kann nach unseren Ergebnissen gesagt werden, dass stärkere Expressionen von dem Rezeptor UNC5H3 eher für ein niedrigeres Tumorstadium sprechen, als schwache oder keine Expressionen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei positivem Lymphknotenstatus eine höhere UNC5H3 Expression die Prognose des Gesamtüberlebens verschlechtert.

#### 4. Diskussion

In der adjuvanten Behandlung von Pankreaskarzinomen weisen Chemotherapie und/oder Radiochemotherapie sehr unterschiedliche Wirkung aufweisen [70]. Sie werden in der klinischen Routine ohne Berücksichtigung des Tumorstaging in den meisten Fällen angewandt. In Bezug auf die Wertung der herkömmlichen Tumorstagingnomenklatur spiegeln sie ein gewisses Misstrauen wieder. Es scheint besonders wichtig, gerade in den frühen Stadien des Pankreaskarzinoms, eine zuverlässige Voraussage über das Risiko, beispielsweise eines Tumorrezidivs, zu geben. Auf diese Unzulänglichkeiten des konventionellen Tumorstaging zurückführend wird ständig eine breite Palette von Markern untersucht. Alle haben das Ziel, Patienten in ein bestimmtes Risikoprofil einzuordnen und damit ein passendes Therapieregime zu veranlassen [19,32,37,43,45,47,49,50,54,72,79,80,81,85,94].

Durch immunhistochemische bzw. molekularbiologische Verfahren erforscht man eine Vielzahl verschiedener Untersuchungen von möglichen Tumorprädiktoren. Es wird damit gezeigt, dass bis zum heutigen Zeitpunkt schon eine ganze Reihe von Biomarkern existieren, die Einfluss auf die Prognose des Pankreaskarzinoms haben. Es erscheint aber insbesondere wichtig, dass diese vielen einzelnen möglichen Tumormarker in Kombination zu sehen sind, um damit eine vernünftige Prognose voraussagen zu können und beispielsweise eine unnötige Behandlung zu Lasten des Patienten zu vermeiden. Es ist jedoch ein schwerwiegendes Problem, dass viele dieser Marker nicht nur spezifisch für das Pankreaskarzinom sind. Sie kommen auch in anderen Tumorentitäten vor. Daher ist es bis heute nicht gelungen einen aussagekräftigen Tumormarker zur Früherkennung des Pankreaskarzinoms zu finden. Vielmehr dienen all diese Marker mehr oder weniger zur Prognoseeinschätzung bzw. zur Verlaufskontrolle.

Es wurde in der vorliegenden Studie die Expression von Netrin-1 und den Rezeptoren DCC, Neogenin und UNC5H3 immunhistochemisch an 82 Adenokarzinomen des Pankreas untersucht. Mit dieser Arbeit wurde daher erstmals der Einfluss dieser Biomarker bei Pankreaskarzinomen untersucht.

Das Netrin-1 bei der Pankreasentwicklung und beim Gewebeumbau des Pankreas beteiligt ist, zeigten de Breuk und seine Kollegen. Netrin-1 spielt insbesondere eine

Rolle bei der Gang- und Inselzellentwicklung [15]. Sie untersuchten die Expression und Funktion von Netrin-1 am sich regenerierenden Pankreasgewebe, wo zuvor der Pankreasgang verschlossen wurde. Bei Manipulationen des Pankreas, beispielsweise durch Verschliessen der exokrinen Pankreasgänge, konnten verschiedene Umbauprozesse beobachtet werden. So zeigten sich acino-duktale Metaplasien des exokrinen Pankreasgewebes, mesenchymale Hyperproliferationen und Hyperplasien von endokrinen Zellen, im Rahmen einer Inselzellneubildung [76,95]. Für die Entwicklung von Pankreaskarzinomen wird des Weiteren die chronische Pankreatitis als ein Risikofaktor angenommen [55,56]. Hier wird auf Grundlage der chronischen Entzündung mit späterer Regeneration ein Bezug zur Karzinogenese vermutet. In diesem Zusammenhang könnte der Einfluss von Netrin-1 und seinen Rezeptoren auch hier eine mögliche Rolle spielen.

Obwohl beschrieben wurde, dass Netrin-1 in adultem gesunden Pankreasgewebe nicht exprimiert wird [15], konnten wir in unserer Arbeit in 61% (50/82) der Karzinome nachweisen, dass Netrin-1 vorhanden war. Wir zeigten außerdem, dass die Netrin-1 Expression einen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben hat. Für das Gesamtüberleben konnte diese Signifikanz nicht bestätigt werden. Die geringen Überlebenszeiten könnten einen möglichen Grund dafür darstellen. Geringe Schwankungen stellen daher einen grossen Einfluss auf eine eventuelle Signifikanz dar, so dass sich ein genaueres Ergebnis möglicherweise erst bei höheren Fallzahlen herauskristallisieren würde.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Netrin-1 Rezeptoren DCC und Neogenin schwache bzw. keine Expression im adulten Pankreasgewebe aufweisen [15]. Wir konnten dies mit unseren Untersuchungen bestätigen und zeigen, dass kein Zusammenhang zwischen der Expression von DCC bzw. Neogenin und dem Adenokarzinom des Pankreas besteht. Wir fanden ebenfalls heraus, dass UNC5H3 im Gegensatz zu den anderen Netrin1-Rezeptoren offensichtlich häufiger und stärker in Adenokarzinomen des Pankreas exprimiert wird. Derzeit sind nach unserem Wissen hier keine Daten verfügbar, die eine An- bzw. Abwesenheit der UNC5H-Rezeptorfamilie in Pankreasgewebe beschreiben. Wir fanden jedoch auch hier keinen signifikanten Einfluss, weder auf das Überleben der Patienten noch auf die klinisch-pathologischen Daten.

