

Aus der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken  
- Leitung: Prof. Dr. Dr. med. Jens K. Habermann –

-  
der Klinik für Chirurgie  
- Direktor: Prof. Dr. med. Tobias Keck -  
Sektion Medizin  
Universität zu Lübeck

---



## **Die klinische Wertigkeit von Tumorstammzellmarkern bei Pankreaskarzinomen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Martin Barow  
aus Delmenhorst

Lübeck 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens K. Habermann PhD
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Hendrik Ungefroren

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.11.2015

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Motivation dieser Arbeit .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Einführung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Das Pankreaskarzinom .....</b>	<b>3</b>
1.3.1 Neoplasien des exokrinen Pankreas .....	3
1.3.2 Risikofaktoren .....	6
1.3.3 Inzidenz und Mortalität .....	7
1.3.4 Therapie .....	9
1.3.4.1 TNM-Klassifikation und Stadien gemäß der Union contre le Cancer (UICC) .....	9
1.3.4.2 Therapieoptionen .....	10
<b>1.4 Tumorstammzellen .....</b>	<b>12</b>
1.4.1 Stammzellen im Normalgewebe .....	12
1.4.2 Modelle der Tumorentstehung .....	13
1.4.3 Identifikation von Tumorstammzellen .....	15
1.4.4 Stammzellmarker .....	16
1.4.5 Tumorstammzellen und Tumorstammzellmarker im Pankreaskarzinom .....	17
1.4.6 In dieser Arbeit untersuchte Tumorstammzellmarker .....	20
1.4.6.1 CD44 .....	20
1.4.6.2 CD133 .....	21
1.4.6.3 CD166 .....	21
1.4.6.4 CD 326 .....	21
1.4.7 Konsequenzen der Tumorstammzelltheorie für die Therapie .....	22
<b>1.5 Aneuploidie im Pankreaskarzinom .....</b>	<b>22</b>
<b>2. Fragestellung .....</b>	<b>24</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>25</b>
3.1.1 Patientenkollektiv .....	25
3.1.2 Chemikalien .....	27
3.1.3 Puffer und Lösungen .....	27
3.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	28
3.1.5 Geräte .....	28
3.1.6 Antikörper .....	29
3.1.7 Software .....	30
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.2.1 Immunhistochemie .....	31
3.2.1.1. Prinzip der Peroxidase-Methode .....	31
3.2.1.2 Durchführung der Peroxidase-Methode .....	32
3.2.1.3 Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Präparate .....	33
3.2.2 Ploidiemessung .....	33
3.2.2.1 Reaktionsprinzip der Feulgenfärbung .....	33
3.2.2.2 Färbeprozess .....	34

3.2.2.3	Messprinzip der Densitometrie .....	34
3.2.2.4	DNA-zytometrischer Messvorgang.....	35
3.2.2.5	Interpretation der Histogramme .....	35
3.2.3	Statistische Auswertung .....	37
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Immunhistochemische Färbung der Pankreas-Gewebeschnitte.....</b>	<b>38</b>
4.1.1	Tumorstammzellmarker-Expression in Pankreas-Gewebe .....	39
4.1.1.1	CD44 .....	39
4.1.1.2	CD133 .....	42
4.1.1.3	CD166 .....	45
4.1.1.4	CD326 .....	47
4.1.1.5	Korrelationen zwischen den Markern .....	50
4.1.2	Korrelationen zwischen Tumorstammzellmarker-Expression und klinischen Parametern.....	50
4.1.2.1	Tumorstammzellmarker und distante Metastasierung.....	50
4.1.2.2	Tumorstammzellmarker und UICC-Stadium .....	51
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse der Feulgen-Färbung.....</b>	<b>54</b>
4.2.1	Ploidiestatus-Einteilung nach Auer .....	54
4.2.2	Korrelation zwischen Ploidie und Überleben.....	54
4.2.3	Korrelation zwischen Ploidie und Grading .....	56
4.2.4	Korrelation zwischen Ploidie und Tumorstammzellmarker-Expression der Tumoren .....	59
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>Tumorstammzellmarker-Expression .....</b>	<b>62</b>
5.1.1	Expression von CD44.....	62
5.1.1.1	Prognostische Bedeutung der CD44-Expression .....	63
5.1.2	Expression von CD133.....	65
5.1.2.1	Prognostische Bedeutung der CD133-Expression .....	70
5.1.3	Expression von CD166.....	71
5.1.3.1	Prognostische Bedeutung der CD166-Expression .....	71
5.1.4	Expression von CD326.....	72
5.1.4.1	Prognostische Bedeutung der CD326-Expression .....	73
<b>5.2</b>	<b>Tumorstammzellen im Pankreas.....</b>	<b>74</b>
<b>5.3</b>	<b>Ploidiestatus im Pankreaskarzinom .....</b>	<b>77</b>
<b>5.4</b>	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>80</b>
5.4.1	Fazit .....	80
5.4.2	Ausblick.....	81
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>96</b>
<b>8.1</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>96</b>
<b>8.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>97</b>

<b>8.3</b>	<b>Kurzprotokolle der Färbungen</b> .....	<b>99</b>
8.3.1	Entparaffinierung.....	99
8.3.2	Immunhistologische Färbung – CD44/CD166/CD133.....	99
8.3.3	Immunhistologische Färbung – CD326.....	101
8.3.4	Feulgen-Färbung.....	102
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>104</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>105</b>
<b>11.</b>	<b>Hinweis zur Publikation von Daten aus dieser Arbeit</b> .....	<b>107</b>

## *Abkürzungsverzeichnis*

Abb.	=	Abbildung
°C	=	Grad Celsius
CCD	=	Charge Coupled Device
CD	=	cluster of differentiation (Immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen)
cm <sup>2</sup>	=	Quadratcentimeter
C-Terminus	=	Carboxy-Terminus, das die Carboxylgruppe enthaltende Ende einer Aminosäurekette
d.h.	=	das heißt
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
et al.	=	Lateinisch et alii = und andere
EU	=	Europäische Union
g	=	Gramm
G0-Phase	=	Ruhephase des Zellzyklus, in der eine Zelle sich nicht aktiv im Zellzyklus befindet
G1-Phase	=	Phase des Zellzyklus zwischen Mitose- und Synthesephase (englisch gap = Lücke), die v.a. dem Zellwachstum dient
G2-Phase	=	Phase des Zellzyklus zwischen Synthese- und Mitosephase, in der die Zelle wächst und die Mitose vorbereitet wird
IHC	=	Immunhistochemie
IPMN	=	intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
L	=	Liter
M	=	molar
mL	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
mm <sup>2</sup>	=	Quadratmillimeter
MZN	=	muzinös-zystische Neoplasie
n	=	Anzahl
NOD/SCID-Maus	=	non obese diabetic/severe combined immune deficient-Maus

N-Terminus	= Amino-Terminus, das die Aminogruppe enthaltende Ende einer Aminosäurekette
PDAK	= duktales Adenokarzinom des Pankreas
PanIN	= intraepitheliale Neoplasie des Pankreas
R0-Resektion	= vollständige operative Tumorentfernung mit tumorfreien Resektionsrändern
R1-Resektion	= nach operativer Tumorentfernung verbleiben mikroskopische Tumoranteile im Gewebe (Resektionsränder nicht tumorfrei)
S-Phase	= Synthesephase des Zellzyklus, in der v.a. die DNA-Replikation erfolgt
SP	= side population (durchflusszytometrisch abgrenzbare Zellpopulation mit geringerem Farbstoffgehalt)
Tab.	= Tabelle
TBS	= Tris-gepufferte Salzlösung (englisch Tris buffered saline)
TNM	= Klassifikation einer Tumorerkrankung nach Tumorausdehnung (T), Anzahl befallener Lymphknoten (L) und Fernmetastasen (M)
UICC	= Union internationale contre le cancer (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
UKSH	= Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
v.a.	= vor allem
z.B.	= zum Beispiel
$\mu\text{L}$	= Mikroliter
$\mu\text{m}$	= Mikrometer

# **1. Einleitung**

## **1.1 Motivation dieser Arbeit**

Hauptbestandteile einer Tumorthherapie sind neben der Chirurgie der Einsatz radiotherapeutischer und nuklearmedizinischer Methoden sowie Chemotherapeutika. Insbesondere Letztere weisen eine systemische und häufig sehr unspezifische zytotoxische Wirkung auf, die oft an den Zellzyklus gebunden ist und somit v.a. Gewebe mit hohem Zellumsatz trifft. Aufgrund ihrer meist hohen Zellzyklusrate sprechen maligne Tumoren hinsichtlich der Gesamttumormasse gut auf derartige Therapeutika an. Ursprung und Basis des Tumorwachstums sind nach neueren Kenntnissen jedoch wenige Tumorstammzellen, die aufgrund von Resistenzmechanismen nicht auf die Chemotherapie ansprechen und somit für Tumorrezidive verantwortlich sind. Die genaue Kenntnis der Eigenschaften und Besonderheiten dieser Tumorstammzellen insbesondere im Vergleich mit normalen Körperzellen könnte die Entwicklung spezifischer Therapeutika ermöglichen. Dazu ist die Identifikation und Isolation dieser Tumorstammzellen notwendig. Bisher bestehen nur geringe Kenntnisse hinsichtlich der Identität der Tumorstammzellen des Pankreaskarzinoms. Ziel dieser Arbeit ist die Erweiterung dieser Kenntnisse.

## **1.2 Einführung**

Eine Neoplasie ist eine abnormale, für den Organismus funktionslose Zellansammlung, die dadurch entsteht und wächst, dass ihre Zellen sich der normalen Steuerung von Proliferation und Apoptose entziehen (Thomas et al. 2002). Eine Unterscheidung der Neoplasien in benigne und maligne beruht vor allem darauf, dass benigne Tumoren im Gegensatz zu malignen ein Gewebe nicht infiltrieren. Sie wachsen somit nicht invasiv sondern verdrängend, metastasieren nicht und bleiben lokal abgegrenzt (Böcker et al. 2012). Gemäß ihrem zellulären Ursprung, der Histogenese, lassen sich Neoplasien verschiedenen Kategorien zuordnen. Epitheliale Tumoren gehen von Oberflächen- und Drüsenepithelien, Drüsenausführungsgängen und sekretorischen Epithelien aus. Karzinome sind maligne Formen epithelialer Tumoren. Sie stellen den weitaus größten Teil maligner Neoplasien. Mesenchymale

## 1. Einleitung

Tumoren werden in der malignen Ausprägung Sarkome genannt und betreffen das Fett- und Bindegewebe, Knochen, Knorpel, Muskulatur und Sehnen sowie das Gefäß- und das periphere Nervensystem. Weiterhin gibt es Neoplasien des hämatolymphopoetischen Systems (v.a. Leukämien und Lymphome), Tumoren des Neuroektoderms, und neuroendokrine Tumoren. Ferner werden Keimzelltumoren und embryonale Tumoren unterschieden (Böcker et al. 2012).

