## Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Pathologie

Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter

Arbeit unter der Anleitung von PD Dr. R. Simon

# Die Rolle von p53, Ki-67, HER2 und TRRAP beim duktalen Adenokarzinom des Pankreas: Eine Gewebe – Mikroarray – Untersuchung an 256 Tumoren

## Dissertation

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

Rebekka Katharina Kohlhaus aus Winsen/ Luhe

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 11.07.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in: PD Dr. R. Simon

Prüfungsausschuss, 3 Gutachter/in: Prof. Dr. E. Yekebas

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

CGH: Komparative genomische Hybridisierung

CIS: Carcinoma in situ

CISH: Chromogene in situ Hybridisierung

CT: Computertomographie

FAMMM-Syndrom: Familiäres atypisches multiples Muttermal und Melanom

Syndrom

FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisierung

HAT: Histon Acetyltransferasen

HE: Hämatoxylin-Eosin

HER2: Human epidermal growth receptor 2

IHC: Immunhistochemie

LI: Labeling Index

MRT: Magnetresonanztomographie

PanIN: Pankreatische intraepitheliale Neoplasien

PI: Phosphatidylinositol

TNM-Klassifikation: T: Tumor (Beschreibung von Größe und Ausdehnung)

N: Nodalstatus (Angabe von Lymphknotenmetastasen)

M: Metastasen (Angabe von Fernmetastasen)

TMA Tissue microarray

TRRAP: Transformation/transcription domain-associated protein

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Ei	1	
	1.1	Das Pankreaskarzinom	1
	1.1	.1 Epidemiologie	1
	1.1	.2 Ätiologie	1
	1.1	.3 Symptome, Diagnose, Therapie	2
	1.1	.4 Pathologie	3
	1.2	Genetik des Pankreaskarzinoms	4
	1.3	Fragestellung der Arbeit	8
2	M	aterial und Methoden	8
	2.1	Gewebe und Patienten	8
	2.2	Tissue Microarray - Herstellung	9
	2.3 Immunhistochemie (IHC)		11
	2.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (F		12
	2.5	Statistik	13
3	Er	gebnisse	13
	3.1	p53 Expression	13
	3.2	Ki-67 Expression	15
	3.3	Korrelation zwischen p53 und Ki-67	16
	3.4	TRRAP Amplifikation	17
	3.5	HER2 Amplifikation	18
	3.6	Kaplan-Meier Analysen	20
4	Di	skussion	22
5	Zι	sammenfassung	27
6	Li	28	
7	Da	34	
8	Ei	desstattliche Versicherung	35

#### 1 EINLEITUNG

#### 1.1 Das Pankreaskarzinom

#### 1.1.1 Epidemiologie

Die Gesamtheit der Pankreaskarzinome macht etwa 3% aller Krebserkrankungen in Deutschland aus. Trotz intensiver Forschung konnte in den letzten Jahren die relative 5-Jahres-Überlebensrate lediglich gering gesteigert werden. Sie verbesserte sich zwischen den Jahren 2002 bis 2004 bei Männern von 5% auf 6,4% und bei Frauen von 4% auf 7,6% (GEKID 2007; GEKID 2009). Aufgrund ihrer schlechten Prognose sind die Pankreaskarzinome bei Männern für 5,8%, bei Frauen für 6,7% aller Krebstodesfälle in Deutschland verantwortlich und sind damit die vierthäufigste Krebstodesursache insgesamt. Das männliche mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 69 Jahren, das weibliche bei etwa 76 Jahren (GEKID 2009). Etwa 80% der duktalen Adenokarzinome manifestieren sich im Alter zwischen 60 und 80 Jahren. Nur sehr selten kommt es zu einer Tumormanifestation bei Patienten unter 40 Jahren. Die Inzidenz der Pankreaskarzinome ist bei Männern leicht höher als bei Frauen. So beträgt das Verhältnis Männer zu Frauen 1,6 in Industrieländern und 1,1 in Entwicklungsländern (Klöppel et al. 2000).

#### 1.1.2 Ätiologie

Wie bei den meisten Krebserkrankungen ist die Ätiologie des Pankreaskarzinoms vielfältig. Es sind diverse autosomal-dominate genetische Veränderungen beschrieben, die zu einer Erhöhung des Pankreaskarzinomrisikos führen (Hall et al. 2002). In den letzten Jahren konnte eine Zunahme in der Häufigkeit des Auftretens in industrialisierten Ländern verzeichnet werden. Diese wird in erster Linie auf das zunehmende Lebensalter, Übergewicht sowie auf Rauchen und Alkoholabusus zurückgeführt (Beger et al. 2008). Es konnte belegt werden, dass etwa 30% aller duktalen Pankreaskarzinome durch Nikotinabusus verursacht sind (Muscat et al. 1997). Eine ballaststoffarme, fleisch- und fettreiche Ernährung soll ebenfalls der Tumorentwicklung förderlich sein. Der Kaffeekonsum stellt allerdings - anders als früher angenommen - kein erhöhtes Risiko dar (Klöppel et al. 2000).

Hruban et al. (2001) beschreibt das familiär-gehäufte Auftreten von Pankreas-karzinomen, ohne dass bekannte genetische Veränderungen nachgewiesen werden konnten. Eine Studie von Simon und Printz (2001) zeigt, dass etwa 10% aller Pankreas-karzinome familiär bedingt sind. Zu den familiären Erkrankungen mit stark erhöhtem Pankreas-karzinomrisiko gehören die häufig beschriebene chronische hereditäre Pankreatitis (Whitcomb et al. 1996; Hall et al. 2002), das Peutz-Jeghers-Syndrom (Su et al. 1999; Giardiello et al. 2000; Cowgill u. Muscarella 2003; Qanungo et al. 2003), das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom, das 'familiäre atypische multiple Muttermal und Melanom Syndrom' (FAMMM-Syndrom) sowie Mutationen im BRCA2, die für Brust- und Ovarialkarzinome bekannt sind (Cowgill u. Muscarella 2003).

### 1.1.3 Symptome, Diagnose, Therapie

Bei mehr als 90% aller Patienten hat sich das Pankreaskarzinom zum Zeitpunkt der Diagnose bereits über die anatomischen Grenzen des Pankreas hinaus ausgebreitet. Der Grund dieser späten Diagnose ist das Fehlen von charakteristischen Frühsymptomen (Beger et al. 2008). So werden manche Patienten über einen längeren Zeitraum orthopädisch behandelt, bevor die Ursache ihrer Rückenschmerzen im Pankreas-karzinom erkannt wird. Spätsymptome eines vorangeschrittenen Pankreaskarzinoms können Oberbauch- und Rückenschmerzen sein, die charakteristischerweise gürtelförmig ausstrahlen können, aber nicht müssen. Durch eine Stenose der ableitenden Gallenwege kann es zu einem Ikterus kommen. Weitere Spätsymptome stellen das plötzliche Auftreten eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus, Fettstühle sowie der für viele Krebserkrankungen typische Nachtschweiß und unerklärte Gewichtsverluste dar (Beger et al. 2008). Gelegentlich fallen Patienten auch durch eine akute Pankreatitis, Thrombophlebitiden, Hypoglykämien oder Hyperkalzämie auf (Klöppel et al. 2000).

Bei dem Verdacht auf ein Pankreaskarzinom sollte eine Dünnschicht-Kontrast-Computertomographie (CT) bzw. eine Magnetresonanztomographie (MRT) zur Abklärung durchgeführt werden (Beger et al. 2008).

Die einzige kurative Therapieoption ist die chirurgische Entfernung des Tumors. Die onkologische Resektion eines duktalen Pankreaskarzinoms ist jedoch nur im TNM-

Stadium I und II indiziert. Bei höheren Stadien ist der chirurgische Eingriff meist palliativ (AWMF 2008; Beger et al. 2008).

Nach einer radikalen Tumorentfernung sollte eine adjuvante Chemotherapie erfolgen, diese kann das weitere Überleben signifikant verlängern (Beger et al. 2008).

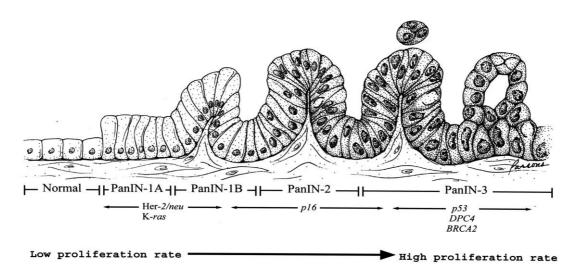
Die Prognose des duktalen Adenokarzinoms ist die schlechteste, da die frühzeitige Metastasierung sowohl lymphogen als auch hämatogen in Leber, Knochen, Lunge und Gehirn erfolgt.

## 1.1.4 Pathologie

Die Mehrheit der Bauchspeicheldrüsen-Neoplasien hat ein solides Wachstumsmuster, die Tumorzellen sind mäßig bis gut differenziert (Klöppel et al. 2000; Kosmahl et al. 2005). Die Neoplasien des exokrinen Pankreas machen im Vergleich zu denen des endokrinen Pankreas 95% aller Tumore aus. Hierbei handelt es sich am häufigsten um Adenokarzinome, die mit ca. 70% den Pankreaskopfbereich betreffen. Ausgangspunkt ist zu 90% das einschichtige Epithel der kleinen Ausführungsgänge, aus dem sich das in dieser Arbeit ausschließlich untersuchte duktale Adenokarzinom entwickelt (Klöppel u. Lüttges 2001; Adler 2004; Beger et al. 2008).