Um die Relevanz von Netrin-1 und seinen Rezeptoren für die Prognose beim Adenokarzinom des Pankreas zu bewerten, führten wir eine weitere Untergliederung der klinisch-pathologischen Daten durch. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Netrin-1 Expression einen hoch signifikanten Einfluss auf das Überleben von Patienten mit gering differenzierten Adenokarzinomen des Pankreas hat. Während bei Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren und negativer bzw. schwacher Netrin-1 Expression ein längeres Überleben zu verzeichnen war, zeigten diese mit mäßiger bzw. starker Expression eine deutlich verkürzte Gesamtüberlebensdauer, als auch eine verkürzte rezidivfreie Zeit. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für den Rezeptor UNC5H3 in Korrelation zum Lymphknotenstatus gefunden werden. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit positivem Lymphknotenstatus und mäßiger bzw. starker UNC5H3 Expression ein signifikant geringeres Gesamtüberleben aufwiesen, als Patienten ohne bzw. schwacher UNC5H3 Expression. Diese Beobachtungen zeigen, dass es sinnvoll ist, signifikant prognostische Faktoren, wie in unserer Arbeit beispielsweise Lymphknotenstatus und Grading, nochmals in Patientensubgruppen zu untergliedern, um so die Prognose besser abschätzen zu können. Somit geben diese von uns untersuchten Marker zusätzliche Informationen über die Prognose in diesen einzelnen Subgruppen. Daraus resultierend, erlauben sie eine bessere Einordnung der Patienten in die verschiedenen Therapieregime. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass durch diese Arbeit der Beweis erbracht wurde, dass Netrin-1 und seine Rezeptoren Einfluss auf die Prognose bei Adenokarzinomen des Pankreas haben.

Es stellt sich nun die Frage: Warum nur in den Patientensubgruppen signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben besteht. Eine Antwort könnte sein, dass in der von uns durchgeführten Studie nur drei der sechs bekannten Netrin-1 Rezeptoren untersucht wurden, und damit der Einfluss der nicht untersuchten Rezeptoren unbeantwortet bleibt. Zum Einen konnten diese Untersuchungen auf Grund der fehlenden Antikörper nicht durchgeführt werden. Zum Anderen war es für uns zunächst ausreichend einen Rezeptor aus der UNC5H-Familie zu untersuchen, da bisher hierzu keinerlei Ergebnisse vorlagen, und somit diese Rezeptorfamilie erstmals an Pankreaskarzinomen untersucht wurde. Des Weiteren ist größtenteils noch nicht verstanden, wie der zugrunde liegende Mechanismus und die gegenseitigen Interaktionen von Rezeptoren und Ligand funktionieren. In Anbetracht dessen, dass Netrin-1 Rezeptoren Abhängigkeitsrezeptoren

sind, sollten in die Analyse zur Relevanz als prognostische Marker zusätzlich Kombinationen aus der Netrin-1 Expression und verschiedenen Rezeptorexpressionen einbezogen werden, um daraus resultierend, Aussagen über die Karzinogenese und Tumorbiologie machen zu können. Damit wäre es vorstellbar, dass Patienten mit Tumoren bei denen sowohl hohe Netrin-1 Expressionen als auch hohe UNC5H3 Expressionen vorkommen, eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen, als solche bei denen beispielsweise nur einer dieser Marker hoch exprimiert wird. Auf der anderen Seite wäre es auch umgekehrt möglich, da gegensätzliche oder teilweise neutralisierende Effekte denkbar wären. Diese könnten beispielsweise auch vollkommen unabhängig von der UNC5H3 Expression sein, da UNC5H3 letztlich nur einen der sechs bekannten Rezeptoren darstellt. Jedoch konnten diese hoch komplexen Wechselbeziehungen in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Die Gründe liegen zum einen an der relativ niedrigen Fallzahl. Unterteilungen in Patientensubgruppen mit bestimmten Kombinationen aus Rezeptor- und Ligandenexpression würden eine höhere Anzahl an Tumorproben erforderlich machen. Somit ist es schwierig bei einem Patientenkollektiv von 82 Fällen stichhaltige statistische Angaben betreffend der Patientenprognose zu geben. Zum anderen können allein durch immunhistochemische Analyse die zugrunde liegenden Zusammenhänge der verschiedenen Ligand-Rezeptorinteraktionen, die hier eine Rolle zu spielen scheinen, nicht genügend aufgeklärt werden. Um diese weiter zu erforschen und zu verstehen, wären daher weitere Studien, einschließlich DNA- und RNA Analysen, notwendig.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch unsere Ergebnisse erstmalig ein Zusammenhang zwischen Netrin-1 und seinen Rezeptoren in Adenokarzinomen des Pankreas gezeigt wurde. Wir haben bewiesen, dass die Expression von dem Liganden Netrin-1 und dem Rezeptor UNC5H3 signifikanten Einfluss in einzelnen Patientensubgruppen aufweist, und diese Patienten eine schlechtere Prognose haben.