Entsprechend seiner funktionellen Zweigliederung in endokrinen und exokrinen Anteil können im Pankreas neuroendokrine Tumoren (Inselzelltumoren) und epitheliale Tumoren (Pankreaskarzinome) entstehen, wobei 95% der Tumoren epithelialen Ursprungs sind (Krebs in Deutschland 2007/2008).

In der Europäischen Union (EU) wurden im Jahre 2008 in ca. 2,4 Mio. Fällen Krebs diagnostiziert. Die Zahl der Sterbefälle durch Krebs betrug ca. 1,2 Mio. Dabei war Pankreaskrebs die vierthäufigste Todesursache, obwohl der Anteil an den Krebsneuerkrankungen nur rund 2,8% betrug (Ferlay et al. 2010). Eine Ursache dafür ist, dass die Frühsymptome sehr unspezifisch sind und der Tumor erst in einem fortgeschrittenen Stadium deutliche Beschwerden bereitet (Lee und Saif 2009). Damit wird das Pankreaskarzinom zumeist erst in einem Stadium erkannt, in dem die vollständige operative Entfernung des Tumors (R0-Resektion) als die derzeit einzige kurative Therapie nicht mehr möglich ist (Lee et al. 2008). Die Chemotherapie hat eine nur sehr geringfügig lebensverlängernde Wirkung (Hermann et al. 2007). Der überwiegende Teil der Pankreastumoren (95%) geht vom exokrinen Pankreas aus (Krebs in Deutschland 2007/2008). Da die anatomische Lage des Pankreas die Diagnostik erschwert und die Inzidenz des Pankreaskarzinoms sehr gering ist, steht ein kosteneffektives allgemeines Screeningverfahren zur Früherkennung zurzeit nicht zur Verfügung. Präventivuntersuchungen bleiben somit Personen mit genetischer oder familiärer Vorbelastung vorbehalten (Klapman und Malafa 2008, Lee und Saif 2009).

## 1.3 Das Pankreaskarzinom

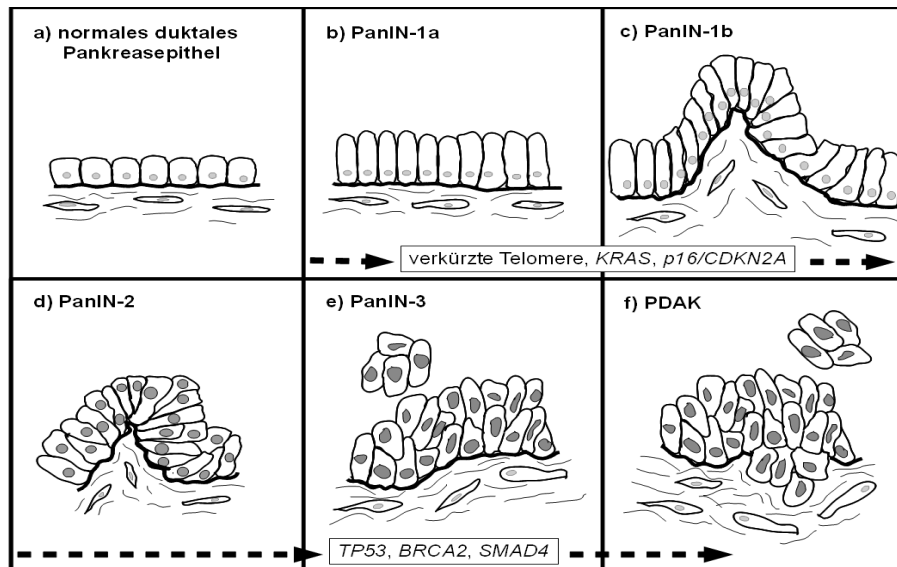
### 1.3.1 Neoplasien des exokrinen Pankreas

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAK) ist mit 85-90% bei weitem der häufigste aller malignen Pankreastumoren (Gräntzdörffer et al. 2008, Hezel et al. 2006). Es trägt seinen Namen aufgrund histologischer (Böcker et al. 2012, Hezel et al. 2006) und funktioneller (Schleimproduktion) Ähnlichkeiten mit kleinen und mittelgroßen Pankreasgängen (Böcker et al. 2012). Das PDAK tritt häufiger im Pankreaskopf auf (nach Loos et al. 2009 zu 80%) als im Pankreaskörper oder -schwanz (Alanen et al. 1990, Böcker et al. 2012, Hezel et al. 2006, Porschen et al. 1993). Es weist ein dichtes Stroma aus Fibroblasten und Entzündungszellen auf (Desmoplasie; Hezel et al. 2006) und hat weit über die eigentliche Tumormasse hinausreichende zungenförmige Ausläufer (Maitra und Hruban 2008). Die mit Abstand häufigste Vorläuferläsion des PDAK ist die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN). Sie findet sich in kleineren Pankreasgängen, ist weniger als 0,5 cm groß und wird in die Stufen PanIN-1a, -1b, -2 und -3 mit abnehmender Differenzierung eingeteilt (Hruban et al. 2008). Diese Stufen stellen eine histologisch-genetische Sequenz zum PDAK hin dar (Abb. 1). Die PanIN-1 weist leicht vergrößerte Zellen auf, die im Gegensatz zum Normalgewebe nicht mehr kuboid sondern säulenförmig sind, mehr Muzin enthalten, ihre Zellpolarität aber bewahren. Der Unterschied zwischen PanIN-1a und PanIN-1b besteht darin, dass die PanIN-1b nicht flach sondern papillär oder zumindest scheinbar geschichtet wächst (Maitra et al. 2005). Ungefähr 90% der PanIN-1 weisen bereits eine Verkürzung der Telomere auf (Hong et al. 2011). Diese Verkürzung führt zur Chromosomeninstabilität während des Zellzyklus und leistet bei zusätzlichem Ausfall von Kontrollmechanismen, die bei Chromosomenaberrationen Seneszenz und Apoptose einleiten, weiteren genetischen Veränderungen Vorschub.

Eine aktivierende Mutation des *KRAS*-Onkogens ist in bis zu 36% der PanIN-1 nachweisbar (Maitra und Hruban 2008). *KRAS* kodiert für ein GTP-bindendes Protein, das über verschiedene Signalwege eine Reihe zellulärer Funktionen einschließlich Proliferation, Zellüberleben und Zellmotilität vermittelt. Mutationen im Tumorsuppressorgen *p16/CDKN2A* (*INK4A*) finden sich in 30% der PanIN-1 (Ottenhof et al. 2011). Das vom *p16/CDKN2A*-Gen kodierte Protein inhibiert Cyclin-abhängige Kinasen, die für den Übergang von der

## 1. Einleitung

G1- in die S-Phase des Zellzyklus verantwortlich sind.



**Abb. 1. Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus der vier unterscheidbaren Stufen der PanIN als häufigste Vorstufe des PDAK.** In jedem Schema sind die jeweils neu auftretenden genetischen Veränderungen vermerkt (nähere Erläuterungen siehe Text). PanIN-1a/b: leicht vergrößerte säulenförmige Zellen mit Muzin angereichert, PanIN-1b im Gegensatz zur PanIN-1a nicht flach sondern papillär oder scheinbar geschichtet; PanIN-2: meist papillär, Zellkernatypien (Polaritätsverlust, Hyperchromasie, verdichtetes Auftreten von Zellkernen, vergrößerte Zellkerne); PanIN-3: zytologisch alle Charakteristika eines Karzinoms, aber Basalmembran noch nicht überschritten, Verlust der Zellpolarität, Zellkernatypien, prominente Nukleoli, häufige, auch atypische Mitosen, Zellgruppen in das Lumen hinein; Karzinom: Basalmembran durchbrochen, zufälliges Wachstumsmuster, oft intraluminaler Nekrosen, Zellkerngröße variiert um mehr als den Faktor 4. (In Anlehnung an Maitra und Hruban 2008)

Die PanIN-2 hat meist eine papilläre Architektur und zeigt Kernatypien in Form von Polaritätsverlust, Hyperchromasie, verdichtetem Auftreten von Zellkernen und vergrößerten Zellkernen (Maitra et al. 2005). Mitosen sind selten und nicht atypisch (Maitra et al. 2005). Neben Mutationen von *KRAS* zeigen PanIN-2 bereits in 50% der Fälle eine Mutation im *p16/CDKN2A*-Gen (Maitra et al. 2005, Ottenhof et al. 2011). Die PanIN-3 wird auch als *Carcinoma in situ* bezeichnet, da sie zytologisch bereits alle Charakteristika eines Karzi-

## 1. Einleitung

noms aufweist, aber die Basalmembran noch nicht überschreitet (Maitra et al. 2005, Ottenhof et al. 2011). Es bestehen hier ein Verlust der Zellpolarität, Zellkernatypien, prominente Nukleoli, häufige Mitosen, die atypisch verlaufen können, und die Knospung von Zellgruppen in das Lumen hinein (Maitra et al. 2005, Ottenhof et al. 2011). Das *p16/CDKN2A*-Gen ist in 70% der PanIN-3 mutiert (Ottenhof et al. 2011). Inaktivierende Mutationen in Tumorsuppressorgenen treten in *TP53* und *BRCA2* typischerweise und in *SMAD4* (*DPC4*, *MADH4*) fast ausschließlich erst in PanIN-3 in Erscheinung. Funktionen des p53-Proteins sind unter anderem die Induktion der Apoptose sowie der Eingriff in den Zellzyklus am G1/S-Checkpoint und der Erhalt des G2/M-Arrests. Das Smad4-Protein ist Teil eines durch den *transforming growth factor-β* (TGF-β) aktivierten und schließlich wachstumshemmenden Signalwegs. Das BRCA2-Protein besitzt eine Schlüsselrolle bei der DNA-Reparatur und der homologen Rekombination. Im Gegensatz zu den PanIN wachsen Karzinome über die Basalmembran hinaus invasiv, zeigen ein zufälliges Wachstumsmuster und weisen oft intraluminale Nekrosen und unvollständige Drüsen auf. Die Größe der Zellkerne variiert um mehr als den Faktor 4 (Maitra et al. 2005). Eine aktivierende Mutation des *KRAS*-Onkogens ist in 90-95% der Pankreaskarzinome nachweisbar (Maitra und Hruban 2008). Das *p16/CDKN2A*-Gen ist in ca. 90% der Fälle mutiert. Eine *SMAD4*-Inaktivierung liegt in ungefähr 55% vor (Maitra und Hruban 2008). *TP53* und *BRCA2* sind in ca. 50-75% bzw. 7-10% der sporadischen Pankreaskarzinome inaktiv.