Seit im Jahr 1924 der erste mit hyperplastischen und dysplastischen Epithelläsionen assoziierte Pankreastumor beschrieben wurde, hat sich der Verdacht eines Progressionsmodells für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms in den vergangenen Jahren zunehmend bestätigt (Biankin et al. 2004). In diesem mehrstufigen Modell wurden genau definierte nicht-invasive duktale Läsionen unter dem Begriff pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanINs) klassifiziert (Maitra et al. 2003).

Die PanINs werden in drei Entwicklungsstufen eingeteilt (siehe Abb. 1). PanIN-1 sind Epithelläsionen ohne Dysplasien, PanIN-2 sind Epithelläsionen mit Dysplasien und PanIN-3 entspricht dem carcinoma in situ (CIS). Viele der in Adenokarzinomen des Pankreas zu findenden genetischen Veränderungen sind bereits in den PanINs nachweisbar. So findet man in einem Großteil der PanIN-3 bereits eine vermehrte p53 Expression (Klein et al. 2002).



Progression Model of Pancreatic Cancer

Abbildung 1: Vorstufenmodell des Pankreaskarzinoms, aus Klein et al. (2002).

#### 1.2 Genetik des Pankreaskarzinoms

Pankreaskarzinome gelten als genetisch extrem instabil mit einer Vielzahl von chromosomalen Veränderungen und Mutationen. Zu den häufigsten Veränderungen zählen Punktmutationen des KRAS Genes (Chromosom 12p), die in über 90% der Pankreastumoren gefunden werden und Mutationen des p53 Tumorsuppressorgenes, die in 50-70% der Karzinome beschrieben werden (Klöppel et al. 2000; Lüttgens u. Klöppel 2005).

Frühere Arbeiten mit komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) haben gezeigt, das teilweise oder vollständige Verluste und Zugewinne von Chromosomen in nahezu allen untersuchten Tumoren vorkommen. Zugewinne treten auf vor allem im Bereich der Chromosomen 3q, 5p, 7p, 8q, 10q, 11q, 19q (Curtis et al. 1998), Verluste im Bereich der Chromosomen 1p, 3p, 6p, 6q, 8p, 9p, 10p, 10q, 12q, 13q, 17p, 18q, 18p, 21q, 22q (Hahn et al. 1995; Curtis et al. 1998).

Veränderungen dieser Genorte führen zur Deregulierung der dort lokalisierten Tumorsuppressorgene (beispielsweise p53 auf 17p13, p16 auf 9p21, DPC4 auf 18q, BRCA2 auf 13q, MKK4 auf 17p sowie LKB1/STK11 auf 19p und TGF ßR2 auf 3p) oder zur Aktivierung von Onkogenen (Klöppel et al. 2000; Cowgill u. Muscarella 2003; Lüttgens u. Klöppel 2005). Das in dieser Arbeit untersuchte Tumorsuppressorprotein

p53 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein. Das p53 Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13.1) lokalisiert und kodiert ein 53-kD schweres, nukleares Phosphoprotein. Die Aufgabe von p53 besteht in der Zellzykluskontrolle. p53 reagiert auf zelluläre DNA-Schäden und hemmt entweder den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus oder induziert eine Apoptose der geschädigten Zelle. Die Apoptose ist ein mehrstufiger Prozess, der zum programmierten Zelltod führt (Boschman et al.1994; Cowgill u. Muscarella 2003; Qanungo et al. 2003). Kommt es zu Mutationen, die die Funktion von p53 einschränken bzw. komplett aufheben, so können sich Zellen mit genetischen Schäden anreichern. Normalerweise wird p53 nur in so geringen Mengen exprimiert, dass es durch immunhistologische Untersuchungen nicht nachweisbar ist. In Folge von Mutationen - meist Punktmutationen - im p53 Gen jedoch, reichert sich das nicht funktionstüchtige p53 Protein im Zellkern an. In diesem Fall lässt es sich dann mit immunhistologischen Mitteln nachweisen. Bei vielen verschiedenen Malignomen zeigt sich eine solche Anreicherung des p53 Proteins (Cowgill u. Muscarella 2003; Qanungo et al. 2003). Das nicht mutierte, sog. wild-type p53 ist ein kurzlebiges Protein. Im Gegensatz hierzu akkumulieren die mutierten p53 Proteine nuklear. Diese Akkumulation kann als immunhistochemischer Marker für p53 Mutationen verwendet werden (Apple et al. 1999; Gemba et al. 2000).

Das in der Tumorgenese des duktalen Pankreaskarzioms sowohl von Zugewinnen als auch von Verlusten betroffene Chromosom 10q25 enthält unter anderem das Gen MKI67, welches für das proliferations-assoziierte Protein Ki-67 kodiert. Es sind zwei Ki-67 Isoformen mit 345 kDa und 395 kDa bekannt, die sowohl in normalen als auch neoplastischen Zellen exprimiert werden (Gerdes et al. 1991). Im Rahmen dieser Arbeit wird die Ki-67 Expression untersucht, um eine Aussage zur Proliferationsrate der Tumoren zu ermöglichen. Der monoklonale Ki-67 Antikörper detektiert und markiert das im Zellkern befindliche Antigen, das in allen aktiven Phasen der Mitose exprimiert wird (Gerdes et al. 1984; Rock et al. 1993). In der G0-Phase (Ruhe-Phase) und der sehr frühen G1-Phase findet keine Exprimierung statt. Folglich wird Ki-67 nur in wachsenden Zellen exprimiert, daher entspricht der Prozentanteil der Ki-67 positiven Zellkerne der Wachstums- beziehungsweise der Proliferationsrate. Die mittels Ki-67 ermittelte Proliferationsrate wird in der Literatur für gewöhnlich als Ki-67 Labeling Index (LI) bezeichnet (Landolt et al. 1987; Knosp et al. 1989; Rock et al. 1993; Abe et al. 1997).

Laut Klein et al. (2002) lässt sich aus diversen Studien ableiten, dass die Proliferation direkt proportional zum Grad der Dysplasie, bzw. zum Grad der Vorstufen invasiver Tumoren ist. So haben zum Beispiel carcinoma in situ einen höheren Labeling Index als Epithelläsionen mit geringer Dysplasie.

Bisher sind nur wenige amplifizierte Gene beim Pankreaskarzinom beschrieben. Zu ihnen gehören MYB (6q), AKT2 (19q) und AIB1 (20q) sowie der Wachstumsfaktorrezeptor HER2. Das HER2 (human epidermal growth receptor 2) Protoonkogen (17q22) wird je nach Literatur auch als HER2/neu beziehungsweise c-erbB-2 bezeichnet. Es kodiert einen 185kDa schweren membranständigen Tyrosinkinase-Rezeptor, der engverwandt mit dem EGF (epidermal growth factor) Rezeptor ist. Beim Pankreaskarzionom kommt es – wie beim Mammakarzinom – durch die Genamplifikation zu einer Überexpression des Her2 Proteins auf der Zelloberfläche. Während beim Mammakarzinom die Amplifikation/Überexpression von HER2/Her2 prognostisch und auch therapeutisch massiv relevant ist, liegen beim Pankreaskarzinom bisher nur relativ wenige Daten vor. So werden Amplifikationen von HER2 in etwa 20% der Pankreaskarzinome vermutet (Chao et al. 2002; Sharif et al. 2007)

Obwohl im Jahre 2002 von Haller bereits eine ergänzende Pankreaskarzinom-Therapie mit dem Her2-Inhibitor Trastuzumab (Herceptin) vorgeschlagen wurde, sind bis heute keine Studien zur Wirkung einer entsprechenden Therapie bei HER2 positiven (d.h. HER2 amplifizierten) Pankreastumoren durchgeführt worden. Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass bisher nur relativ kleine Tumorkollektive auf eine HER2 Amplifikation untersucht worden sind, und bislang keine Prognoserelevanz von HER2 für das Pankreaskarzinom gefunden wurde (Stoecklein et al. 2004; Sharif et al. 2007).

Neuere Daten aus screening Untersuchungen mit hochauflösenden DNA-Arrays zur Bestimmung von Gen-Kopiezahlveränderungen zeigen, dass auch beim Pankreaskarzinom noch bislang unentdeckte amplifizierte Gene vorliegen, die – wie HER2 – potentiell hochgradig geeignete Ziele für neue Anti-Tumortherapien sein könnten. In einer kürzlich am Institut für Pathologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf (UKE) durchgeführten Array-CGH Analyse wurde ein Amplikon auf Chromosom 7q22 entdeckt, das etwa 15 Gene umspannte. Darunter befand sich auch das potentielle Onkogen TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein). Das auf

Chromosom 7q22 liegende TRRAP-Gen kodiert ein 434 kDa schweres Protein (siehe Abb. 2) (GeneCards® 2008).



Abbildung 2: Chromosom 7 mit roter Markierung an der Stelle an der TRRAP liegt, aus Gene-Cards® (2008).

TRRAP, auch als PAF400 bezeichnet, gehört zur Familie der Proteinkinasen wie Phosphatidylinositol (PI). Trotz einer vermuteten Inaktivität der TRRAP Kinasedomaine ist TRRAP ein essentieller Faktor für die Reaktion auf DNA-Schäden. Zum einen scheint TRRAP für das Signalisieren von DNA-Doppelstrangbrüchen verantwortlich, zum anderen sorgt es für die Koordination von DNA-Doppelstrang Reparatur und Chromatin Re-Modellierung (Murr et al. 2007).

DNA wird zu Chromatin, einem sehr kompakten DNA-Protein-Komplex, aus dem die Chromosomen bestehen, in der Zelle zusammengefaltet. Alle zellulären Prozesse, die DNA als Vorlage verwenden wie beispielsweise DNA Reparaturen, benötigen ein hohes Maß an Koordination zwischen der DNA Reparatur-Abteilung und der Chromatin Modifizierung und Re-Modellierung (Murr et al. 2006).