Weiterhin konnten wir für Netrin-1 einen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben zeigen. Für die Rezeptoren DCC und Neogenin konnten wir keinen Einfluss auf die Prognose beim Adenokarzinom des Pankreas finden.

Zusammen mit anderen typischen pathohistologischen Prognosefaktoren, können diese Marker, Patienten mit schlechtem Verlauf identifizieren. Weitere Studien werden nötig sein, um die zugrunde liegenden Prinzipien der Interaktionen zwischen Netrin-1 und

den dazugehörigen Rezeptoren eindeutig zu verstehen, um daraus schlussfolgernd eine Aussage über die prognostische Signifikanz in duktalem Adenokarzinomen des Pankreas treffen zu können.

#### **4. Zusammenfassung**

Das Pankreaskarzinom ist eines der aggressivsten malignen Tumoren des höheren Lebensalters. Nahezu alle Patienten mit der Diagnose Pankreaskarzinom versterben aufgrund der fehlenden Frühsymptome, der zu späten Diagnosestellung und der derzeit eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten innerhalb der ersten 5 Jahre. Deshalb ist es für die Erkennung und frühzeitige Behandlung dieser Patienten enorm wichtig, relevante prognostische und prädiktive Parameter zu erforschen.

In Bezug auf die etablierten Prognosefaktoren wie Tumorstadium, Nodalstatus und Differenzierungsgrad wurde in dieser Arbeit die Expression von dem Protein Netrin-1 und deren Rezeptoren DCC, Neogenin und UNC5H3 immunhistochemisch untersucht.

Netrin-1 und seine Rezeptoren spielen eine grosse Rolle bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sie in der Tumorgenese einen bedeutenden Einfluss haben, und bereits bei einigen Tumorentitäten prognostisch relevant waren.

In dieser Studie wurden von 82 Patienten mit resektablen Adenokarzinom des Pankreas die Gewebeschnitte immunhistochemisch auf diese 4 Biomarker untersucht und anschliessend ausgewertet.

Die Untersuchung ergab, dass sowohl für Netrin-1 als auch für den Rezeptor UNC5H3 eine Assoziation zwischen Expressionstärke und Prognose besteht. Hohe Netrin-1 Expressionen sind mit einer deutlich kürzeren rezidivfreien Überlebenszeit verbunden, als niedrige Expressionen. Des Weiteren zeigt Netrin-1 signifikanten Einfluss bei schlecht differenzierten Tumoren. Hohe Netrin-1 Expressionen sind auch hier mit einem deutlich verringertem Gesamtüberleben assoziiert. Bei dem Rezeptor UNC5H3 konnte ein Zusammenhang zwischen positivem Lymphknotenstatus und der Expressionsstärke untersucht werden. Patienten mit hohen Expressionen wiesen ein geringeres Gesamtüberleben auf, als diejenigen mit geringer Expression.

Für die Rezeptoren DCC und Neogenin konnte kein Einfluss auf die Prognose bei duktalem Adenokarzinomen des Pankreas gefunden werden.

Für die Zukunft wird erwartet, dass weitere Biomarker für das duktales Adenokarzinom des Pankreas untersucht werden, und letztlich der Einschluss von relevanten Proteinen