Die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) betrifft den Hauptgang des Pankreas und seine Seitenäste. Durch hohe Muzinproduktion bildet sich eine zystische Läsion, die meist mit dem Pankreasgang kommuniziert. In 30% der Fälle findet sich zudem ein Kolloidkarzinom, in selteneren Fällen ein duktales Adenokarzinom (Maitra et al. 2005, Böcker et al. 2012). Wie beim PanIN kommen *KRAS*-Mutationen in frühen und *SMAD4*-, *TP53*- und *p16/CDKN2A*-Mutationen in späteren Stadien des IPMN vor (Maitra et al. 2005).

Die muzinös-zystische Neoplasie (MZN) ist eine v.a. bei Frauen auftretende große, zähen Schleim produzierende, septierte zystische Läsion, die in der Regel nicht mit dem Pankreasgang kommuniziert. In 30% der Fälle lässt sich zudem ein duktales Adenokarzinom feststellen (Maitra et al. 2005, Böcker et al. 2012). Eine aktivierende *KRAS2*-Mutationen ist schon in frühen MZN festzustellen, während *TP53*- und *SMAD4*-Inaktivierung in bereits invasiven Formen vorkommt (Maitra et al. 2005).

## 1. Einleitung

Seltene Tumoren des Pankreas stellen das Azinuszellkarzinom dar, das bei Männern doppelt so häufig auftritt wie bei Frauen, und das v.a. bei Frauen höheren Lebensalters auftretende seröse Zystadenom. Seröse Zystadenokarzinome sind extrem selten (Böcker et al. 2012). Kleinkinder können vom bösartigen Pankreatoblastom betroffen sein, und fast ausschließlich junge Frauen vom solid-pseudopapillären Tumor (Böcker et al. 2012).

### 1.3.2 Risikofaktoren

Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko, an Pankreaskrebs zu erkranken (Gräntzdörffer et al. 2008, Hezel et al. 2006). In Deutschland liegt das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei 70 und für Frauen bei 76 Jahren (Krebs in Deutschland 2007/2008). Selten erkranken Menschen unter 40 Jahren (Gräntzdörffer et al. 2008).

Tabakrauchen wird als der führende vermeidbare Risikofaktor angesehen (Maitra und Hruban 2008); 25% der Pankreaskarzinome werden mit Tabakkonsum in Zusammenhang gebracht (Gräntzdörffer et al. 2008). Langjähriges Rauchen verdoppelt das Risiko einer Erkrankung (Klapman und Malafa 2008). Weiterhin spielen hoher Alkoholkonsum und Übergewicht eine Rolle bei der Entstehung von Pankreaskrebs (Krebs in Deutschland 2007/2008, Hezel et al. 2006, Adler et al. 2008). Einige chronische Erkrankungen erhöhen die Wahrscheinlichkeit, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln. So stellt Diabetes mellitus Typ 2 einen Risikofaktor dar (Krebs in Deutschland 2007/2008, Gräntzdörffer et al. 2008, Hezel et al. 2006), der das Erkrankungsrisiko verdoppelt (Klapman und Malafa 2008). Auch für Patienten mit einer chronischen Pankreatitis besteht ein erhöhtes Risiko, an Pankreaskrebs zu erkranken (Gräntzdörffer et al. 2008), das mit der Dauer der Entzündung zunimmt (Hezel et al. 2006).

Einige Keimbahnmutationen haben Einfluss auf die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms, sind aber für weniger als 20% der familiär auftretenden Pankreaskrebserkrankungen verantwortlich (Hezel et al. 2006). So erkranken Personen mit einer autosomal dominant vererbten Pankreatitis durch Mutation des *PRSSI*-Gens gehäuft ca. 30 bis 40 Jahre nach dem Einsetzen rezidivierender Pankreatitiden an Pankreaskrebs. Dieser Zeitraum wird durch Tabakrauchen halbiert (Klapman und Malafa 2008). Patienten mit Peutz-Jeghers-Syndrom (*LKB1/STK11*-Mutation), einer ebenfalls autosomal dominant vererbten gastroin-

## 1. Einleitung

testinalen Polyposis, tragen zwischen 15 und 64 Jahren ein Lebenszeitrisiko von 36% (Klapman und Malafa 2008). Bei Vorliegen des autosomal dominant vererbten familiären atypischen multiplen Muttermal- und Melanom-Syndroms durch Mutation im *p16/CDKN2A*-Gen ist das Erkrankungsrisiko 13fach erhöht (Hezel et al. 2006). Das Lebenszeitrisiko, an Pankreaskrebs zu erkranken, beträgt 16% (Klapman und Malafa 2008). In Familien, in denen mindestens zwei Verwandte ersten Grades Pankreaskrebs aufweisen, liegt in 17-19% eine Mutation im *BRCA2*-Gen vor, das vor allem mit Brust- und Ovarialkrebs im Zusammenhang steht (Klapman und Malafa 2008). Träger einer Mutation im *BRCA1*-Gen besitzen ebenfalls ein erhöhtes Risiko, das aber geringer ist als bei einer *BRCA2*-Mutation (Hezel 2006). Bei einer Häufung von Pankreaskrebs in einer Familie ohne andere vermehrte Krebskrankheiten oder eine eindeutige genetische Vorbelastung besteht der Verdacht, dass familiärer Pankreaskrebs vorliegt (familial pancreatic cancer = FPC), dessen genetische Ursache noch nicht eindeutig geklärt ist. Bei zwei erkrankten erstgradigen Verwandten ist das Risiko in dieser Familie 18fach erhöht, bei drei erkrankten 57fach. Ungefähr 10% aller Pankreaskrebserkrankungen werden auf eine genetische familiäre Belastung zurückgeführt (Gräntzdörffer et al. 2008, Klapman und Malafa 2008).

### 1.3.3 Inzidenz und Mortalität

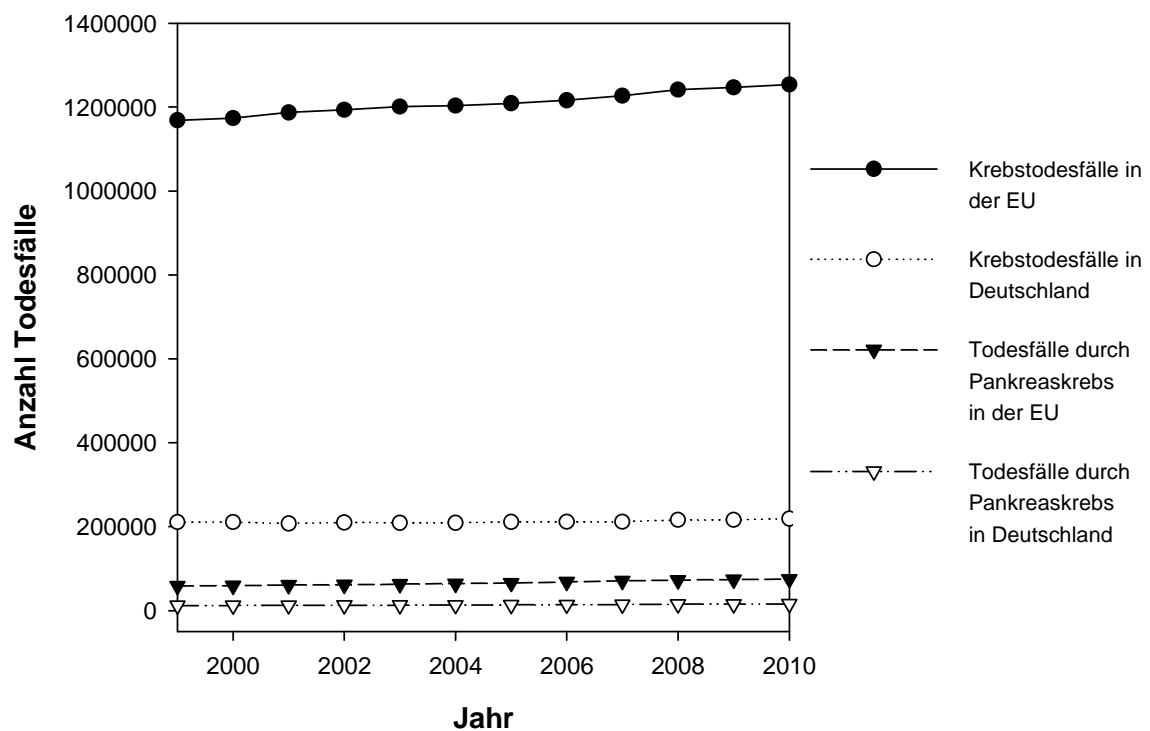
In der Europäischen Union (EU) hatte Pankreaskrebs im Jahr 2008 bei Frauen mit einer Gesamtzahl von 34.565 einen Anteil von 3,1% an den Krebserstdiagnosen, bei Männern mit 35.096 einen Anteil von 2,6%. Von allen Krebssterbefällen im Jahr 2008 in der EU wurden mit 35.463 bei Frauen 6,6%, bei Männern mit 35.653 Fällen 5,1% durch Pankreaskrebs verursacht (Abb. 2). Somit liegt der Pankreaskrebs bei Frauen bei den Todesfällen durch Krebs in der EU an vierter und bei Männern an fünfter Stelle. Die Anzahl der Sterbefälle entspricht in beiden Geschlechtern ungefähr der Anzahl der Neuerkrankten (Ferlay et al. 2010).

Im Jahre 2008 erkrankten in Deutschland 7.750 Frauen und 7.390 Männer an Pankreaskrebs, wobei die Tendenz steigend ist. Das entsprach bei Frauen 3,4% und bei Männern 3,0% der Krebsneuerkrankungen (Abb. 2). Trotz dieses geringen Anteils steht Pankreaskrebs mit 7,5 bzw. 6,3% auch hier an vierter Stelle der Todesfälle infolge von Krebs. Die

## 1. Einleitung

altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberate ist ebenfalls ungefähr gleich groß und bei Männern seit Anfang der 1980er Jahre annähernd konstant, für Frauen leicht steigend (Krebs in Deutschland 2007/2008).