In jeder Zelle befindet sich ein freier Vorrat an TRRAP, der entweder mit verschiedenen HAT Komplexen (<u>Histon Acetyltransferasen</u>) assoziieren kann oder diese rekrutiert, wenn ein Bedarf an Chromatin Re-Modellierung besteht (Robert et al. 2006; Murr et al. 2007).

Zusammengefasst sind die Aufgaben des TRRAP folgende: Molekulare Verbindung zwischen transkriptionaler Koaktivierung, Chromatin Re-Modellierung und essentieller DNA Metabolisierung wie Doppelstrangbruch Reparaturen (Robert et al. 2006). TRRAP und TRRAP vermittelte Histon-Acetylierung sind folglich nicht nur wie zunächst angenommen auf die Transkriptionskontrolle limitiert, sondern an allen auf Chromatin basierenden Prozessen, die die DNA als Vorlage nutzen, beteiligt (Murr et al. 2007).

Die Tatsache, dass TRRAP einen Angriffspunkt für das Adenovirus E1A Onkoprotein darstellt, könnte dafür sprechen, dass TRRAP eine wichtige Funktion in der durch virale Onkoproteine vermittelten Krebstransformation aufweist (Murr et al. 2007).

In der Evolution lässt sich TRRAP weit zurückverfolgen, so sind TRRAP-artige Gene bzw. Proteine in vielen anderen Spezies zu finden, beispielsweise in der Hausmaus (Mus musculus), der Taufliege (Drosophila melanogaster) oder auch in Pflanzen wie der Acker-Schmalwand bzw. der Schottenkresse (Arabidopsis thaliana) (Murr et al. 2007).

## 1.3 Fragestellung der Arbeit

Das Pankreas-Karzinom zeichnet sich durch eine äußerst ungünstige Prognose aus. Die Suche nach Zielproteinen für neue, genspezifische Therapien ist daher ein wichtiges Ziel der Tumorforschung.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Gewebe-Mikroarray (Tissue microarray, TMA) herzustellen, der zur raschen Validierung von neuen Kandidatengenen benutzt werden kann. Dazu sollten sowohl bekannte Marker mit Relevanz für das Pankreas-Karzinom (p53, Ki-67), als auch bislang nicht oder wenig untersuchte Marker an dem TMA analysiert werden. Dazu zählten das HER2 Onkogen, sowie das TRRAP.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

#### 2.1 Gewebe und Patienten

Zur Herstellung des Mikroarrays wurden 256 in Paraffinblöcke eingebettete duktale Adenokarzinome des Pankreas verwendet. Alle Tumoren wurden in den Jahren 1993 bis 2007 in der Visceral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Eppendorf entfernt. Alle Tumoren waren duktale Adenokarzinome des Pankreas. Sechs dieser Tumoren waren im Stadium pT1, 53 im pT2, 178 im pT3 und 15 im pT4. 15 dieser Tumoren hatten einen Differenzierungsgrad Grade 1, 122 Grade 2 und 115 Grade 3. Der

Nodalstatus war folgender: 93 pN0, 157 pN1, 1 pN2. Klinische Follow-up Daten konnten für 158 der 256 (62%) Patienten, deren Tumoren auf dem TMA repräsentiert sind, aus den Patientenakten entnommen werden.

## 2.2 Tissue Microarray - Herstellung

Ein Tissue Microarray (TMA) ist ein einziger Paraffinblock in den bis zu tausend Gewebezylinder (Durchmesser 0,6mm) aus histologisch definierten Regionen verschiedener Tumoren eingebracht werden.

Zunächst wurden von allen in Paraffin gebetteten Gewebematerialien Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte (HE-Schnitte) angefertigt. Auf den HE-Schnitten wurden dann unter mikroskopischer Sicht alle Bereiche, die den für den TMA gewünschten Tumor enthielten, rot eingezeichnet (siehe Abb. 3).



Abbildung 3: Gewebeblock mit dazugehörigem HE-Schnitt auf dem das Tumorgebiet rot eingezeichnet wurde.

Mit Hilfe eines Array-Stanzgerätes wurde folgend aus dem markierten Bereich ein Zylinder von 6µm gestanzt. Daraufhin wurde dieser Zylinder in einen leeren, gewebefreien Paraffinblock überführt. Dieser Vorgang wurde für alle Tumoren durchgeführt.

Das verwendete Array-Stanzgerät ist in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt. Hauptmerkmale der Apparatur stellen zwei unterschiedlich dicke, spitze Kanülen dar. Der dünnere Hohlzylinder hat einen äußeren Durchmesser von 6µm und dient dem Stanzen von Löchern in den zunächst leeren, den Empfängerparaffinblock, der später zum TMA wird. Die zweite Kanüle hat einen inneren Durchmesser von 6µm. Mit dieser Kanüle wird das gewünschte Tumorgewebestück aus dem Spenderblock ausgestanzt und in den Empfängerblock überführt. Die Überführung wird durch einen genau in die Kanüle passenden Stahldraht ermöglicht, der das Tumorgewebestück in das angefertigte Loch im Empfängerblock ausstößt.

Abbildung 6 zeigt einen von vielen Schnitten des Pankreas TMA, an denen die verschiedenen Untersuchungen durchgeführt werden können.

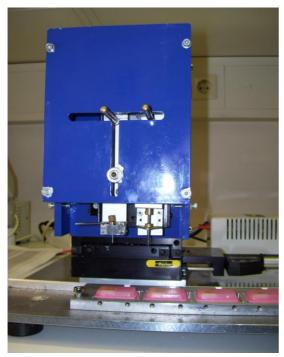


Abbildung 4: Gewebearray-Stanzgerät.



Abbildung 5: Detailaufnahme der zwei Nadeln.

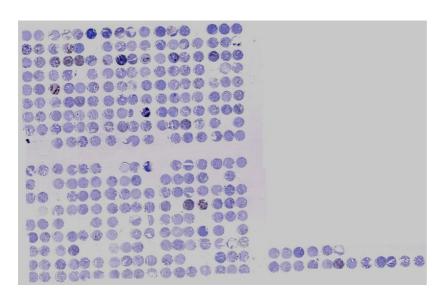


Abbildung 6: IHC Ki-67 Schnitt des Pankreas TMA. Der Durchmesser der einzelnen Gewebespots beträgt jeweils 0,6mm.

## 2.3 Immunhistochemie (IHC)

Die verwendeten Antikörper, ihre Verdünnungen und die Art der Schnitt-Vorbehandlung sind in Tabelle 1 dargestellt. Zur Vorbereitung der Immunhistochemie wurden die Schnitte über Nacht in Xylol entparaffiniert. Die Inkubation mit dem Antikörper gemäss Tabelle 1 erfolgte in einem zweistündigen Zeitraum bei Raumtemperatur. Zum Nachweis des gebundenen Antikörpers wurde das EnVision System der Firma DAKO (Glostrup, Dänemark) eingesetzt. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin genommen.

Protein	Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Vorbehandlung
p53	DAKO p53 DO- 7, mouse mono- clonal	DAKO Cyto- mation, Glost- rup, Dänemark	1:200	5min Autoclav, pH 9.0 (Retrievit, #BS- 1009-00, BioGenex, San Ramon, CA)
Ki-67	MIB-1, mouse monoclonal	DAKO Cyto- mation, Glost- rup, Dänemark	1:400	Mikrowelle 100°C/ 20 min, pH 9.0, Tar- get Retrieval Soluti- on <sup>TM</sup>

Tabelle 1: Verwendete IHC Antikörper.

Die Auswertung erfolgte für p53 und für Ki-67 nach einem unterschiedlichen Procedere. Für p53 wurde für jeden Gewebespot die Färbeintensität in einer 4-stufigen Skala (0, 1+, 2+, 3+) bestimmt, und der Anteil der gefärbten Tumorzellen ermittelt. Aus

diesen beiden Parametern wurde das p53 IHC Resultat nach folgendem Schema (siehe Tab. 2) ermittelt:

p53 Färbeintensität	% der gefärbten Tumorzellen	p53 IHC Resultat
0	0	Negativ
1+ 2+	≤ 70 oder ≤ 30	Schwach
1+ 2+ 3+	> 70 oder > $30 \le 70$ oder $\le 30$	Moderat
2+ 3+	> 70 oder > 30	Stark

Tabelle 2: Schema der p53 IHC Resultateinteilung.

Für Ki-67 wurde in jedem Gewebespot der Anteil der positiven Tumorzellen in Prozent bestimmt. Alle Tumoren mit >1% Ki-67 positiven Tumorzellen wurde als positiv gewertet. Zudem wurden folgende Schwellenwerte für eine semi-quantitative Bestimmung der Expressionsstärke definiert: Ki-67 Expressionen <5% = sehr gering; 5-10% = gering; 10-20% = mittel und >20% = stark.

#### 2.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Für die zweifarbige TRRAP FISH-Analyse wurden 4µm dicke TMA-Schnitte eingesetzt. Diese wurden vor der Hybridisierung entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt. Dies geschah gemäß des Protokolls des "Paraffin Pretreatment Reagent Kit" (Vysis, Downers Grove, IL).