dazu führen wird, dass die molekulare Bestimmung einer Serie von Parametern zu einer individualisierten Patientenbehandlung beiträgt.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Adamek, HE, Albert, J, Breer, H, Weitz, M, Schilling, D und Riemann, JF (2000): Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study, *Lancet* 356, 9225:190-193
- [2] Adsay, NV, Bandyopadhyay, S, Basturk, O, Othman, M, Cheng, JD, Kloppel, G und Klimstra, DS (2004): Chronic pancreatitis or pancreatic ductal adenocarcinoma?, *Semin Diagn Pathol* 21, 4:268-276
- [3] Ahlgren, JD (1996): Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer, *Semin Oncol* 23, 2:241-250
- [4] Arakawa, H (2004): Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis, *Nat Rev Cancer* 4, 12:978-987
- [5] Bakkevold, KE, Arnesjo, B und Kambestad, B (1992): Carcinoma of the pancreas and papilla of Vater: presenting symptoms, signs, and diagnosis related to stage and tumour site. A prospective multicentre trial in 472 patients. Norwegian Pancreatic Cancer Trial, *Scand J Gastroenterol* 27, 4:317-325
- [6] Bayliss, PE, Bellavance, KL, Whitehead, GG, Abrams, JM, Aegerter, S, Robbins, HS, Cowan, DB, Keating, MT, O'Reilly, T, Wood, JM, Roberts, TM und Chan, J (2006): Chemical modulation of receptor signaling inhibits regenerative angiogenesis in adult zebrafish, *Nat Chem Biol* 2, 5:265-273
- [7] Bernet, A und Mehlen, P (2007): Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression, *Bull Cancer* 94, 4:E12-17
- [8] Birk, D und Beger, HG (2001): Neoadjuvant, adjuvant, and palliative treatment of pancreatic cancer, *Curr Gastroenterol Rep* 3, 2:129-135
- [9] Bohmig, M und Rosewicz, S (2004): [Pancreatic carcinoma], *Z Gastroenterol* 42, 3:261-268
- [10] Breslin, TM, Hess, KR, Harbison, DB, Jean, ME, Cleary, KR, Dackiw, AP, Wolff, RA, Abbruzzese, JL, Janjan, NA, Crane, CH, Vauthey, JN, Lee, JE, Pisters, PW und Evans, DB (2001): Neoadjuvant chemoradiotherapy for adenocarcinoma of the pancreas: treatment variables and survival duration, *Ann Surg Oncol* 8, 2:123-132
- [11] Brewster, SF, Gingell, JC, Browne, S und Brown, KW (1994): Loss of heterozygosity on chromosome 18q is associated with muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder, *Br J Cancer* 70, 4:697-700

- [12] Chang, KJ, Parasher, G, Christie, C, Largent, J und Anton-Culver, H (2005): Risk of pancreatic adenocarcinoma: disparity between African Americans and other race/ethnic groups, *Cancer* 103, 2:349-357
- [13] Cubilla, AL und Fitzgerald, PJ (1985): Cancer of the exocrine pancreas: the pathologic aspects, *CA Cancer J Clin* 35, 1:2-18
- [14] Cutcliffe, C, Kersey, D, Huang, CC, Zeng, Y, Walterhouse, D und Perlman, EJ (2005): Clear cell sarcoma of the kidney: up-regulation of neural markers with activation of the sonic hedgehog and Akt pathways, *Clin Cancer Res* 11, 22:7986-7994
- [15] De Breuck, S, Lardon, J, Rooman, I und Bouwens, L (2003): Netrin-1 expression in fetal and regenerating rat pancreas and its effect on the migration of human pancreatic duct and porcine islet precursor cells, *Diabetologia* 46, 7:926-933
- [16] Deiner, MS, Kennedy, TE, Fazeli, A, Serafini, T, Tessier-Lavigne, M und Sretavan, DW (1997): Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia, *Neuron* 19, 3:575-589
- [17] Drenckhahn D, Fleischhauer K (1994) Benninghoff Anatomie, 15. Auflage, Band I, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Urban und Schwarzenberg
- [18] Dunn, JR, Reed, JE, du Plessis, DG, Shaw, EJ, Reeves, P, Gee, AL, Warnke, P und Walker, C (2006): Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is downregulated in brain tumours, *Br J Cancer* 94, 8:1186-1193
- [19] Duxbury, MS, Matros, E, Clancy, T, Bailey, G, Doff, M, Zinner, MJ, Ashley, SW, Maitra, A, Redston, M und Whang, EE (2005): CEACAM6 is a novel biomarker in pancreatic adenocarcinoma and PanIN lesions, *Ann Surg* 241, 3:491-496
- [20] Ekstrand, BC, Mansfield, TA, Bigner, SH und Fearon, ER (1995): DCC expression is altered by multiple mechanisms in brain tumours, *Oncogene* 11, 11:2393-2402
- [21] Evans DB, Abbruzzese JL, Rich TA (1997) Cancer of the pancreas. In: De Vita VT Jr, Hellmann S, Rosenberg SA (eds) *Cancer principles & practice of Oncology*, 5<sup>th</sup> edn. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp1054-1087
- [22] Fazeli, A, Dickinson, SL, Hermiston, ML, Tighe, RV, Steen, RG, Small, CG, Stoeckli, ET, Keino-Masu, K, Masu, M, Rayburn, H, Simons, J, Bronson, RT, Gordon, JI, Tessier-Lavigne, M und Weinberg, RA (1997): Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene, *Nature* 386, 6627:796-804
- [23] Fearon, ER, Cho, KR, Nigro, JM, Kern, SE, Simons, JW, Ruppert, JM, Hamilton, SR, Preisinger, AC, Thomas, G, Kinzler, KW und et al. (1990): Identification of a

- chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers, *Science* 247, 4938:49-56
- [24] Fearon, ER und Vogelstein, B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell* 61, 5:759-767
- [25] Fernandez, E, La Vecchia, C, D'Avanzo, B, Negri, E und Franceschi, S (1994): Family history and the risk of liver, gallbladder, and pancreatic cancer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3, 3:209-212
- [26] Freelove, R und Walling, AD (2006): Pancreatic cancer: diagnosis and management, *Am Fam Physician* 73, 3:485-492
- [27] Gad, JM, Keeling, SL, Wilks, AF, Tan, SS und Cooper, HM (1997): The expression patterns of guidance receptors, DCC and Neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis, *Dev Biol* 192, 2:258-273
- [28] Garabrant, DH, Held, J, Langholz, B, Peters, JM und Mack, TM (1992): DDT and related compounds and risk of pancreatic cancer, *J Natl Cancer Inst* 84, 10:764-771
- [29] Gavert, N, Conacci-Sorrell, M, Gast, D, Schneider, A, Altevogt, P, Brabletz, T und Ben-Ze'ev, A (2005): L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers, *J Cell Biol* 168, 4:633-642
- [30] Gennatas, C, Michalaki, V, Mouratidou, D, Tsavaris, N, Andreadis, C, Photopoulos, A und Voros, D (2006): Gemcitabine combined with 5-fluorouracil for the treatment of advanced carcinoma of the pancreas, *In Vivo* 20, 2:301-305
- [31] Ghadirian, P, Lynch, HT und Krewski, D (2003): Epidemiology of pancreatic cancer: an overview, *Cancer Detect Prev* 27, 2:87-93
- [32] Groblewska, M, Mroczko, B, Wereszczynska-Siemiatkowska, U, Mysliwiec, P, Kedra, B und Szmitkowski, M (2007): Serum levels of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in pancreatic cancer patients, *Clin Chem Lab Med* 45, 1:30-34
- [33] Hahn, SA, Schutte, M, Hoque, AT, Moskaluk, CA, da Costa, LT, Rozenblum, E, Weinstein, CL, Fischer, A, Yeo, CJ, Hruban, RH und Kern, SE (1996): DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1, *Science* 271, 5247:350-353
- [34] Hahn, WC und Weinberg, RA (2002): Rules for making human tumor cells, *N Engl J Med* 347, 20:1593-1603
- [35] Hedrick, L, Cho, KR, Fearon, ER, Wu, TC, Kinzler, KW und Vogelstein, B (1994): The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis, *Genes Dev* 8, 10:1174-1183

- [36] Hruban, RH, Adsay, NV, Albores-Saavedra, J, Compton, C, Garrett, ES, Goodman, SN, Kern, SE, Klimstra, DS, Kloppel, G, Longnecker, DS, Luttges, J und Offerhaus, GJ (2001): Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions, *Am J Surg Pathol* 25, 5:579-586
- [37] Ito, Y, Okada, Y, Sato, M, Sawai, H, Funahashi, H, Murase, T, Hayakawa, T und Manabe, T (2005): Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor family members and their receptors in pancreatic cancers, *Surgery* 138, 4:788-794
- [38] Kaneko, T, Nakao, A, Inoue, S, Nomoto, S, Nagasaka, T, Nakashima, N, Harada, A, Nonami, T und Takagi, H (1996): Extrapancreatic nerve plexus invasion by carcinoma of the head of the pancreas. Diagnosis with intraportal endovascular ultrasonography, *Int J Pancreatol* 19, 1:1-7
- [39] Kaur, B, Brat, DJ, Devi, NS und Van Meir, EG (2005): Vasculostatin, a proteolytic fragment of brain angiogenesis inhibitor 1, is an antiangiogenic and antitumorigenic factor, *Oncogene* 24, 22:3632-3642
- [40] Keeling, SL, Gad, JM und Cooper, HM (1997): Mouse Neogenin, a DCC-like molecule, has four splice variants and is expressed widely in the adult mouse and during embryogenesis, *Oncogene* 15, 6:691-700
- [41] Keino-Masu, K, Masu, M, Hinck, L, Leonardo, ED, Chan, SS, Culotti, JG und Tessier-Lavigne, M (1996): Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor, *Cell* 87, 2:175-185
- [42] Kennedy, TE, Serafini, T, de la Torre, JR und Tessier-Lavigne, M (1994): Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord, *Cell* 78, 3:425-435
- [43] Kigure, S (2006): Immunohistochemical study of the association between the progression of pancreatic ductal lesions and the expression of MUC1, MUC2, MUC5AC, and E-cadherin, *Rinsho Byori* 54, 5:447-452
- [44] Klöppel G (1984) Pancreatic, non-endocrine tumors. In: Klöppel G, Heitz PU (eds) *Pancreatic pathology*. Churchill Livingstone, New York, p79
- [45] Kristiansen, G, Jacob, J, Buckendahl, AC, Grutzmann, R, Alldinger, I, Sipos, B, Kloppel, G, Bahra, M, Langrehr, JM, Neuhaus, P, Dietel, M und Pilarsky, C (2006): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is highly expressed in pancreatic cancer and is associated with shorter overall survival times, *Clin Cancer Res* 12, 21:6444-6451
- [46] Lee, JE, Kim, HJ, Bae, JY, Kim, SW, Park, JS, Shin, HJ, Han, W, Kim, SW, Kang, KS und Noh, DY (2005): Neogenin expression may be inversely correlated to the tumorigenicity of human breast cancer, *BMC Cancer* 5154