Diese Zahlen zeigen, dass das Pankreaskarzinom trotz seines relativ seltenen Auftretens in den westlichen Industrieländern einen vergleichsweise hohen Anteil an den durch Krebs verursachten Sterbefällen hat. Dabei ist die Überlebenszeit nach erfolgter Diagnose sehr gering. In Deutschland beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen 7%, für Männer 8% (Krebs in Deutschland 2007/2008).



**Abb. 2. Mortalität durch Tumoren insgesamt im Vergleich zur Mortalität durch Pankreastumoren in Deutschland und den Ländern der derzeitigen EU (Eurostat 2013).** Obwohl das Pankreaskarzinom sowohl in der EU als auch in Deutschland nur ca. 3% der Krebserstdiagnosen ausmacht, hat es einen mindestens doppelt so hohen Anteil an den Todesfällen durch Krebs.

## 1.3.4 Therapie

### 1.3.4.1 TNM-Klassifikation und Stadien gemäß der Union contre le Cancer (UICC)

Die Therapiemöglichkeiten bei Vorliegen eines malignen Tumors richten sich nach der Ausbreitung eines Tumors im Organ und im Organismus. Zur standardisierten Einordnung des Ausbreitungsstadiums eines Tumors dient das TNM-System. Bei der TNM-Klassifikation werden die Ausdehnung des Primärtumors im Organ (T), die Infiltration regionärer Lymphknoten durch Tumorzellen (N) sowie die Bildung von Fernmetastasen (M) berücksichtigt. Anhand der TNM-Klassifikation erfolgt die Stadieneinteilung nach UICC (Union contre le cancer), die die Grundlage für die Einschätzung der Prognose und Festlegung der Behandlungsoptionen eines Patienten darstellt. Die TNM-Klassifikation und Stadien nach UICC für das Pankreaskarzinom sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tab. 1. Klassifikation und Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms**

*a) TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms*

---

<b>T-Klasse</b>	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ*
T1	Tumor begrenzt auf Pankreas, Ausdehnung bis 2 cm
T2	Tumor begrenzt auf Pankreas, Ausdehnung mehr als 2 cm
T3	Tumor über Pankreasgrenze hinaus ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior
T4	Infiltration des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior

---

<b>N-Klasse</b>	
NX	regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	regionäre Lymphknotenmetastasen

---

<b>M-Klasse</b>	
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

---

\* Tumor durchwächst noch nicht die Basalmembran des Drüseneithels

*b) UICC-Stadien des Pankreaskarzinoms*

<b>Stadium</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1-T3	N1	M0
III	T4	jedes N	M0
IV	jedes T	jedes N	M1

### **1.3.4.2 Therapieoptionen**

Das Pankreaskarzinom wird meistens erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, da Frühsymptome selten (Gräntzdörffer et al. 2008) und unspezifisch sind (Lee und Saif 2009, Simeone 2008). Eine kurative Therapie ist dann nicht mehr möglich. Ein kosteneffektives Screeningverfahren zur Früherkennung gibt es derzeit nicht (Lee und Saif 2009). Ein schmerzloser zunehmender Ikterus (bei Pankreaskopfkarzinom) durch Stenose des Ductus choledochus, uncharakteristische dumpfe Oberbauchschmerzen, teils im Zusammenhang mit ungeklärtem Krankheitsgefühl, Maldigestion, Appetit- und Gewichtsverlust, aber auch Völlegefühl, Meteorismus, Steatorrhö und eine vergrößerte Gallenblase können Indikationen für eine weitere Abklärung in Richtung Pankreaskarzinom sein (André et al. 2006, Loos et al. 2009, Böcker et al. 2012). Eine Pankreasgangobstruktion kann zu chronischer Pankreatitis mit Diabetes mellitus führen (Böcker et al. 2012).

Als weiterer Grund für die schlechte Prognose wird die anatomische Lage angeführt, welche die Diagnostik erschwert (Lee und Saif 2009, Yoshimura et al. 1992). Das Fehlen einer Organkapsel erleichtert die Infiltration umgebenden Gewebes (Böcker et al. 2012, Hezel et al. 2006, Ischenko et al. 2010). Dabei wird die biologische Aggressivität des Karzinoms als hoch angesehen (Ischenko et al. 2010). Erste Metastasen sind in regionären Lymphknoten zu finden. Die hämatogene Streuung führt zu Metastasen zunächst in der Leber, aber auch in der Lunge (Böcker et al. 2012, Hezel et al. 2006). Zudem findet eine lymphogene und perineurale Ausbreitung statt (Böcker et al. 2012).

Die chirurgische Resektion stellt derzeit die einzige kurative Therapieform des Pankreas-

## 1. Einleitung

karzinoms dar (Gräntzdörffer et al. 2008, Li und Saif 2009, Loos et al. 2009). Allerdings haben 30% (Gräntzdörffer et al. 2008) bis 50% (Lee et al. 2008) der Patienten zum Diagnosezeitpunkt einen lokal fortgeschrittenen Tumor in nicht-resezierbarem Stadium und 35% (Lee et al. 2008) bis 50% bereits Metastasen. Insgesamt kommen nur 10-20% der Patienten für eine Operation mit kurativem Ziel in Frage (André et al. 2006, Loos et al. 2009, Helm et al. 2008), wobei selbst nach R0-Resektion die 5-Jahres-Überlebensrate nur 25% (Gräntzdörffer et al. 2008) bis 31% (Helm et al. 2008) beträgt. Bei Behandlung sehr früher Krebsstadien (Durchmesser < 1cm) ohne Lymphknotenmetastasierung kann eine Überlebensrate von ca. 50% mit Aussicht auf Heilung erreicht werden (Wong et al. 2001).

Neben einer postoperativen Mortalitätswahrscheinlichkeit von mehr als 10% stellen viszerale Metastasen in der Regel eine Kontraindikation für einen chirurgischen Eingriff dar (André et al. 2006, Loos et al. 2009). Eine kurative Resektion wird nicht empfohlen bei Invasion des Truncus coeliacus und der Arteria mesenterica superior (Loos et al. 2009, Seufferlein et al. 2013) oder eine Ummauerung der Arteria mesenterica superior, die die Hälfte der Zirkumferenz übersteigt (Seufferlein et al. 2013). Eine Infiltration der Vena lienalis, Vena mesenterica superior oder Vena portae wird nicht mehr als Ausschlusskriterium für eine Resektion angesehen (André et al. 2006, Loos et al. 2009, Seufferlein et al. 2013). Die Invasion posteriorer Gewebe und/oder Gefäße sowie entfernter Lymphknoten steht einem kurativen operativen Eingriff entgegen (André et al. 2006).

Neoadjuvante Therapiekonzepte sind derzeit noch nicht etabliert, in Einzelfällen kann aber bei lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen Pankreaskarzinomen eine sequentielle Chemo- und Radiochemotherapie durchgeführt werden (Seufferlein et al. 2013). Eine adjuvante Therapie mit den Pyrimidinanaloga 5-Fluorouracil oder Gemcitabine nach R0- und R1-Resektion wird empfohlen (Seufferlein et al. 2013), verbessert die Überlebensrate allerdings nur geringfügig (Wong et al. 2001). Beide Medikamente werden hinsichtlich der therapeutischen Wirkung als gleichwertig angesehen, unterscheiden sich aber im Nebenwirkungsprofil, so dass bei Unverträglichkeit die Medikation gewechselt werden kann (Neoptolemos et al. 2010, Seufferlein et al. 2013).

Die Anwendung von Gemcitabine als Therapeutikum der Wahl (Hermann et al. 2007, Li und Saif 2009, Seufferlein et al. 2013) inoperabler Pankreaskarzinome führt zu einem 5-Jahresüberleben von 1-4% und einer mittleren Überlebensrate von vier bis sechs Monaten

## 1. Einleitung

(Hermann et al. 2007), die in der Kombination mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib um fast zwei Wochen verlängert werden kann (Moore et al. 2007). Bei Patienten mit günstigem Risikoprofil lässt sich mit der Kombinationstherapie aus 5-Fluorouracil, dem Thymidilatsynthase-Hemmer Folinsäure, dem Topoisomerase-Hemmer Irinotecan und dem mit der DNA interagierenden Oxaliplatin eine noch längere Überlebenszeiten erreichen (Gourgou-Bourgade 2013, Seufferlein et al. 2013). Ähnliches gilt für die Kombination von Gemcitabine mit der albumingebundenen Form des Mitose-Inhibitors Paclitaxel (Von Hoff et al. 2013), die seit 2013 in Europa für die Erstlinientherapie des metastasierten PDAK zugelassen ist. Für eine adjuvante Radiotherapie gibt es keine Empfehlungen (Loos et al. 2009, Seufferlein et al. 2013).

### **1.4 Tumorstammzellen**

Für maligne Tumoren verschiedener Gewebe wurden sogenannte Tumorstammzellen beschrieben, die trotz eines geringen Anteils an der Gesamttumormasse alleinig als der Ursprung für das Tumorstammwachstum angesehen werden (Zhou und Zhang 2008). Durch eine hohe Resistenz gegenüber chemo- und radiotherapeutischen Maßnahmen werden sie zudem für Tumorrezidive nach erfolgter Therapie verantwortlich gemacht (Dean et al. 2005). Der Anteil von Tumorstammzellen in einem Tumor korreliert oftmals mit der Prognose eines Patienten (Maeda et al. 2008, Shipitsin und Polyak 2008). Die Identifikation und genaue Charakterisierung der jeweiligen Tumorstammzellen kann eine Grundlage für die Entwicklung zukünftiger Therapien bieten, die die Tumorstammzelle als die eigentliche Ursache der Tumorbildung zum Ziel haben (Tang et al. 2007). Tumorstammzellen können anhand bestimmter Oberflächenproteine charakterisiert werden. Bisher gibt es erst wenige Arbeiten, die die Identifikation der Pankreaskarzinom-Stammzellen zum Gegenstand hatten. Aufgrund der Bedeutung der Tumorstammzellen für Prognose und Therapie sind weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet wichtig.