Zur Detektion der TRRAP Kopiezahl wurde eine selbst hergestellte digoxigenierte FISH-Sonde (PAC RP5-1186C1, RZPD, Deutschland) eingesetzt, welche eine 112 kb DNA-Sequenz innerhalb des TRRAP Genes detektiert. Als Referenz wurde eine kommerzielle Sonde für das Zentromer des Chromosom 7 (Spectrum orange, Vysis) eingesetzt. Die Markierung der selbst hergestellten DNA-Sonde mittels Nick-Translation wurde mit dem "Nick Translation System" (Invitrogen) vollzogen. Die Detektion der hybridisierten TMA-Schnitte wurde mit dem "Fluorescent Antibody Enhancer Set" (Roche) durchgeführt.

Die HER2 Kopiezahl wurde mit dem PathVysion kit (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt. Dieser Kit besteht aus einem gebrauchsfertigen Gemisch aus einer Spectrum orange markierten HER2 Gensonde und einer Spectrum grün markierten Zentromer 17 Referenzsonde. Die Vorbehandlung der Objektträger erfolgte wie für TRRAP beschrieben. Eine separate Detektion der Sonden ist nicht nötig.

#### 2.5 Statistik

Für die Analyse von Assoziationen zwischen molekularen Veränderungen und dem Tumorphänotyp wurde der Chi-Quadrat Test angewendet. Um den Einfluss der molekularen Befunde auf das Patientenüberleben zu untersuchen, wurden Kaplan-Meier Analysen und Log-Rank Tests durchgeführt.

#### 3 ERGEBNISSE

## 3.1 p53 Expression

Die p53 Expression konnte in 230/256 (89,8%) der Tumoren des TMA erfolgreich analysiert werden. Insgesamt 26 Gewebe waren nicht analysierbar, weil entweder der Gewebespot auf dem TMA-Schnitt fehlte (n=1) oder weil keine Tumorzellen im Gewebe enthalten waren (n=25). Von den 230 analysierbaren Tumoren hatten über die Hälfte (52,6%) eine detektierbare p53 Expression, die zu etwa gleichen Anteilen (15-19%) schwach, moderat oder stark war. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der p53 Expressionsstärke und histo-pathologischen Parametern wie Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Nodalstatus oder dem Fernmetastasenstatus war nicht vorhanden. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgelistet. Beispiele für Tumoren mit verschiedengradiger p53 Positivität sind in Abbildung 7 präsentiert.

	p53 IHC Resultate							
		n (auf TMA)	n (analy- sierbar)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
Alle Tu- moren		256	230	47,4	18,7	14,8	19,1	
	pT1	6	4	75,0	0,0	0,0	25,0	
Tumorsta-	pT2	53	49	38,8	18,4	18,4	24,5	0.6062
dium	pT3	178	159	49,1	19,5	13,8	17,6	0,6063
	pT4	15	14	50,0	7,1	21,4	21,4	
	G1	15	13	76,9	0,0	7,7	15,4	
Grad	G2	122	113	42,5	22,1	14,2	21,2	0,1406
	G3	115	100	51,0	17,0	15,0	17,0	
Nodal-	pN0	93	83	44,6	15,7	18,1	21,7	0.6020
status	pN1	158	142	49,3	19,7	13,4	17,6	0,6028
Matastassa	pM0	1	1	0,0	0,0	0,0	100,0	0.6500
Metastasen	pM1	17	14	35,7	7,1	14,3	42,9	0,6580

Tabelle 3: Resultate der immunhistochemischen Untersuchung von p53.

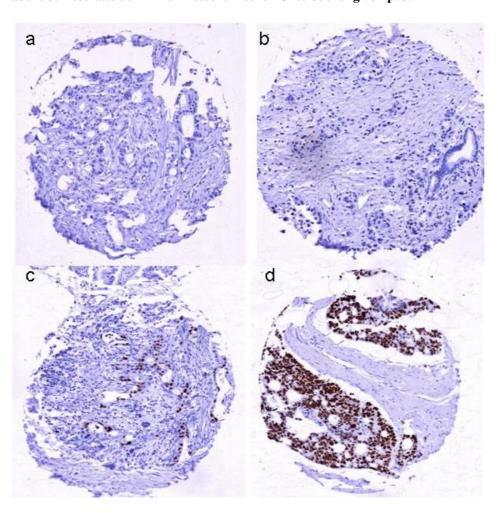


Abbildung 7: IHC p53: a) negativ, b) schwach, c) moderat, d) stark.

## 3.2 Ki-67 Expression

Die Ki-67 Expression konnte in 229/256 (89,5%) der Tumoren des TMA erfolgreich analysiert werden. Insgesamt 27 Gewebe waren nicht analysierbar, weil entweder der Gewebespot auf dem TMA-Schnitt fehlte (n=1) oder weil keine Tumorzellen im Gewebe enthalten waren (n=26). Von den 229 analysierbaren Tumoren zeigten 71,6% eine detektierbare Ki-67 Expression. Diese war allerdings in ca. 55% der positiven Fälle nur sehr schwach (Ki-67 LI <5%). Eine mittel bis hohe Expression (Ki-67 LI ≥10%) wurde in etwa einem Viertel der Tumoren gesehen, dabei handelte es sich vor allem um entdifferenzierte (G3) Tumoren. Allerdings war der Unterschied zu den (wenigen) gut differenzierten Tumoren des Kollektives nicht signifikant (p=0,5709). Der mittlere Ki-67 LI betrug 10,5%. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgelistet. Beispiele für Tumoren mit verschiedengradiger Ki-67 Expression sind in Abbildung 8 gezeigt.

Ki-67 IHC Resultate									
		n (auf TMA)	n (analy- sierbar)	negativ (%)	sehr gering (%)	gering (%)	mittel (%)	hoch (%)	p- Wert
Alle Tumo- ren		256	229	28,4	39,7	7,0	10,5	14,4	
	pT1	6	4	50,0	50,0	0,0	0,0	0,0	
Tumorsta-	pT2	53	49	38,8	28,6	4,1	12,2	16,3	0,6921
dium	рТ3	178	159	25,9	41,8	8,2	9,5	14,6	
	pT4	15	14	21,4	50,0	7,1	7,1	14,3	
	G1	15	13	38,5	46,2	0,0	7,7	7,7	
Grad	G2	122	113	27,7	41,1	8,9	8,0	14,3	0,5709
	G3	115	100	28,0	39,0	6,0	13,0	14,0	
Nodal-	pN0	93	83	31,3	42,2	6,0	12,0	8,4	0.1127
status	pN1	158	142	27,7	37,6	7,8	8,5	18,4	0,1137
Mataataaaa	pM0	1	1	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0.0050
Metastasen	pM1	17	14	53,3	26,7	13,3	0,0	6,7	0,0950

Tabelle 4: Resultate der immunhistochemischen Untersuchung von Ki-67.

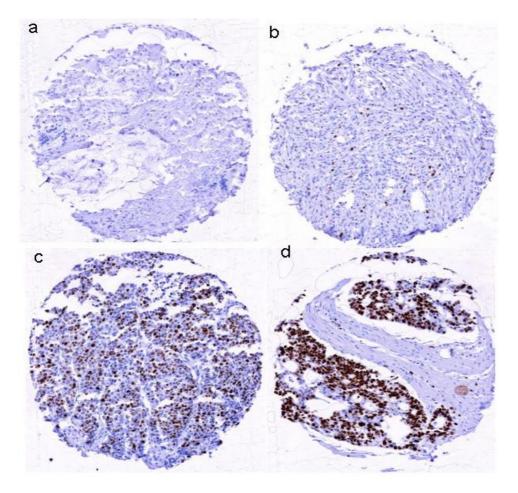


Abbildung 8: IHC Ki-67: a) negativ, b) sehr gering, c) mittel, d) hoch.

## 3.3 Korrelation zwischen p53 und Ki-67

Bei 227 Tumoren konnten IHC Daten sowohl für p53 als auch für Ki-67 erhoben werden. Beim Vergleich der Proteinexpression zeigte sich, dass Tumoren mit starker p53 Positivität besonders häufig eine erhöhte Ki-67 Expression zeigten (p=0,0454, siehe Abb. 9). Bei 34 p53 negativen Tumoren zeigten nur 17% der Fälle eine mittlere bis starke Ki-67 Expression. Bei 43 Tumoren mit starker p53 Expression hingegen fand sich in über 40% der Tumoren eine entsprechend erhöhte Ki-67 Expression.

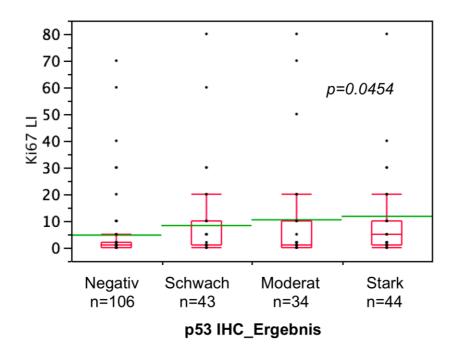


Abbildung 9: Korrelation zwischen p53 und dem Ki-67 Färbeindex (Ki-67 LI); ANOVA Test. Die grüne Linie stellt die Mittelwerte dar.

## 3.4 TRRAP Amplifikation

Bei 208 von 256 (81,3%) der Tumoren des TMA konnte ein TRRAP Status bestimmt werden. In 45 Fällen waren keine FISH-Signale in den Zellkernen erkennbar. In weiteren 3 Fällen konnte keine Auswertung erfolgen, da hier der Gewebespot auf dem TMA-Schnitt fehlte. Eine TRRAP Amplifikation zeigten 4 der 208 (1,9%) analysierbaren duktalen Adenokarzinome. Dabei handelte es sich in allen Fällen um geringgradige Amplifikationen mit weniger als 10 TRRAP-Genkopien (siehe Abb. 10).

Alle vier amplifizierten Tumoren hatten einen Differenzierungsgrad von G3, einer der Tumoren ein Tumorstadium von pT2, zwei von pT3 und einer von pT4. Ein Tumor hatte einen Nodalstatus von pN0, die anderen drei von pN1.