- [47] Lee, MA, Park, GS, Lee, HJ, Jung, JH, Kang, JH, Hong, YS, Lee, KS, Kim, DG und Kim, SN (2005): Survivin expression and its clinical significance in pancreatic cancer, *BMC Cancer* 5:127
- [48] Li, D, Xie, K, Wolff, R und Abbruzzese, JL (2004): Pancreatic cancer, *Lancet* 363, 9414:1049-1057
- [49] Lim, YJ, Lee, JK, Park, CK, Song, SY, Jang, WY, Ha, HY, Park, DI, Lee, KT, Paik, SW, Yoo, BC und Rhee, JC (2004): Prognostic value of VEGF in human pancreatic ductal adenocarcinoma, *Korean J Intern Med* 19, 1:10-14
- [50] Liu, T, Gou, SM, Wang, CY, Wu, HS, Xiong, JX und Zhou, F (2007): Pancreas duodenal homeobox-1 expression and significance in pancreatic cancer, *World J Gastroenterol* 13, 18:2615-2618
- [51] Livesey, FJ (1999): Netrins and netrin receptors, *Cell Mol Life Sci* 56, 1-2:62-68
- [52] Llambi, F, Causeret, F, Bloch-Gallego, E und Mehlen, P (2001): Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC, *Embo J* 20, 11:2715-2722
- [53] Lopez Hanninen, E, Amthauer, H, Hosten, N, Ricke, J, Bohmig, M, Langrehr, J, Hintze, R, Neuhaus, P, Wiedenmann, B, Rosewicz, S und Felix, R (2002): Prospective evaluation of pancreatic tumors: accuracy of MR imaging with MR cholangiopancreatography and MR angiography, *Radiology* 224, 1:34-41
- [54] Louhimo, J, Alfthan, H, Stenman, UH und Haglund, C (2004): Serum HCG beta and CA 72-4 are stronger prognostic factors than CEA, CA 19-9 and CA 242 in pancreatic cancer, *Oncology* 66, 2:126-131
- [55] Lowenfels, AB und Maisonneuve, P (2006): Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer, *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 20, 2:197-209
- [56] Lowenfels, AB, Maisonneuve, P, Cavallini, G, Ammann, RW, Lankisch, PG, Andersen, JR, Dimagno, EP, Andren-Sandberg, A und Domellof, L (1993): Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group, *N Engl J Med* 328, 20:1433-1437
- [57] Lowenfels, AB, Maisonneuve, P, DiMagno, EP, Elitsur, Y, Gates, LK, Jr., Perrault, J und Whitcomb, DC (1997): Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group, *J Natl Cancer Inst* 89, 6:442-446
- [58] Lyon, JL, Slattery, ML, Mahoney, AW und Robison, LM (1993): Dietary intake as a risk factor for cancer of the exocrine pancreas, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2, 6:513-518
- [59] Mazelin, L, Bernet, A, Bonod-Bidaud, C, Pays, L, Arnaud, S, Gespach, C, Bredesen, DE, Scoazec, JY und Mehlen, P (2004): Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis, *Nature* 431, 7004:80-84

- [60] Mehlen, P und Goldschneider, D (2005): [Dependence receptors DCC and UNC5H: the role of apoptosis in the control of tumorigenesis], *J Soc Biol* 199, 3:211-218
- [61] Mehlen, P und Mazelin, L (2003): The dependence receptors DCC and UNC5H as a link between neuronal guidance and survival, *Biol Cell* 95, 7:425-436
- [62] Mehlen, P, Rabizadeh, S, Snipas, SJ, Assa-Munt, N, Salvesen, GS und Bredesen, DE (1998): The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis, *Nature* 395, 6704:801-804
- [63] Michaud, DS (2004): Epidemiology of pancreatic cancer, *Minerva Chir* 59, 2:99-111
- [64] Miyake, K, Inokuchi, K, Dan, K und Nomura, T (1993): Alterations in the deleted in colorectal carcinoma gene in human primary leukemia, *Blood* 82, 3:927-930
- [65] Miyake, S, Nagai, K, Yoshino, K, Oto, M, Endo, M und Yuasa, Y (1994): Point mutations and allelic deletion of tumor suppressor gene DCC in human esophageal squamous cell carcinomas and their relation to metastasis, *Cancer Res* 54, 11:3007-3010
- [66] Moeschberger, ML und Klein, JP (1995): Statistical methods for dependent competing risks, *Lifetime Data Anal* 1, 2:195-204
- [67] Mornex, F, Girard, N, Delperro, JR und Partensky, C (2005): Radiochemotherapy in the management of pancreatic cancer--part I: neoadjuvant treatment, *Semin Radiat Oncol* 15, 4:226-234
- [68] Moskaluk, CA, Hruban, RH und Kern, SE (1997): p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma, *Cancer Res* 57, 11:2140-2143
- [69] Muller-Nordhorn, J, Roll, S, Bohmig, M, Nocon, M, Reich, A, Braun, C, Noesselt, L, Wiedenmann, B, Willich, SN und Bruggenjurgen, B (2006): Health-related quality of life in patients with pancreatic cancer, *Digestion* 74, 2:118-125
- [70] Neoptolemos, JP, Stocken, DD, Friess, H, Bassi, C, Dunn, JA, Hickey, H, Beger, H, Fernandez-Cruz, L, Dervenis, C, Lacaine, F, Falconi, M, Pederzoli, P, Pap, A, Spooner, D, Kerr, DJ und Buchler, MW (2004): A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer, *N Engl J Med* 350, 12:1200-1210
- [71] Newman, EA, Simeone, DM und Mulholland, MW (2006): Adjuvant treatment strategies for pancreatic cancer, *J Gastrointest Surg* 10, 6:916-926
- [72] Niedergethmann, M, Wostbrock, B, Sturm, JW, Willeke, F, Post, S und Hildenbrand, R (2004): Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma, *Pancreas* 29, 3:204-211