#### **1.4.1 Stammzellen im Normalgewebe**

In den meisten Organen erfolgt die Geweberegeneration durch Stammzellen. Aus multiplo-

## 1. Einleitung

tenten Stammzellen können mehrere Zelltypen hervorgehen, aus oligopotenten wenige und aus unipotente nur ein Zelltyp. Für Stammzellen werden drei Teilungsmöglichkeiten angenommen. Bei der symmetrischen Teilung entstehen wieder zwei Stammzellen. Sie ermöglicht die Regeneration des Stammzellpools. Bei der asymmetrischen Teilung gehen aus der Stammzelle eine Stammzelle und eine Vorläuferzelle (Progenitorzelle) hervor. Aus der Progenitorzelle bilden sich durch zahlreiche weitere Teilungen Zellen mit zunehmendem Differenzierungsgrad, so dass schließlich ausdifferenzierte Zellen eines Gewebes entstehen. Diese beiden Teilungsmöglichkeiten stellen als sogenannte Selbsterneuerung eine wichtige Eigenschaft der Stammzellen dar und gewährleisten einen lebenslangen Vorrat an Stammzellen (Lüllmann-Rauch 2006). Die Fähigkeit zur Expansion des Stammzellbestandes steht unter strenger Kontrolle, da eine unkontrollierte Vermehrung dem Wachstum eines Malignoms gleichkäme (Al-Hajj und Clarke 2004). Drittens kann die Teilung einer Stammzelle zur Bildung zweier Progenitorzellen dienen (Clarke et al. 2006).

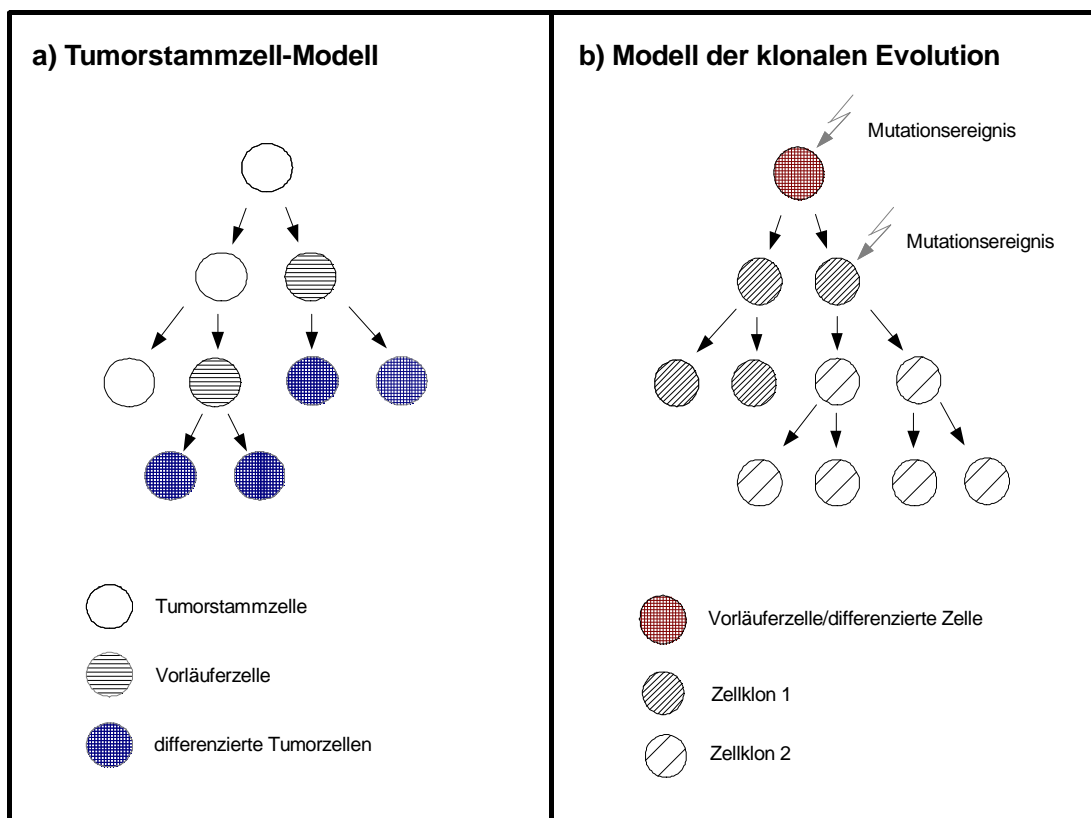
### 1.4.2 Modelle der Tumorentstehung

Die Feststellung in den 1960er Jahren, dass nur ein sehr geringer Anteil von Lymphom- und Plasmazytomzellen zur Proliferation in Mäusen in der Lage ist, sowie Markierungsversuche menschlicher Leukämiezellen mit Tritium, die eine kleine Subpopulation von Zellen mit abweichenden Zellzykluseigenschaften aufdeckten, führten zu der Vorstellung, dass in Neoplasien stammzellähnliche Zellen vorliegen könnten (Clarke et al. 2006, Zhou und Zhang 2008). Diese Tumorstammzellen sind als solche Zellen definiert, die innerhalb eines Tumors zur Selbsterneuerung in der Lage sowie der Ursprung heterogener Zelllinien sind, aus denen der Tumor besteht (Clarke et al. 2006; Abb. 3a). Sie entsprechen in diesen Eigenschaften den normalen Stammzellen gesunder Gewebe. Der Ursprung der Tumorstammzellen könnte somit in normalen Stammzellen oder Progenitorzellen des jeweiligen Gewebes liegen.

Alternativ zur Stammzelltheorie besteht das in früheren Jahren entwickelte Modell der klonalen Evolution zur Erklärung der Tumorentstehung (Nowell 1976; Abb. 3b). Dieses Modell geht von einer normalen, möglicherweise ausdifferenzierten Körperzelle aus, die durch eine Veränderung einen Wachstumsvorteil gegenüber normalen Nachbarzellen erhält. Die

## 1. Einleitung

veränderte Zelle entzieht sich der normalen Wachstumskontrolle und nimmt, falls sie sich bereits im ruhenden Zustand befand (G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus), wieder einen proliferativen Status an. Das führt, möglicherweise erst nach einer Latenzzeit, zu vermehrter Proliferation der so veränderten Zellen. Durch genetische Instabilität entstehen weitere Mutanten in der Tumorphilpopulation, von denen die meisten untergehen. Einige aber weisen weitere Selektionsvorteile auf und werden Vorläufer einer neuen vorherrschenden Subpopulation innerhalb des Tumors. Eine Abfolge von Mutationen und anschließender Selektion führt zu vergleichbaren aber dennoch einzigartigen Tumoren, deren Zellen zudem untereinander, d.h. zwischen den entstandenen Subpopulationen heterogen sind.



**Abb. 3. Schematische Darstellung der beiden Modelle der Tumorentstehung.** Beim Tumorstammzell-Modell sind mutierte Tumorstammzellen der Ausgangspunkt der Zellproliferation und damit des Tumorwachstums. Aus ihnen gehen Vorläuferzellen und letztlich differenzierte Tumorzellen hervor. Beim Modell der klonalen Evolution geht der Tumor auf eine differenzierte Zelle zurück, die durch Veränderung zur Proliferation befähigt wird. Weitere Veränderungen führen zu mehreren Zellklonen, die einer Selektion unterliegen und unterschiedlich erfolgreich proliferieren.

## 1. Einleitung

Im Gegensatz zum Stammzellmodell sind beim Modell der klonalen Evolution alle Tumorzellen gleichermaßen für Wachstum und Regeneration eines Tumors verantwortlich (Campbell und Polyak 2007, Nowell 1976).

Generell schließen sich die Krebsstammzelltheorie und das Modell der klonalen Evolution nicht unbedingt gegenseitig aus, sondern wurden von einigen Autoren kombiniert beschrieben entweder in der Form, dass in Stammzellnischen durch Mechanismen der klonalen Evolution im Laufe der Zeit ein Stammzellklon dominiert (Calabrese et al. 2004, Shipitsin und Polyak 2008, Visvader und Lindeman 2008), oder in der Form, dass nicht alle Subpopulationen eines Tumors das gleiche proliferative Potential besitzen (Campbell und Polyak 2007).

### 1.4.3 Identifikation von Tumorstammzellen

Zur Identifizierung und Isolierung von Tumorstammzellen haben sich vor allem drei Methoden etabliert (Zhou und Zhang 2008).

In Suspensionskulturen können Stamm- und Progenitorzellen unter nicht-adhäsiven Bedingungen kugelige Zellkonglomerate, sogenannte Sphären, ausbilden und auf diese Weise angereichert werden (Zhou und Zhang 2008).

Eine weitere Methode ist die Identifizierung einer sogenannten *side population* (SP) mittels Durchflusszytometrie. Dabei werden Zellen in einer Suspension inkubiert, die einen auch in lebende Zellen eindringenden Fluoreszenzfarbstoff enthält (meist Hoechst 33342). Einige wenige Zellen weisen eine geringere Fluoreszenzintensität auf als die meisten, da sie mittels zellmembranständiger Transportproteine den Farbstoff wieder aus der Zelle entfernen können. Diese Population enthält Zellen mit Stammzellcharakter (Clarke et al. 2006, Tang et al. 2007, Zhou und Zhang 2008). Nicht alle SP-Zellen besitzen Stammzeleigenschaften, da teilweise auch andere Tumorzellen diese Transportproteine exprimieren. Die SP weist nur eine partielle Überlappung mit mittels Stammzellmarkern identifizierten Stammzellen auf.

Zurzeit werden Tumorstammzellen am häufigsten unter Verwendung von Antikörpern identifiziert, die an Antigene binden, welche typischerweise aber nicht unbedingt ausschließlich von Tumorstammzellen exprimiert werden.

## 1. Einleitung

Bei keinem der Ansätze ist sicher, dass es sich bei den identifizierten bzw. selektierten Zellen tatsächlich um Tumorstammzellen handelt und nicht vielmehr um eine Subpopulation mit Tumor regenerierenden Zellen, die im Vergleich zur Gesamtheit der Tumorzellen lediglich erheblich mit Stammzellen angereichert ist oder mit Zellen, die Stammzellen ähnliche Eigenschaften aufweisen (Zhou und Zhang 2008). Daher werden diese Zellen oftmals lediglich als Tumor initiiierende Zellen bezeichnet. Im Folgenden wird der Begriff Tumorstammzellen benutzt.