Einer der vier amplifizierten Tumoren zeigte auch eine HER2 Amplifikation.

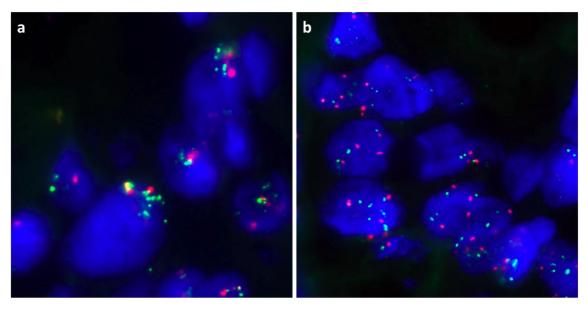


Abbildung 10: Beispiele für TRRAP Amplifikationen. Die roten Signale sind gegen die Zentromerregion des Chromosoms 7 gerichtet, die grünen Signale gegen die Kopiezahl des TRRAP-Genes auf Chromosom 7q22. Pankreas-Karzinome mit a) ca. 8-10 Kopien und b) ca. 7-8 Kopien des TRRAP Genes, die auf 3 Kopien des Chromosoms 7 verteilt sind.

## 3.5 HER2 Amplifikation

Von den 256 Tumoren des TMA konnte der HER2 Status in 216 Fällen (84,4%) bestimmt werden. Von 40 konnte kein Ergebnis erhalten werden, weil entweder keine FISH-Signale in den Zellkernen zu erkennen waren (n=38) oder weil der Gewebespot auf dem TMA-Schnitt fehlte (n=2). Zehn der 216 (4,6%) analysierbaren Tumoren wiesen HER2 Amplifikationen auf. Dabei handelte es sich in den meisten Fällen um geringgradige Amplifikationen mit weniger als 10 HER2-Genkopien. In einem Fall wurden jedoch etwa 20-30 Genkopien gezählt (siehe Abb. 11).

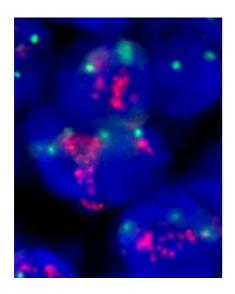


Abbildung 11: Pankreaskarzinom mit hochgradiger HER2 Amplifikation.

Der Differenzierungsgrad war bei sieben Tumoren G2 und bei drei Tumoren G3. Zwei der Tumoren hatten ein Tumorstadium von pT2, sieben ein pT3 und ein Tumor ein pT4. Zwei Tumoren hatten ein Nodalstatus von pN0, die anderen waren pN1. Tendenziell zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer HER2-Amplifikation und immunhistochemischer p53-Positivität (p=0.0522, siehe Abb. 12)

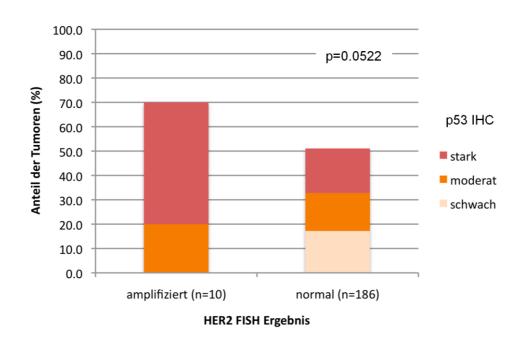


Abbildung 12: Vergleich zwischen dem HER2 Status und dem p53 Status

Der Vergleich mit dem Ki-67 LI in 195 Tumoren zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern (p=0.9038, siehe Abb. 13).

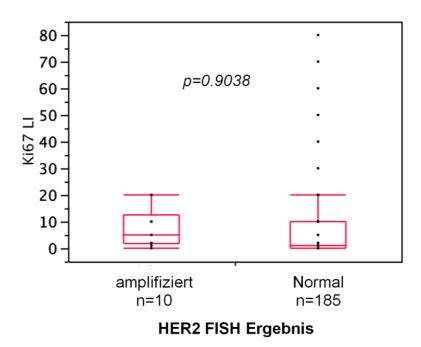


Abbildung 13: Vergleich zwischen dem HER2-Status und der Zellproliferation gemessen an der Expression von Ki-67.

Aufgrund der geringen Anzahl amplifizierter Tumoren waren statistische Berechnungen zum Vergleich der HER2-Amplifikationsfrequenz in Tumoren mit unterschiedlichem Stadium und Differenzierungsgrad nicht sinnvoll.

## 3.6 Kaplan-Meier Analysen

Die für 62% der Patienten bekannten klinischen Follow-up Daten zeigten keinen konkreten Einfluss (p=0.3593) der p53 Expression auf das Patientenüberleben (siehe Abb. 14).

Dagegen zeigte die Ki-67 Expression einen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit (p=0.0216, siehe Abb. 15).

Wegen der geringen Amplifikationszahl von HER2 und TRRAP waren Kaplan-Meier Analysen nicht sinnvoll.

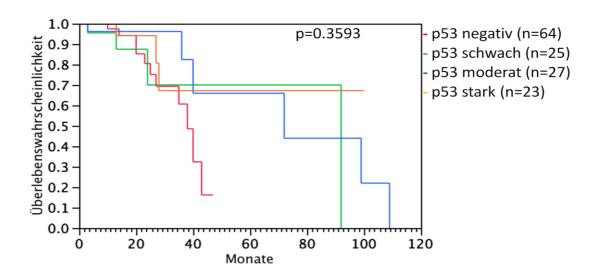


Abbildung 14: Kaplan-Meier Analyse zur Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die p53 Expression. Die Gruppenzuteilung entspricht dem in Tabelle 2 aufgeführten Schema.

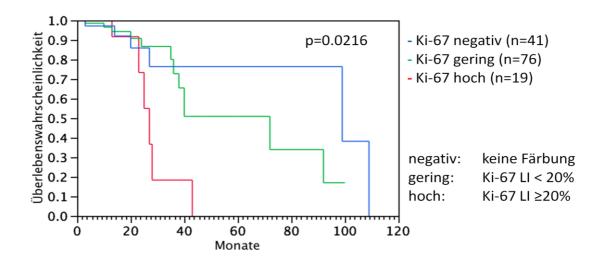


Abbildung 15: Kaplan-Meier Analyse zur Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die Ki-67 Expression. Um eine übersichtlichere Darstellung zu erreichen, wurden die ansonsten verwendeten Gruppen "sehr gering", "gering" und "mittel" zu einer Gruppe "gering" zusammengefasst.

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurden die Prävalenz und die Assoziation zu histopathologischen Parametern von unterschiedlichen molekularen Markern (p53, Ki-67, HER2, TRRAP) beim Pankreaskarzinom untersucht.

Das Fehlen statistisch signifikanter Assoziationen von p53 mit Tumorstadium, Grad, oder der Patientenprognose war zu vermuten. So wurde beispielsweise die prognostische Relevanz von p53 bisher in mindestens 20 unterschiedlichen Studien untersucht, wobei nur in wenigen Studien eine signifikante prognostische Relevanz der p53 Expression gefunden wurde. Alle, bis auf eine der Studien, die eine signifikante prognostischen Relevanz aufzeigen, sprechen von einer schlechteren Prognose bei p53 Expression. Konträr hierzu besagt die Studie (Bold et al. 1999), dass p53 Expression zu einem signifikant längeren Überleben geführt hat. Dies gilt ebenso für Assoziationen von p53 mit dem Tumorstadium oder Malignitätsgrad. Allerdings wurden in diesen Studien (Apple et al. 1993; Scarpa et al. 1993; Suzuki u. Takano 1993; Boschman et al. 1994; DiGiuseppe et al. 1994; Ruggeri et al. 1996; Dergham et al. 1997; Dergham et al. 1997; Virkajarvi et al. 1997; Coppola et al. 1998; Gansauge et al. 1998; Bold et al. 1999; Karademir et al. 2000; Linder et al. 2001; Islam et al. 2001; Nio et al. 2001; Chen et al. 2003; Jeong et al. 2005; Jinfeng et al. 2007; Awadallah et al. 2008) nur verhältnismäßig geringe Fallzahlen (zwischen 11 und 82 Tumoren) untersucht, diverse Kriterien für die Bewertung der p53 Positivität angewandt, oder verschiedene Antikörper mit unterschiedlichen Protokollen verwendet. Beispiele für die verschiedenen Schwellenwerte für p53 Positivität und die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Autor	Jahr	n	p53 positiv, wenn	% positiv	Antikörper
Linder	2001	40	≥1% der Tumorzellen mit mindestens schwa- cher Färbung	42,5	DO-7 monoclonal anti- body (Dako, Glostrup, Dänemark)
Scarpa	1993	34	≥5% der Tumorzellen mit mindestens schwa- cher Färbung	61,8	monoclonal antibody PAb18O1; CM1 anti-p53 polyclonal antibody
Nio	2001	63	≥20% der Tumorzellen mit mindestens schwa- cher Färbung	50,8	Anti-p53 monoclonal antibody (mAb) (Ab-6, DO-1)

Tabelle 5: p53 Scoring - Kriterien.