- [73] Park, KW, Crouse, D, Lee, M, Karnik, SK, Sorensen, LK, Murphy, KJ, Kuo, CJ und Li, DY (2004): The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 46:16210-16215
- [74] Pellegata, NS, Sessa, F, Renault, B, Bonato, M, Leone, BE, Solcia, E und Ranzani, GN (1994): K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions, *Cancer Res* 54, 6:1556-1560
- [75] Pfeffer, F, Nauck, MA, Benz, S und Hopt, UT (1999): [Secondary diabetes in pancreatic carcinoma and after pancreatectomy: pathophysiology, therapeutic peculiarities and prognosis], *Z Gastroenterol Suppl* 110-14
- [76] Rooman, I, Lardon, J und Bouwens, L (2002): Gastrin stimulates beta-cell neogenesis and increases islet mass from transdifferentiated but not from normal exocrine pancreas tissue, *Diabetes* 51, 3:686-690
- [77] Rozenblum, E, Schutte, M, Goggins, M, Hahn, SA, Panzer, S, Zahurak, M, Goodman, SN, Sohn, TA, Hruban, RH, Yeo, CJ und Kern, SE (1997): Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma, *Cancer Res* 57, 9:1731-1734
- [78] Rulyak, SJ und Brentnall, TA (2001): Inherited pancreatic cancer: surveillance and treatment strategies for affected families, *Pancreatology* 1, 5:477-485
- [79] Saitou, M, Goto, M, Horinouchi, M, Tamada, S, Nagata, K, Hamada, T, Osako, M, Takao, S, Batra, SK, Aikou, T, Imai, K und Yonezawa, S (2005): MUC4 expression is a novel prognostic factor in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas, *J Clin Pathol* 58, 8:845-852
- [80] Saxby, AJ, Nielsen, A, Scarlett, CJ, Clarkson, A, Morey, A, Gill, A und Smith, RC (2005): Assessment of HER-2 status in pancreatic adenocarcinoma: correlation of immunohistochemistry, quantitative real-time RT-PCR, and FISH with aneuploidy and survival, *Am J Surg Pathol* 29, 9:1125-1134
- [81] Schleicher, C, Poremba, C, Wolters, H, Schafer, KL, Senninger, N und Colombo-Benkmann, M (2007): Gain of chromosome 8q: a potential prognostic marker in resectable adenocarcinoma of the pancreas?, *Ann Surg Oncol* 14, 4:1327-1335
- [82] Schutte, M, Hruban, RH, Geradts, J, Maynard, R, Hilgers, W, Rabindran, SK, Moskaluk, CA, Hahn, SA, Schwarte-Waldhoff, I, Schmiegel, W, Baylin, SB, Kern, SE und Herman, JG (1997): Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas, *Cancer Res* 57, 15:3126-3130
- [83] Silverman, DT, Dunn, JA, Hoover, RN, Schiffman, M, Lillemoe, KD, Schoenberg, JB, Brown, LM, Greenberg, RS, Hayes, RB, Swanson, GM und et al. (1994): Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews, *J Natl Cancer Inst* 86, 20:1510-1516