### 1.4.4 Stammzellmarker

Ein Nachweis maligner Stammzellen gelang in den 1990er Jahren erstmals in akuter myeloischer Leukämie (AML). Die Injektion sehr weniger AML-Zellen, die positiv für das Oberflächenantigen CD34 und negativ für das Oberflächenantigen CD38 waren (CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>), in radioaktiv bestrahlte SCID-Mäuse führte zur Bildung einer Leukämiezellpopulation in diesen Tieren (Lapidot et al. 1994). Inzwischen sind anhand bestimmter unterschiedlicher Oberflächenantigene auch für einige solide Tumoren kleine Zellpopulationen mit der Eigenschaft identifiziert worden, selbst bei Injektion weniger Zellen (typischerweise 100 bis 1000 Zellen) in NOD/SCID-Mäusen den jeweiligen Tumor zu regenerieren, während der Großteil der Tumorzellen, der diese Oberflächenantigene nicht aufweist, auch bei Injektion größerer Zellzahlen (z.B. 10 000 oder mehr) nicht dazu in der Lage ist. Hinweis auf solche Tumorstammzellen gibt es bisher für Brustkrebs (Oberflächenmarker CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup>/Lineage<sup>-</sup>), Glioblastom und Medulloblastom (CD133<sup>+</sup>), Kolonkarzinom (CD133<sup>+</sup>), Kolorektales Karzinom (CD326<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD166<sup>+</sup>), Prostatakarzinom (CD44<sup>+</sup>/alpha2beta1<sup>high</sup>/CD133<sup>+</sup>), Melanom (CD20<sup>+</sup>), Hepatozelluläres Karzinom (CD90<sup>+</sup>), Pankreas-Adenokarzinom (CD44<sup>+</sup>/CD326<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> und CD133<sup>+</sup>), Lungenkarzinom (CD133<sup>+</sup>), Osteosarkom (Stro-1<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>) und Kopf-Hals-Tumoren (Lin<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>) (Ischenko et al. 2010, Tang et al. 2007, Trumpp und Wiestler 2008, Tysnes und Bjerkvig 2007, Visvader und Lindemann 2008, Zhou und Zhang 2008). Tumorstammzellmarker werden sowohl von normalen Stammzellen und Tumorstammzellen als auch einigen ausdifferenzierten Zellen anderer Gewebe exprimiert, jedoch in unterschiedlichem Maße.

### **1.4.5 Tumorstammzellen und Tumorstammzellmarker im Pankreaskarzinom**

Den ersten Nachweis für die Existenz von Tumorstammzellen im Pankreaskarzinom erbrachten Li et al. (2007) unter Nutzung der Oberflächenantigene CD44, CD24 und CD326 (ESA [epithelial-specific antigen], EpCAM [epithelial cell adhesion molecule]). Während noch relativ viele Zellen positiv für einen oder zwei Marker waren, wiesen nur 0,2% bis 0,8% der Zellen der einzelnen Tumoren alle drei Marker zugleich auf (Tab. 2a). Die Fähigkeit, in Mäusen einen Tumor zu regenerieren, war für die durchflusszytometrisch sortierten Zellfraktionen unterschiedlich in dosisabhängiger Form. Während mindestens 10.000 unsortierte Zellen für die Tumoregeneration innerhalb von 16 Wochen in Mäusen notwendig waren, genügten in fast 50% der Fälle schon 500 CD326<sup>+</sup>- oder CD24<sup>+</sup>-Zellen. Hundert CD44<sup>+</sup>-, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>- oder CD44<sup>+</sup>/CD326<sup>+</sup>-Zellen reichten in 25% der behandelten Mäuse aus, und bei Verwendung dreifach positiver Zellen konnte mit dieser Zellzahl schon in 50% der Mäuse Tumorwachstum erreicht werden.

Hermann et al. (2007) konnten schon mit 500 aus Pankreaskarzinomen isolierten CD133<sup>+</sup>-Zellen in thymusfreien Mäusen Tumoren induzieren, während dazu 10<sup>6</sup> unsortierte Tumorzellen notwendig waren und 10<sup>6</sup> CD133<sup>-</sup>-Zellen nicht zur Tumorbildung führten. Maeda et al. (2008, 2009) fanden in 60% untersuchter Pankreaskarzinome CD133<sup>+</sup>-Zellen, aber keine in Normalgewebe. Der Anteil an der Gesamtzellzahl betrug jeweils höchstens 15% und korrelierte mit dem histologischen Differenzierungsgrad der Tumoren, der Infiltration lymphatischen Gewebes sowie der Überlebenszeit der Patienten. Die CD133<sup>+</sup>-Zellen ließen sich ebenso wie bei Hermann et al. (2007) nicht mit Antikörpern gegen Cytokeratin markieren, was als Hinweis auf den Stammzellcharakter gewertet werden kann, da Cytokeratin als epithelialer Differenzierungsmarker angesehen wird. Für den ebenfalls untersuchten Marker CD44 konnten Maeda et al. (2009) nur bei Koexpression mit CD133 einen signifikanten Zusammenhang mit klinischen Parametern feststellen.

Des Weiteren wurden Tumorstammzellen in Tumorzelllinien des Pankreas untersucht (Tab. 2b). Olempska et al. (2007) konnten mittels Durchflusszytometrie in fünf Pankreaskarzinom-Zelllinien das Membrantransporterprotein ABCG2 nachweisen, das neben anderen Proteinen für die Entstehung der SP in der Durchflusszytometrie verantwortlich ist. Nur zwei der untersuchten Linien zeigten zudem eine CD133-Expression. Huang et al. (2008)

1. Einleitung

**Tab. 2. Am Pankreaskarzinom getestete Tumorstammzellmarker**

Positivität: Anteil angefärbter Zellen eines Testobjekts, Tumorigenität: tumorbildende Potenz positiver Zellen gegenüber der Gesamtzellpopulation nach Injektion in Mäuse. Weiterhin sind Korrelationen mit zusätzlich untersuchten Parametern aufgeführt.

**a) An Gewebeschnitten von Pankreaskarzinomen getestete Tumorstammzellmarker**

<b>Tumormarker</b>	<b>Positivität (%)</b>	<b>Tumorigenität</b>	<b>Korrelationen</b>	<b>Publikation</b>
	2 - 9	bis 100 x		Li et al. (2007)
CD44	(67% der PDAK)		N-Status, nicht mit der Überlebenszeit	Immervoll et al. (2011)
	(42,5% der PDAK)		keine	Maeda et al. (2009)
CD24	3 - 28	bis 20 x		Li et al. (2007)
CD133	≤3,2	2000 x		Hermann et al. (2007), Hermann (2009)
	≤15 (60% der PDAK)		Grading, N-Status, Überlebenszeit	Maeda et al. (2008, 2009)
	(80% der PDAK)		keine mit TNM, Grading oder Überlebenszeit	Immervoll et al. (2008, 2011)
	negativ			Welsch et al. (2009)
CD44/CD133	(58,8% der PDAK)		mit T-/N-Status, Überlebenszeit	Maeda et al. (2009)
				Immervoll et al. (2011)
CD326	11 - 70	bis 20 x		Li et al. (2007)
CD166	(58% der PDAK)		Überlebenszeit, keine mit T-/N-Status oder Grading	Kahlert et al. (2009)
CD44/CD24	0,5 - 2	bis 100 x		
CD44/CD326	1 - 16,9	bis 100 x		
CD24/CD326	1,8 - 23			Li et al. (2007)
CD44/CD24/CD326	0,2 - 0,8	bis 100 x		

1. Einleitung

*b) An Pankreaskarzinom-Zelllinien getestete Tumorstammzellmarker*

<b>Tumor- marker</b>	<b>Zelllinie</b>	<b>Positivität (%)</b>	<b>Tumori- genität</b>	<b>Korrelationen</b>	<b>Publikation</b>
CD44	PANC-15	<17,5	10 x		Huang et al. (2008)
	HPAC, CFPAC			positiv mit Gemcitabine- Resistenz	Hong et al. (2009)
CD24	PANC-15	<70	10 x		Huang et al. (2008)
	HPAC, CFPAC			keine mit Gemcitabine- Resistenz	Hong et al. (2009)
CD133	PancTu1, A818-6	2			Olempska et al. (2007)
	SW1990 (SP-Zellen)	84			Yao et al. (2010)
	SW1990 (Nicht-SP- Zellen)	62			
CD326	HPAC, CFPAC			negativ mit Gemcitabine- Resistenz	Hong et al. (2009)
ABCG2	Panc1, Panc89, A818-6, PancTu1, Colo357	1-8			Olempska et al. (2007)
CD44/CD24	PANC-15	<3,5	20 x		Huang et al. (2008)
	SW1990 (SP-Zellen)	2,3			Yao et al. (2010)
	SW1990 (Nicht-SP- Zellen)	0,6			

untersuchten die Expression der Marker CD44 und CD24 in der Zelllinie PANC-1 und ermittelten deutlich mehr einfach als zweifach positive Zellen. Letztere zeigten nach Injektion in Nacktmäuse ein doppelt so hohes tumorigenes Potential wie die einfach posi-

## 1. Einleitung

ven Zellen. In der gleichen Zelllinie wiesen Zhou et al. (2008) SP-Zellen mit einem Anteil an der Gesamtzellzahl von bis zu 9% nach.

Yao et al. (2010) fanden in fünf Pankreaskarzinom-Zelllinien eine SP mit einem Anteil von 0,8% bis 7,6% an der Gesamtzellzahl. Die SP zweier Zelllinien wurden auf ihre Tumorigenität in Mäusen untersucht und zeigten ein zehnfach bzw. hundertfach erhöhtes tumorinduzierendes Potential im Vergleich zu den Zellpopulationen, die nach Sortierung keine SP-Zellen mehr enthielten. Bei Inkubation der Zelllinie SW1990 mit Antikörpern gegen CD44 und CD24 sowie gegen CD133 erwiesen sich 2,3% der SP-Zellen und 0,6% der Nicht-SP-Zellen als CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> und 84% bzw. 62% als CD133<sup>+</sup>.

Die Resistenz gegenüber Gemcitabine korrelierte positiv mit dem Anteil CD44-exprimierender und negativ mit dem Anteil CD326-exprimierender Zellen in den von Hong et al. (2009) untersuchten Zelllinien. Mit dem Anteil der CD24<sup>+</sup>-Zellen ergab sich kein Zusammenhang. Die Anreicherung resistenter Zellen in den Zellkulturen durch Zugabe von Gemcitabine führte zudem zur Erhöhung des tumorinduzierenden Potentials der beiden Zelllinien.

Für den in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenmarker CD166 wurde noch kein Zusammenhang mit Tumorstammzellen in Pankreaskarzinomen festgestellt. Kahlert et al. (2009) fanden aber immunhistochemisch in 56 von 97 PDAK-Paraffinschnitten die Expression von CD166, in 50 Fällen ausschließlich im Cytoplasma. In Normalgewebe war der Marker in der Membran der Azinuszellen zu finden. Es bestand eine negative Korrelation der Markerexpression mit der Überlebensrate der Patienten, keine hingegen mit Grading und Staging (Kahlert et al. 2009).