Dementsprechend schwankt der Anteil der Pankreaskarzinome, die als p53 positiv gewertet werden, stark. Eine Auswertung der Daten aus 19 IHC Studien (Apple et al. 1993; Scarpa et al. 1993; Suzuki u. Takano 1993; Boschman et al. 1994; DiGiuseppe et al. 1994; Dergham et al. 1997; Dergham et al. 1997; Virkajarvi et al. 1997; Coppola et al. 1998; Gansauge et al. 1998; Bold et al. 1999; Karademir et al. 2000; Linder et al. 2001; Islam et al. 2001; Nio et al. 2001; Chen et al. 2003; Jeong et al. 2005; Jinfeng et al. 2007; Awadallah et al. 2008) zeigt, das die p53 Positivität bei diesen Studien im Median bei 47,1% (min. 39,5%; max. 90,9%) liegt. Dieser Wert stimmt überein mit den 52,6% p53 positiver Fälle aus der vorliegenden Arbeit.

Im Vergleich zur Literatur stellt der in dieser Arbeit hergestellte und verwendete TMA das bisher größte Kollektiv von duktalen Adenokarzinomen des Pankreas dar, die auf p53 untersucht worden sind. Zudem wurden alle Tumoren gleichzeitig und unter identischen experimentellen Bedingungen analysiert. Ein solcher, maximal hoher Grad an Standardisierung ist praktisch nur mit Gewebearrays realisierbar. Somit kann mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden, dass ein Zusammenhang von p53 mit histo-pathologischen Parametern des Pankreaskarzinoms lediglich aufgrund einer zu geringen Fallzahl "übersehen" worden ist. Vielmehr weisen die Daten darauf hin, dass p53 Veränderungen bereits frühzeitig bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms auftreten. So ist es denkbar, dass ein Teil der Tumoren durch einen p53 Defekt entsteht und daher bereits als pT1 Tumor p53 positiv ist. Das weitere Wachstum zum pT2 und pT3 Tumor ändert dann den p53 Status nicht mehr.

Diese Annahme wird durch Untersuchungen von p53 an prämalignen Pankreasläsionen gestützt. So fanden Boschman et al. (1994), dass bei fünf von sechs (83%) p53 positiven Pankreaskarzinomen auch bereits die Vorstufen wie CIS und Hyperplasien mit Atypien ebenfalls p53 positiv waren. Sogar die Hyperplasien ohne Atypien waren in drei von fünf (60%) analysierbaren Fällen ebenfalls p53 positiv. Die häufige p53 Positivität in Karzinomvorstufen wird von Maitra et al. (2003) bestätigt, die in vier von sieben (57%) untersuchten PanIN-3 eine p53 Expression beschreiben. Dieser Zusammenhang ist etwas weniger deutlich bei einer Studie von Apple et al. (1999), die zwar in 13/15 (87%) der Karzinome, aber nur in einer von acht (13%) der zugehörigen Dysplasien eine p53 Expression fand.

Ähnlich wie für p53 zeigte sich auch für Ki-67 nur ein schwacher Trend für eine Assoziation mit dem Tumorstadium und -grad in der vorliegenden Untersuchung. Diese Ergebnisse bestätigen bereits publizierten Studien, in denen ebenfalls keine signifikante Assoziation zwischen dem Ki-67 LI und dem Tumorphänotyp gefunden wurde (Gansauge et al. 1998; Linder et al. 2001; Stanton et al. 2003; Lebe et al. 2004). Allerdings war der mittlere Ki-67 LI in der vorliegenden Untersuchung (10,5%) deutlich geringer als in fünf publizierten Studien (Klein et al. 2002; Stanton et al. 2003; Lebe et al. 2004; Jeong et al. 2005; Sagol et al. 2005). Diese Studien haben zwar unterschiedliche Antikörper verwendet, dennoch schwanken die Ergebnisse nur relativ gering. Der mittlere Ki-67 LI liegt zwischen etwa 28% (Stanton et al. 2003) und 37% (Klein et al. 2002). Solche Unterschiede sind nicht untypisch für TMA Studien. Selbst geringe Abweichungen des IHC Protokolls, oder Schwankungen in der Färbeeffizienz, beispielsweise durch eine nicht-optimale Antikörper Detektion, wirken sich auf alle Spots des TMAs gleichmäßig aus. Es ist denkbar, dass eine Wiederholung der Färbung an einem anderen Tag zu einer deutlich stärkeren Färbung und somit zu einem höheren Prozentsatz gefärbter Zellkerne und Tumoren führen würde. Allerdings haben diese Schwankungen in der Regel keinen relevanten Einfluss auf die statistischen Ergebnisse einer TMA Analyse. Selbst bei suboptimaler Qualität sind Assoziationen zwischen molekularen Markern und dem Tumorphänotyp gut reproduzierbar. So zeigt zum Beispiel die Studie von Mirlacher et al. (2004), dass auch aus einer qualitativ schlechten IHC durch ältere Schnitte eine geringere Rate von positiven Fällen resultiert. Die bekannte prognostische Relevanz von ER, PR, E-Cadherin beim Mammakarzinom kann aber dennoch problemlos auch an diesen nicht optimalen Experimenten gefunden werden. Es ist daher nicht davon auszugehen, dass eine mögliche Assoziation zwischen der Ki-67 Positivität und der Progression des Pankreaskarzinoms allein aufgrund technischer Probleme unerkannt geblieben ist.

Der Vergleich zwischen der p53 Expression und dem Ki-67 Status zeigte, dass Tumoren mit starker p53 Positivität eine höhere Proliferationsrate aufweisen als p53 negative oder nur schwach positive Tumoren. Dieser Befund passt gut dazu, dass es sich bei den immunhistochemisch p53 positiven Tumoren um solche mit inaktivierenden p53 Mutationen handelt, deren normale Zellzykluskontrolle nicht mehr funktioniert. Funktionelles p53 gilt als mit Immunhistochemie nicht nachweisbar, weil das p53 Protein eine Halbwertzeit von nur etwa 20 Minuten hat (Runnebaum et al.

1993). Dadurch wird p53 praktisch niemals in so hoher Konzentration in der Zelle akkumuliert, als dass es immunhistochemisch zur Darstellung kommen könnte (Apple et al. 1999; Cowgill u. Muscarella 2003). Tumoren mit immunhistochemisch detektierbarem p53 weisen dagegen in der Regel inaktivierende Mutationen auf, die mit einer massiv erhöhten Halbwertzeit des Proteins einhergehen. Somit handelt es sich bei p53 IHC positiven Tumoren immer um solche mit defekter Zellzykluskontrolle, die sich dann in einer erhöhten Ki-67 Anfärbung darstellen.

Eine HER2 Amplifikation wurde in der vorliegenden Untersuchung in 4,6% der Pankreaskarzinome gefunden. Dabei handelte es sich meist nur um geringgradige Amplifikationen mit 4-6 HER2 Genkopien. Lediglich in einem Fall wurden massive HER2 Amplifikationen mit großen Signalclustern gefunden. Die HER2 Amplifikationsrate ist damit deutlich geringer als in der Literatur (11-25%) beschrieben (Chao et al. 2002; Stoecklein et al. 2004; Hansel et al. 2005; Tsiambas et al. 2006; Sharif et al. 2007). Allerdings stammen diese Daten von bislang nur 4 Studien mit FISH und einer weiteren mit CISH, in denen insgesamt 154 (n=9, n=32, n=50, n=63) Tumoren (FISH) und 50 Tumoren (CISH) analysiert worden sind. Mit der eigenen Studie (n=216) liegt somit das bislang größte Kollektiv an HER2-analysierten Pankreaskarzinomen vor. Es ist durchaus denkbar, dass die diskrepanten Ergebnisse durch die geringe Probenzahl in den vorgenannten Studien verursacht werden. Zusätzlich könnte ein Selektions-Bias im Probenkollektiv (beispielsweise eine hohe Fraktion von fortgeschrittenen, metastasierten Tumoren) zu einer markant höheren Rate von HER2 amplifizierten Tumoren geführt haben. Tatsächlich wurden in drei der vier vorgenannten Publikationen entweder nur Tumoren des Stadiums 3 (Sharif et al. 2007), oder "fortgeschrittene" Tumoren (Chao et al. 2002), oder zu gleichen Teilen pT2 und pT3 Tumoren untersucht (Stoecklein et al. 2004).

Die klinische Bedeutung von HER2 Amplifikationen im Pankreaskarzinom ist noch weitgehend unklar. So konnte in den wenigen bisherigen Studien weder eine Assoziation zwischen dem Vorliegen der Amplifikation und dem Tumorstadium oder Malignitätsgrad (Stoecklein et al. 2004), noch mit der Patientenprognose (Sharif et al. 2007) gefunden werden. Auch in der vorliegenden Studie konnten aufgrund der geringen Anzahl HER2 amplifizierter Fälle keine statistisch sinnvollen Analysen gemacht werden.

Haller (2002) empfiehlt die Anti-Her2 Therapie beim Pankreaskarzinom als Teil einer Kombinationstherapie nach erfolgter Therapie mit Gemcitabin. Jedoch gibt es bisher keine Studien, die einen Erfolg einer Anti-Her2 Therapie (beispielsweise mit Herceptin) beim Pankreaskarzinom belegen könnten. Die Annahme, dass ähnlich wie beim Mammakarzinom eine solche Behandlung einen Vorteil für den Patienten bringen könnte, ist daher spekulativ.