- [84] Simon, B und Printz, H (2001): Epidemiological trends in pancreatic neoplasias, *Dig Dis* 19, 1:6-14
- [85] Skalicky, DA, Kench, JG, Segara, D, Coleman, MJ, Sutherland, RL, Henshall, SM, Musgrove, EA und Biankin, AV (2006): Cyclin E expression and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 10:1941-1947
- [86] Smith, JJ, Derynck, R und Korc, M (1987): Production of transforming growth factor alpha in human pancreatic cancer cells: evidence for a superagonist autocrine cycle, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 21:7567-7570
- [87] Srinivasan, K, Strickland, P, Valdes, A, Shin, GC und Hinck, L (2003): Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis, *Dev Cell* 4, 3:371-382
- [88] Takahashi, T, Ishikura, H, Motohara, T, Okushiba, S, Dohke, M und Katoh, H (1997): Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas, *J Surg Oncol* 65, 3:164-170
- [89] Thiebault, K, Mazelin, L, Pays, L, Llambi, F, Joly, MO, Scoazec, JY, Saurin, JC, Romeo, G und Mehlen, P (2003): The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7:4173-4178
- [90] Thompson, AM, Morris, RG, Wallace, M, Wyllie, AH, Steel, CM und Carter, DC (1993): Allele loss from 5q21 (APC/MCC) and 18q21 (DCC) and DCC mRNA expression in breast cancer, *Br J Cancer* 68, 1:64-68
- [91] Thomson, BN, Banting, SW und Gibbs, P (2006): Pancreatic cancer - current management, *Aust Fam Physician* 35, 4:212-217
- [92] Thorlacius, S, Olafsdottir, G, Tryggvadottir, L, Neuhausen, S, Jonasson, JG, Tavtigian, SV, Tulinius, H, Ogmundsdottir, HM und Eyfjord, JE (1996): A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes, *Nat Genet* 13, 1:117-119
- [93] Toschi, L, Finocchiaro, G, Bartolini, S, Gioia, V und Cappuzzo, F (2005): Role of gemcitabine in cancer therapy, *Future Oncol* 1, 1:7-17
- [94] Tsiambas, E, Karameris, A, Dervenis, C, Lazaris, AC, Giannakou, N, Gerontopoulos, K und Patsouris, E (2006): HER2/neu expression and gene alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparative immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization study based on tissue microarrays and computerized image analysis, *Jop* 7, 3:283-294
- [95] Wang, RN, Kloppel, G und Bouwens, L (1995): Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats, *Diabetologia* 38, 12:1405-1411

- [96] Warshaw, AL und Fernandez-del Castillo, C (1992): Pancreatic carcinoma, N Engl J Med 326, 7:455-465
- [97] Wente, MN,Keane, MP,Burdick, MD,Friess, H,Buchler, MW,Ceyhan, GO,Reber, HA,Strieter, RM und Hines, OJ (2006): Blockade of the chemokine receptor CXCR2 inhibits pancreatic cancer cell-induced angiogenesis, Cancer Lett 241, 2:221-227
- [98] Whelan, AJ,Bartsch, D und Goodfellow, PJ (1995): Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene, N Engl J Med 333, 15:975-977
- [99] Willett, CG,Czito, BG,Bendell, JC und Ryan, DP (2005): Locally advanced pancreatic cancer, J Clin Oncol 23, 20:4538-4544
- [100] Yee, KT,Simon, HH,Tessier-Lavigne, M und O'Leary, DM (1999): Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1, Neuron 24, 3:607-622

## 7. Danksagung

Bedanken möchte ich mich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. E. Yekebas, dem geschäftsführenden Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE) in Hamburg.

Herrn Professor Dr. med. Prof. h. c. J. R. Izbicki, ärztlicher Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, danke ich für die Unterstützung und für die Bereitstellung der Räume und der technischen Geräte seines Labors.

Ein besonders tiefer Dank gilt Herr Dr. med. Björn Christian Link und Frau Dr. med. Uta Reichelt, die diese Arbeit betreuten und mir mit technischem Rat und praktischer Einarbeitung zur Seite standen. Ebenso möchte ich mich recht herzlich dafür bedanken, dass sie als Ansprechpartner immer gerne zur Verfügung standen.

Mein Dank gilt weiter an die Mitarbeiter des allgemeinchirurgischen und hepatobiliären Labors im UKE-Hamburg, die mir ihre Räume zur Verfügung stellten und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Hervorheben möchte ich von diesen medizintechnische Assistentinnen Frau Antje Heinecke und Frau Petra Merkert, die mir in der Ausführung der Immunhistochemie behilflich waren, Frau Petra Schröder, die mich in die Technik der Immunhistochemie eingewiesen hat, sowie Frau Silke Brilloff und Frau Kathleen Schlagner.

Frau Dr. med. Susanne Petri und Frau Dr. med. Uta Reichelt danke ich herzlich für die Hilfestellung bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung und für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit im Institut für Pathologie der Universität Hamburg.

Zum Schluss möchte ich insbesondere meinen Eltern und Großeltern einen großen Dank für Ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfe in meiner Studienzeit aussprechen.

## 8. Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name:	Schreiber
Vorname:	Matthias
Geboren:	6. April 1980 in Mühlhausen/Thüringen
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

### **Schulische Ausbildung:**

1986 – 1996	Grund-und Realschule in Mühlhausen
1996 - 1999	Tilesius-Gymnasium in Mühlhausen
1999	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

### **Studium:**

April 2001	Beginn des Studiums am Universitäts- klinikum Eppendorf in Hamburg
März 2003	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
August 2006 – Juli 2007	Praktisches Jahr
Oktober 2007	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Dezember 2007	Approbation

### **Berufliche Karriere**

Januar - März 2008	Südharz-Krankenhaus Nordhausen, in der Abteilung für Allgemein- u. Viszeralchirurgie
ab März 2008	Südharz-Krankenhaus Nordhausen, in der Abteilung für Urologie

## 9. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

.....