### **1.4.6 In dieser Arbeit untersuchte Tumorstammzellmarker**

#### **1.4.6.1 CD44**

Dieses Protein findet sich auf den meisten Wirbeltierzellen. Es ist beteiligt an der Regulation zellulärer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Motilität und Zelluntergang. Obwohl das kodierende Gen stark konserviert ist, sind CD44-Proteine sehr heterogen durch alternatives Splicing und post-translationale Prozesse, die von Zelltyp und Wachstumsbedingungen abhängen. CD44 besteht aus einer N-terminalen extrazellulären globulären

## 1. Einleitung

Domäne, die für die Interaktionen mit der extrazellulären Matrix verantwortlich ist. Daran schließt sich ein stark glykosilierter kurzer „Stamm“ an, an den viele heparinbindende Proteine andocken können. Dieser geht über in die Transmembrandomäne und den kurzen intrazellulären Schwanz (Ponta et al. 2003).

### **1.4.6.2 CD133**

Das menschliche CD133 (= Prominin-1 = AC133 Antigen) ist ein Transmembranprotein mit einem extrazellulären N-Terminus, zwei kurzen intrazellulären Loops, zwei großen extrazellulären Loops mit acht Glykosylierungsstellen und einem intrazellulären C-Terminus. Die Funktion dieses Proteins ist weitestgehend noch unklar (Fargeas et al. 2003).

### **1.4.6.3 CD166**

Ein Synonym für CD166 ist ALCAM (activated leucocyte cell adhesion molecule). Dieses zur Immunglobulin-Superfamilie gehörende, in höheren Wirbeltieren stark konservierte Protein besitzt fünf N-terminale extrazelluläre Immunglobulindomänen, eine Transmembrandomäne und eine kurze intrazelluläre C-terminale Domäne. Seine Funktion liegt im Bereich interzellulärer Interaktionen. Es ist zudem zur Bindung von HDL (high density lipoproteins) in der Lage. CD166 wurde in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen einschließlich Epithelien, lymphatischen und myeloischen Zellen, Knochenmark, Fibroblasten, Neuronen, Hepatozyten und pankreatischen Azinus- und Inselzellen nachgewiesen (Swart 2002).

### **1.4.6.4 CD326**

CD326 ist ein Typ I-Transmembran-Glycoprotein, das im Menschen ausschließlich auf Epithelien exprimiert wird. Der extrazelluläre Teil besteht aus einer Thyreoglobulin-Repeat-Domäne und einer EGF(= endothelial growth factor)-ähnlichen Domäne. Das Protein dient der Adhäsion zwischen Zellen, der Signalverarbeitung sowie der Zellmigration, -proliferation und -differenzierung (Bauerle und Gires 2007, Trzpis 2007).

### **1.4.7 Konsequenzen der Tumorstammzelltheorie für die Therapie**

Wenn entgegen früherer Vorstellungen nicht alle Zellen eines Tumors zur Proliferation in der Lage sind, sondern lediglich ein kleiner Anteil undifferenzierter Stammzellen, hat dies auch Konsequenzen für die Krebstherapie. Der Therapieerfolg wurde in der Vergangenheit in der Regel daran bemessen, dass der Tumor makroskopisch entfernt werden konnte (Zhou und Zhang 2008). Damit waren von der Therapie im Wesentlichen die ausdifferenzierten, nicht mehr teilungsfähigen Tumorzellen betroffen, die ohnehin zur Tumorregeneration nicht in der Lage wären. Von Tumorstammzellen hingegen wird angenommen, dass sie erheblich widerstandsfähiger gegenüber Chemotherapeutika aber auch Radiotherapie sind (Ischenko et al. 2010, Tang et al. 2007, Trumpp und Wiestler 2008). Da Stammzellen sich selten teilen, sind sie relativ unempfindlich gegen Substanzen, die zellzyklusspezifische Ziele angreifen. Zudem reagieren sie weniger auf Apoptosesignale und sind in der Lage, DNA-Schäden zu beheben (Tang et al. 2007). Stammzellen synthetisieren in hoher Zahl Zellmembranmoleküle, die als Transporter fungieren und mittels derer zellschädigende Substanzen effektiv aus der Zelle entfernt werden können (Dean et al. 2005, Trumpp und Wiestler 2008, Zhou und Zhang 2008). Die die Therapie überlebenden Tumorstammzellen sind zur Regeneration eines Tumors in der Lage, was eine Erklärungsmöglichkeit für Rezidive nach zunächst scheinbar erfolgreicher Therapie darstellen würde.

### **1.5 Aneuploidie im Pankreaskarzinom**

Aneuploidie, d.h. ein vom ganzzahlig Mehrfachen des vollständigen Chromosomensatzes abweichender nukleärer DNA-Gehalt, ist eine häufige Eigenschaft neoplastischer Gewebe. Ungeklärt ist, ob diese Aneuploidie die Ursache oder die Folge der malignen Transformation darstellt (Duesberg 2007, Holland und Cleveland 2009). Für viele Tumortypen wurde gezeigt, dass das Vorliegen aneuploider Zellen mit einer schlechteren Prognose der Patienten einhergeht (Atkin und Kay 1979, Frankfurt et al. 1984). Beide Sachverhalte bestätigten sich auch für das Adenokarzinom des Pankreas. In den meisten Untersuchungen erwiesen sich Tumoren in ca. 50-60% der Patienten als aneuploid (Alanen et al. 1990, Allison et al. 1991, Eskelinen et al. 1991 und 1992, Herrera et al. 1992, Porschen et al. 1993, Rugge et al. 1996, Yeo et al. 1995, Yoshimura et al. 1992). Einige Autoren fanden mit 90-100%

## 1. Einleitung

deutlich mehr aneuploide Tumoren (Böttger et al. 1994, Tsavaris et al. 2009, Weger et al. 1987, Weger et al. 1991), wobei anscheinend mit Feulgen-Densitometrie ein höherer Anteil aneuploider Tumoren gemessen wurde als mit Durchflusszytometrie.

Alle der genannten Autoren außer Böttger et al. (1994) und Herrera et al. (1992) stellten eine geringere Überlebenszeit für Patienten mit aneuploiden als für Patienten mit diploiden Tumoren fest. Dabei wurde zudem für Patienten mit anscheinend tetraploiden Tumoren eine höhere Überlebenszeit ermittelt als für Patienten mit anderweitig nicht-diploiden Tumoren (Böttger et al. 1994, Eskelinen et al. 1992, Linder et al. 1994, Weger et al. 1987).

Weiterhin wurde in einigen Studien ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Ploidie der Tumoren und ihrem Differenzierungsgrad (Alanen et al. 1990, Herrera et al. 1992), dem Tumorstadium (Weger et al. 1991, Yoshimura et al. 1992) sowie einem fortgeschrittenem Krankheitsverlauf (Alanen et al. 1990) festgestellt.

## 2. Fragestellung

Ziel war es, Tumorstammzellen im duktalem Adenokarzinom des Pankreas mittels Oberflächenmarkerproteinen immunhistochemisch zu identifizieren. Die Identifikation und Charakterisierung von Tumorstammzellen ist einerseits für die Entwicklung neuer, spezifischer Therapieansätze von Bedeutung, andererseits konnte für einige Malignome gezeigt werden, dass Typ und Menge von Tumorstammzellen eines Malignoms mitbestimmend für die Prognose des individuellen Patienten sind. Dieser zweite Gesichtspunkt sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden, die daher im Wesentlichen die drei folgenden Teilschritte beinhaltet:

1. Lässt sich immunhistochemisch eine unterschiedliche Expression der in anderen soliden Tumoren als Tumorstammzellmarker etablierten Proteine CD44, CD133, CD166 und CD326 zwischen klinischen Geweben von Pankreaskarzinomen und Normalgewebe des exokrinen Pankreas ermitteln?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression der genannten Membranproteine im Pankreaskarzinom und der Prognose der Patienten?
3. Kann der Ploidiestatus von Pankreaskarzinomen als Faktor für die Prognose eines Patienten angesehen werden und besteht ein Zusammenhang zwischen Ploidiestatus und Expression der oben genannten Marker im Pankreaskarzinom?

### 3. Material und Methode

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Patientenkollektiv

Die Kohorte dieser retrospektiven Studie umfasst Patienten aus der Biobank der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken, Klinik für Chirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Im Zeitraum von 2006 bis 2012 wurden rund 3000 Patienten im Rahmen des Biobankings routinemäßig erfasst. Die Proben wurden mit Einverständnis der Patienten und nach den Richtlinien der lokalen Ethikkommission gesammelt und verwendet (Universität zu Lübeck, #07-124). Patienten, die eine neoadjuvante Radio- oder Chemotherapie erhalten hatten, wurden nicht in die Studien aufgenommen.

Das hier analysierte Patientenkollektiv besteht aus 21 Frauen und 26 Männern im Alter zwischen 46,9 und 79,6 Jahren (Tab. 3), die an einem Pankreaskarzinom erkrankt waren. Das während der Operation entnommene Gewebe wurde vom Institut für Pathologie des UKSH routinemäßig in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und histologisch beurteilt. Für jeden Patienten wurde ein Paraffinblock für die Anfertigung von Gewebeschnitten ausgewählt. Von 44 Patienten wurde Karzinom- und Normalgewebe aus dem gleichen Paraffinblock untersucht, während von einer Patientin ausschließlich Normalgewebe und von einem Patienten sowie einer Patientin lediglich Tumorgewebe vorlag.

**Tab. 3. Geschlecht, Alter und Überlebenszeit des Patientenkollektivs**

<i>Merkmal</i>	<i>Wert</i>	<i>Karzinomgewebe</i> ( <i>n</i> = 46)	<i>Normalgewebe</i> ( <i>n</i> = 45)
<b><i>Geschlecht</i></b>	<i>Weiblich</i>	20	20
	<i>Männlich</i>	26	25
<b><i>Alter</i></b> ( <i>Jahre</i> )	<i>Mittelwert</i>	63,6	
	<i>Spannweite</i>	46,9 – 79,6	
<b><i>Überlebenszeit</i></b> ( <i>Monate</i> )	<i>Mittelwert</i>	21,3	<i>keine Angaben</i>
	<i>Spannweite</i>	0,5 – 139,9	

### 3. Material und Methoden

Neben dem Alter zum Diagnosezeitpunkt, der Überlebenszeit danach und dem Geschlecht der Patienten (Tab. 3) wurden auch Daten zur Tumorhistologie, Tumorlokalisation, zu Grading und Ploidie erhoben (Tab. 4). Anhand der TNM-Stadien erfolgte die Klassifikation der Karzinome gemäß der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC; Internationale Vereinigung gegen Krebs; Sobin et al. 2009). Die UICC-Stadien wurden zusammengefasst als Früh- (UICC I und II, n = 36) bzw. Spätkarzinome (UICC III und IV, n = 10).