Eine Amplifikation der chromosomalen Bande 7q22 wurde in einer vorhergehenden Studie mittels array komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) in einem Pankreaskarzinom gefunden. Der amplifizierte Bereich umfasste sechs potentielle und neun bekannte Gene, darunter TAC1, ASNS, LMTK2, BHLHB8, BRI3, BAIAP2L1, NPTX2, TMEM130 und TRRAP. Vor allem TRRAP hat eine potentielle onkogene Funktion, da es ein essentieller Kofaktor im Signalweg sowohl des cMYC als auch des E1A/E2F Transkriptionsfaktors ist. Zumindest in einer weiteren array-CGH-Studie wurde das Amplifikon ebenfalls gefunden, sowie mit RNA-Analysen bestätigt, das TRRAP auch tatsächlich exprimiert wird (Loukopoulos et al. 2007). Aufgrund dieser Daten wurde eine FISH Sonde gegen TRRAP hergestellt und auf dem TMA untersucht. Da nur 1,9% der analysierbaren Tumoren eine TRRAP Amplifikation zeigten, erscheint TRRAP jedoch für die Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms von untergeordneter Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde ein Gewebearray hergestellt. Dieser ermöglicht es, schnell eine Vielzahl von molekularen Markern hinsichtlich ihrer Assoziation zu histopathologischen Parametern des Pankreas-Karzinoms zu untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen gut zu den publizierten Daten passen. Am Beispiel des TRRAP konnte zudem gezeigt werden, dass der TMA auch geeignet ist, um neue Gene mit potentieller Relevanz für das Pankreaskarzinom zu validieren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde aus einem Kollektiv von 256 Pankreaskarzinomen ein Gewebemikroarray (TMA) hergestellt. Für alle Tumoren wurden histopathologische Daten gesammelt und in einer Datei den Gewebespots zugeordnet.

Um die Validität dieser Daten sowie die Verwendbarkeit des TMAs für molekularpathologische Untersuchungen zu demonstrieren, wurde die bereits häufig untersuchte p53 und Ki-67 Expression immunhistochemisch analysiert. Des Weiteren wurden die Amplifikationen von HER2 und TRRAP mittels FISH Untersuchungen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die p53 Positivität mit 52,6% positiver Fälle sich durchaus mit den Ergebnissen anderer Studien deckt und damit für die gute Verwendbarkeit des TMAs spricht. Der mittlere Ki-67 LI der untersuchten Tumoren betrug 10,5%, wobei ent-differenzierte (G3) Tumoren zumindest tendenziell eine höhere Proliferationsrate zeigten (LI=14%) als gut differenzierte (G1) Tumoren (LI=7%). Eine HER2 Amplifikation wurde in der vorliegenden Untersuchung in 4,6% der Pankreaskarzinome gefunden. Lediglich 1,9% der analysierbaren Tumoren zeigten eine TRRAP Amplifikation. Dieses Ergebnis spricht gegen die Theorie, dass TRRAP eine wichtige Rolle für die Entstehung und Progression von Pankreaskarzinom ausüben könnte.

Die vorliegende Studie zeigt, wie mit Hilfe der TMA Technologie bedeutende Daten an einer wichtigen Tumorentität erhoben werden können. Der in dieser Arbeit hergestellte Array wird für zahlreiche nachfolgende Analysen, insbesondere von bislang unbekannten potentiell relevanten Genen und Proteinen, eine wichtige Ressource sein.

## 6 LITERATUR

Abe T, Sanno N, Osamura Y R, Matsumoto K (1997): Proliferative potential in pituitary adenomas: measurement by monoclonal antibody MIB-1. *Acta Neurochir*, 139:613-18.

Adler G (2004): Has the biology and treatment of pancreatic diseases evolved? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18:83-90.

Apple SK, Hecht JR, Lewin DN, Jahromi SA, Grody WW, Nieberg RK (1999): Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53, and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis. *Hum Patho*, 30:123–29.

Awadallah NS, Shroyer KR, Langer DA, Torkko KC, Chen YK, Bentz JS, Papkoff J, Liu W, Nash SR, Shah RJ (2008): Detection of B7-H4 and p53 in pancreatic cancer: potential role as a cytological diagnostic adjunct. *Pancreas*, 36:200-06.

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (Hrsg.) (2008): Leitlinie Onkologie: Exokrines Pankreaskarzinom, http://leitlinien.net, 01.05.2008.

Beger H G, Rau B, Gansauge F, Leder G, Schwarz M, Poch B (2008): Bauchspeicheldrüsenkrebs – Heilungschancen minimal *Dtsch Ärzteblatt*, 105:255-62.

Biankin AV, Kench JG, Biankin SA., Lee C-S, Morey AL, Dijkman FP, Coleman MJ, Sutherland RL, Henshall SM (2004): Pancreatic intraepithelial neoplasia in association with intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas, *Am J Surg Pathol*, 28:1184-92.

Bold RJ, Hess KR, Pearson AS, Grau AM, Sinicrope FA, Jennings M, McConkey DJ, Bucana CD, Cleary KR, Hallin PA, Chiao PJ, Abbruzzese JL, Evans DB (1999): Prognostic factors in resectable pancreatic cancer: p53 and bcl-2. *J Gastrointest Surg*, 3:263-77.

Boschman CR, Stryker S, Reddy J K, Rao MS (1994): Expression of p53 protein in precursor lesions. *American journal of Pathology*, 6:1291-95.

Chao Y, Liu JM, Li AF, Perng CL, Tiu CM, King KL, Chen LT, Lin WC, Lan C, Whang-Peng J (2002): Palliative MEFLEP therapy in advanced pancreatic cancer: excellent response in a patient with Her-2/neu amplification. *Pancreas*, 25:10-14.

Chen XL, Zhang QH, Ni QX (2003): The relationship between tumor suppressor genes p14ARF and p53 expression and biological behavior of pancreatic carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 83:868-71.

Coppola D, Lu L, Fruehauf JP, Kyshtoobayeva A, Karl RC, Nicosia SV, Yeatman TJ (1998): Analysis of p53, p21WAF1, and TGF-beta1 in human ductal adenocarcinoma of the pancreas: TGF-beta1 protein expression predicts longer survival. *Am J Clin Pathol*, 110:16-23.

Cowgill SM, Muscarella P (2003): The Genetics of Pancreatic Cancer. Am J Surg, 186:279-86.

Curtis LJ, Li Y, Gerbault-Seureau M, Kuick R, Dutrillaux A-M, Goubin G, Fawcett J, Cram S, Dutrillaux B, Hanash S, Muleris M (1998): Amplification of DNA Sequences from Chromosome 19q13.1 in Human Pancreatic Cell Lines. *Genomics*, 53:42–55.

Day J, DiGiuseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN, Kern SE, Hruban RH (1996): Immunohistochemical Evaluation of *HER-2/neu* Expression in Pancreatic Adenocarcinoma and Pancreatic Intraepithelial Neoplasms. *Human Patholog*, 27:119-24.

Dergham ST, Dugan MC, Joshi US, Chen YC, Du W, Smith DW, Arlauskas P, Crissman JD, Vaitkevicius VK, Sarkar FH (1997): The clinical significance of p21(WAF1/CIP-1) and p53 expression in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 80:372-81.

Dergham ST, Dugan MC, Kucway R, Du W, Kamarauskiene DS, Vaitkevicius VK, Crissman JD, Sarkar FH (1997): Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol*, 21:127-43.

DiGiuseppe JA, Hruban RH, Goodman SN, Polak M, van den Berg FM, Allison DC, Cameron JL, Offerhaus GJ (1994): Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Pathol*, 101:684-88.

Gansauge F, Gansauge S, Schmidt E, Müller J, Beger HG (1998): Prognostic significance of molecular alterations in human pancreatic carcinoma--an immunohistological study. *Langenbecks Arch Surg*, 383:152-55.

Gemba K, Ueoka H, Kiura K, Tabata M, Harada M (2000): Immunohistochemical detection of mutant p53 protein in small-cell lung cancer: relationship to treatment outcome. *Lung Cancer*, 29:23-31.

GeneCards® (Hrsg.) (2008): TRRAP Gene, http://www.genecards.org/cgibin/carddisp.pl?gene=TRRAP, 14.09.2008.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983): Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31:13-20.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H H, Schwab U, Stein H (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation - associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133:1710-15.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD (1991): Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation - associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*, 138:867–73.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) (Hrsg.) (2007): Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends, 5. Auflage, http://gekid.de, 31.10.2007.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) (Hrsg.) (2009): Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends, 6. Auflage, http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/Doc/kid2008.pdf, 04.05.2009.

Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, Offerhaus JA (2000): Very High Risk of Cancer in Familial Peutz-Jeghers Syndrome. *Gastroenterology*, 119:1447-53.

Hahn SA, Seymour AB, Hoque S, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, Carlos Caldas, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1995): Allelotype of Pancreatic Adenocarcinoma Using Xenograft Enrichment. *Cancer research*, 55:4670-75.

Hall P, Wilentz RE, de Klerk W, Bornman PP (2002): Premalignant Conditions of the Pancreas. *Pathology*, *34:504-17*.

Haller DG (2002): Future directions in the treatment of pancreatic cancer. *Semin Oncol*, 29:31-39.

Hansel DE, Ashfaq R, Rahman A, Wanzer D, Yeo CJ, Wilentz RE, Maitra A (2005): A subset of pancreatic adenocarcinomas demonstrates coamplification of topoisomerase IIalpha and HER2/neu: use of immunolabeling and multicolor FISH for potential patient screening and treatment. *Am J Clin Pathol*, 123:28-35.

Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJ (2001): Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: a New Nomenclature and Classification System for Pancreatic Duct Lesions. *Am J Surg Pathol*, 25:579-86.

Islam HK, Fujioka Y, Tomidokoro T, Sugiura H, Takahashi T, Kondo S, Katoh H (2001): Immunohistochemical study of genetic alterations in intraductal and invasive ductal tumors of the pancreas. *Hepatogastroenterology*, 48:879-83.

Jeong S, Lee DH, Lee JI, Lee J-W, Kwon KS, Kim P-S, Kim HG, Shin YW, Kim YS, Kim YB (2005): Expression of Ki-67, p53, and K-ras in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Gastrenterol*, 11:6765-69.

Jinfeng M, Kimura W, Sakurai F, Moriya T, Mizutani M, Hirai I (2007): Prognostic role of angiogenesis and its correlations with thymidine phosphorylase and p53 expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Hepatogastroenterology*, 54:1635-40.

Karademir S, Sökmen S, Terzi C, Sağol O, Ozer E, Astarcioğlu H, Coker A, Astarcioğlu I (2000): Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 7:489-95.

Klein WM, Hruban RH, Klein-Szanto AJ, Wilentz RE (2002): Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): additional evidence for a recently proposed model of progression. *Mod Pathol*, 15:441-47.

Klöppel G, Lüttges J (2001): WHO-Classification 2000 Exocrine Pancreatic Tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 85:219-28.

Klöppel G, Adler G, Hruban RH, Kern SE, Longnecker DS, Partanen TJ (2000): Ductal adenocarcinoma of the pancreas. In: World Health Organisation classification of tumors. Tumors of the digestive system.

Knosp E, Kitz K, Perneczky A (1989): Proliferation activity in pituitary adenomas: measurement by monoclonal antibody Ki-67. *Neurosurgery*, 25:927-30.

Kosmahl M, Pauser U, Anlauf M, Klöppel G (2005): Pancreatic ductal adenocarcinomas with cystic features: neither rare nor uniform, *Modern Pathology*, 18:1157-64.

Landolt A M, Shibata T, Kleinhues P (1987): Growth rate of human pituitary adenomas. *J Neurosurg*, 67:803-06.

Lebe B, Sağol O, Ulukuş C, Coker A, Karademir S, Astarcioglu H, Küpelioğlu A, Astarcioğlu I, Obuz F (2004): The importance of cyclin D1 and Ki-67 expression on the biological behavior of pancreatic adenocarcinomas. *Pathol Res Pract*, 200:389-96.

Linder S, Blåsjö M, von Rosen A, Parrado C, Falkmer U G, Falkmer S (2001): Pattern of Distribution and Prognostic Value of Angiogenesis in Pancreatic Duct Carcinoma: A Semiquantitative Immunohistochemical Study of 45 Patients. *Pancreas*, 22:240-47.

Loukopoulos P, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Sakamoto M, Yamazaki K, Kosuge T, Kanai Y, Hosoda F, Imoto I, Ohki M, Inazawa J, Hirohashi S (2007): Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: identification of genetic indicators that predict patient outcome. *Cancer Sci*, 98:392-400.

Lüttges J, Klöppel G (2005): Das duktale Pankreaskarzinom und seine Vorläufer. *Pathologe*, 26:12-17.

Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marazo A, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH (2003): Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using pancreatic intraepithelial neoplasia tissues microarray, *Mod Pathol*, 16:902-12.

Mirlacher M, Kasper M, Storz M, Knecht Y, Dürmüller U, Simon R, Mihatsch MJ, Sauter G (2004): Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod Pathol*, 17:1414-20.

Murr R, Loizou JI, Yang Y-G, Cuenin C, Li H, Wang Z-Q, Herceg Z (2006): Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks, *Nature cell biology*, 6:91-99.

Murr R, Vaissiere T, Sawan C, Shukla V, Herceg Z (2007): Orchestration of chromatin-based processes: mind the TRRAP. *Oncogene*, 26:5358-72.

Muscat J, Stellman S, Hoffmann D, Wynder EL (1997): Smoking and pancreatic cancer in men and women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 6:15–19.

Nio Y, Dong M, Iguchi C, Yamasawa K, Toga T, Itakura M, Tamura K (2001): Expression of Bcl-2 and p53 protein in resectable invasive ductal carcinoma of the pancreas: effects on clinical outcome and efficacy of adjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol*, 76:188-96.

Qanungo S, Haldar S, Basu A (2003): Restoration of silenced Peutz-Jeghers Syndrome Gene, LKB1, induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells. *Neoplasia*, 5:367-74.

Robert F, Hardy S, Nagy Z, Baldeyron C, Murr R, Dery U, Masson J-Y, Papadopoulo D, Herceg Z, Tora L (2006): The transcriptional histone acetyltransferase cofactor TRRAP associates with the MRN repair complex and plays a role in DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology*, 26:402-12.

Rock J P, Ramesh Babu V, Drumheller T, Chason J (1993): Cytogenetic findings in pituitary adenoma: results of a pilot study. *Surg Neurol*, 40:224-29.

Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeao CJ, Kern SE (1997): Tumor-Suppressive Pathway in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res*, 57:1731-34.

Ruggeri B, Huang L, Berger D, Chang H, Klein-Szanto AJ, Goodrow T, Wood M, Obara T, Heath CW, Lynch H (1997): Molecular pathology of primary and metastatic ductal pancreatic lesions: analyses of mutations and expression of the p53, mdm-2, and p21/WAF-1 genes in sporadic and familial lesions. *Cancer*, 79:700-16.

Runnebaum IB, Kieback DG, Friedmann T, Sukumar S, Kreienberg R (1993): Mutationen des p53 Tumorsuppressor-Gens beim Mammakarzinom und Suppression des neoplastischen Phänotyps durch Wildtyp p53. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 254:834-36.

Safran H, Steinhoff M, Mangray S, Rathore R, King T C, Chai L, Berzein K, Moore T, Iannitti D, Reiss P, Pasquariello T, Akerman P, Quirk D, Mass R, Goldstein L, Tantravahi U (2001): Overexpression of the HER-2/neu Oncogene in Pancreatic Adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol*, 24:496-99.

Sagol O, Yavuzsen T, Oztop I, Ulukus C, Ylmaz U, Alakavuklar M, Karademir S, Obuz F, Astarcoğlu H, Astarcoglu I (2005): The effect of apoptotic activity, survivin, Ki-67, and P-glycoprotein expression on prognosis in pancreatic carcinoma. *Pancreas*, 30:343-48.

Satoh K, Sasano H, Shimosegawa T, Koizumi M, Yamazaki T, Mochizuki F, Kobayashi N, Okano T, Toyofa T, Sawai T (1993): An Immunohistochemical Study of the

cerbB-2 Oncogene Product in Intraductal Mucin-Hypersecreting Neoplasms and in Ductal Cell Carcinomas of the Pancreas. Cancer, 72:51-56.

Scarpa A, Capelli P, Mukai K, ZamboniG, Oda T, Iacono C, Hirohashi S (1993): Pancreatic Adenocarcinomas Frequently Show p53 Gene Mutations. *American Journal of Pathology*, 5:1534-43.

Sharif S, Ramanathan RK, Potter D, Cieply K, Krasinskas AM (2008): HER2 gene amplification and chromosome 17 copy number do not predict survival of patients with resected pancreatic adenocarcinoma. *Dig Dis Sci*, 53:3026-32.

Simon B, Printz H (2001): Epidemiological Trends in Pancretic Neoplasias. *Dig Dis*, 19:6-14.

Stanton KJ, Sidner RA, Miller GA, Cummings OW, Schmidt M, Howard TJ, Wiebke EA (2003): Analysis of Ki-67 antigen expression, DNA proliferative fraction, and survival in resected cancer of the pancreas. *The American Journal of Surgery*, 186:486-92.

Stoecklein NH, Luebke AM, Erbersdobler A, Knoefel WT, Schraut W, Verde PE, Stern F, Scheunemann P, Peiper M, Eisenberger CF, Izbicki JR, Klein CA, Hosch SB (2004): Copy number of chromosome 17 but not HER2 amplification predicts clinical outcome of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 22:4737-45.

Su GH, Hruban RH, Bansal RK, Bova GS, Tang DJ, Shekher MC, Westerman AM, Entius MM, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE (1999): Germline and Somatic Mutations of the STK11/LBK1 Peutz-Jeghers Gene in Pancreatic and Biliary Cancers. *Am J Pathol*, 154:1835-40.

Suzuki T, Takano Y (1993): Comparative immunohistochemical studies of p53 and proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer regions in pancreatic duct cell carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, 84:1072-77.

Tsiambas E, Karameris A, Dervenis C, Lazaris AC, Giannakou N, Gerontopoulos K, 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*, 7:283-94.

Virkajarvi N, Pääkkö P, Soini Y (1997): Association between p53 overexpression, cell proliferation, tumor necrosis and extent of apoptosis in operated pancreatic adenocarcinoma. *APMIS*, 105:765-72.

Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimner MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr., Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD (1996): Hereditary Pancreatitis Is Caused by a Mutation in the Cationic Trypsinogen Gene. *Nature Genetics*, 14:141-45.

Zhua J, Abbruzzese JL, Izzo J, Hittelman WN, Li D (2005): AURKA amplification, chromosome instability, and centrosome abnormality in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 159:10-17.

## 7 DANKSAGUNG

Danken möchte ich all denen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, vor allem:

Meinem Betreuer, Herrn PD Dr. rer. nat. R. Simon, dessen Tür immer offen stand und dessen unermüdliche Unterstützung zum Gelingen der vorliegenden Dissertation beigetragen hat.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. G. Sauter, der mir das Thema dieser Arbeit zur Verfügung stellte.

Frau Dr. med. U. Reichelt, die mir zu Beginn der Dissertation bei der Zusammenstellung des TMAs mit gutem Rat zur Seite stand.

Sowie dem immer hilfsbereiten Laborteam.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums vorbildlich unterstützt hat.

Danken möchte ich auch dem Chirurgen Hans Bothur (†), der mir durch seine Begeisterung, die Entscheidung Medizin zu studieren, leicht machte.

## 8 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die 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 oder 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.

T I4 aa ala		
Unterschrift:	 	 