**Tab. 4. Klinische Details des Patientenkollektivs mit Diagnose Pankreaskarzinom**

<b>Klinischer Parameter</b>	<b>Wert</b>	<b>Pankreaskarzinom-Gewebe n (%)</b>
<b>Histologie</b>	<i>duktal</i>	23 (50)
	<i>zystisch</i>	7 (15,2)
	<i>muzinös</i>	2 (4,3)
	<i>nicht definiert</i>	14 (30,4)
<b>Lokalisation des Tumors</b>	<i>Pankreaskopf</i>	32 (69,6)
	<i>Pankreaskorpus</i>	9 (19,6)
	<i>Pankreasschwanz</i>	4 (8,7)
	<i>nicht definiert</i>	1 (2,2)
<b>T-Status (Tumorgroße)</b>	<i>T1</i>	3 (6,5)
	<i>T2</i>	11 (23,9)
	<i>T3</i>	25 (54,3)
	<i>T4</i>	7 (15,2)
<b>N-Status (Lymphknoten- Status)</b>	<i>N0</i>	13 (28,3)
	<i>N1</i>	30 (65,2)
	<i>nicht definiert</i>	3 (6,5)
<b>M-Status (distale Metastase)</b>	<i>M0</i>	9 (19,6)
	<i>M1</i>	4 (8,7)
	<i>nicht definiert</i>	33 (71,7)
<b>Grading</b>	<i>G1</i>	2 (4,3)
	<i>G2</i>	19 (41,3)
	<i>G3</i>	19 (41,3)
	<i>nicht definiert</i>	6 (13%)
<b>UICC-Status</b>	<i>I</i>	0 (0)
	<i>II</i>	36 (87,2)
	<i>III</i>	5 (10,9)
	<i>IV</i>	5 (10,9)

### 3. Material und Methoden

#### 3.1.2 Chemikalien

Aktivkohle	Merck; 1.02183.1000
Antibody Diluent	Dako, S3022
Aquatex	Merck; 1.08562.0050
Blockierungslösung: Dako Protein Block	Dako, X0909
Ethanol absolut (99,8 %)	BÜFA Chemikalien; 10002723004
Entellan	Merck; 1.07961.0100
Formaldehyd säurefrei pH 7	Carl Roth; 2213.3
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth; T865.2
Kaliumdisulfit ( $K_2S_2O_5$ ) 98%	Sigma-Aldrich; 30,840-4
Natriumchlorid	Merck; 1.06404.1000
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, 1.06448.1000
Natriumdisulfit ( $Na_2S_2O_5$ )	Sigma-Aldrich; 24,397-3
Peroxidase-Blocking-Lösung	Dako, S2001
Pararosanilin (Basic Fuchsin)	Sigma-Aldrich; 857343-256
Salzsäure 37%	Merck; 1.13386.2500
Substratlösung: DakoCytomation AEC Substrate Chromogen Ready-to-Use	Dako, K3464
Trizma base ( $C_4H_{11}NO_3$ )	Sigma-Aldrich; T1503-1KG
Trizma hydrochlorid ( $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ )	Sigma-Aldrich; T3253-1KG
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, 1.08597.1000
Xylol (Xylen)	Avantor Performance Materials; 8118

#### 3.1.3 Puffer und Lösungen

##### Natriumcitrat-Lösung:

2,9 g Natriumcitrat-Dihydrat + 1 L Milli-Q-Wasser; pH 6,0 einstellen mit 1M NaOH

##### Natriumdisulfit-Lösung:

Stammlösung: 2,4 g  $Na_2S_2O_5$  + 125 mL Milli-Q-Wasser

Arbeitslösung: 10 mL Stammlösung + 10 mL HCL 1M + 180 mL Milli-Q-Wasser

### 3. Material und Methoden

#### Schiff's Reagenz:

(150 mL HCL 1M + 5 g Pararosanilin) + (5 g  $K_2S_2O_5$  + 850 mL Milli-Q-Wasser)

(Zubereitung siehe Abschnitt 8.3.4)

#### TRIS-Puffer:

2,8 g Trizma base + 17,1 g Trizma hydrochlorid + 26,8 g NaCl + 2,5 L Milli-Q-Wasser

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Alufolie

Aqua bidest. MQ

Deckgläser 24 x 60 mm

Einmalhandschuhe Peha Soft

Faltenfilter 595½, 240mm Durchmesser

Milli-Q-Filter MILLIPAK 40 22µm

Objektträger Superforst Plus

Pipettenspitzen 1000 µL, 200 µL, 10 µL

PP tubes 15 mL, 50 mL

Reaktionsgefäße Safe-Seal 2 mL, 1,5 mL, 0,5 mL

Merck Millipore

Gerhard Menzel GmbH, D-38116

Braunschweig

PAUL HARTMANN AG

Schleicher & Schüll; 10311651

Merck Millipore; MPGPO04001

Gerhard Menzel GmbH, D-38116

Braunschweig

SARSTEDT; 70.762, 70.760.002,  
70.1115

Greiner; 188261, 227261

SARSTEDT; 72.695, 72.706.400,  
72.735.100

### 3.1.5 Geräte

Autoklav

Brutschrank Heraeus 206

Färbekammer: Square BioAssay Dish 245 x 245 mm

Fluoreszenzmikroskop Axioplan

Gefrierschrank (-80°C)

Webeco

Heraeus

Corning Incorporated

Zeiss

Thermo Fisher Scientific

### 3. Material und Methoden

Gefrierschränke (-20°C)	AEG, Siemens
Glasküvetten	Glaswerk Wertheim
Glaswaren	Duran Group
Halbautomatische Pipetten (1000 µL, 100 µL, 20 µL, 10 µL, 2,5 µL)	Eppendorf
Kühlschränke, verschiedene	Privileg, Bosch
Lichtmikroskop Axioskop	Zeiss
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 10	Zeiss
Videokamera CCCD-IRIS/RGB	Sony
Waage SBC 32	Scaltec Instruments
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q Q-POD	Merck Millipore

### 3.1.6 Antikörper

*Tab. 5. Aufstellung der verwendeten Antikörper*

#### *a) Primärantikörper gegen Stammzellmarker*

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Wirtsorganismus</i>	<i>Hersteller &amp; Katalog-Nummer</i>
<i>anti-CD133</i>	<i>C24B9</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>New England Biolabs, #3663</i>
<i>anti-CD326</i>	<i>Ber-EP4</i>	<i>Maus</i>	<i>Dako, #M0804</i>
<i>anti-CD44</i>	<i>G44-26</i>	<i>Maus</i>	<i>BD Pharmigen, #550392</i>
<i>anti-CD166</i>	<i>MOG/07</i>	<i>Maus</i>	<i>Abcam, #ab49496</i>

#### *b) Sekundärantikörper*

<i>Isotypenname</i>	<i>Wirtsorganismus</i>	<i>Zugeordneter Primärantikörper</i>	<i>Hersteller &amp; Katalog-Nummer</i>
<i>EnVision<sup>+</sup> System-HRP</i>	<i>Maus</i>	<i>CD133</i>	<i>Dako, #4008</i>
<i>EnVision<sup>+</sup> System-HRP</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>CD326, CD44, CD166</i>	<i>Dako, #4004</i>

### 3. Material und Methoden

#### 3.1.7 Software

Adobe Photoshop CS2

Adobe Acrobat Reader 9.5

Zytometrie-Software ACAS ICM

Windows XP

OpenOffice

SPSS Statistics V19

SigmaPlot 2000

Adobe Systems Inc.

Adobe Systems Inc.

Dr. Olaf Ahrens,

Messtechnische

Beratung, D-22941

Bargtheide

Microsoft

OpenOffice

IBM

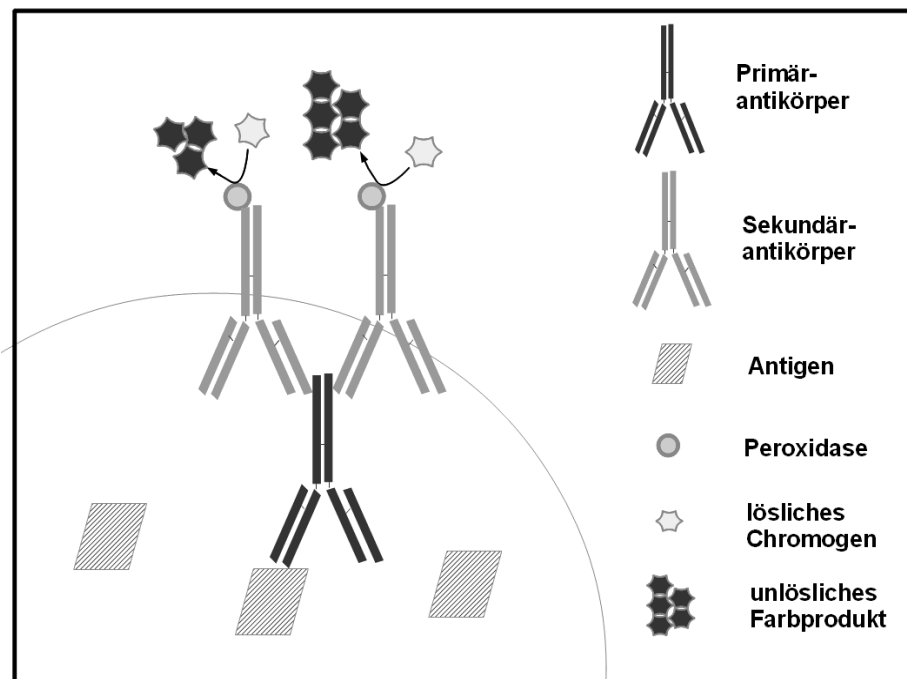
Systat Software

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Immunhistochemie

#### 3.2.1.1 Prinzip der Peroxidase-Methode

Für die immunhistochemische Färbung wurde die indirekte Methode der Immunperoxidase-Technik verwendet (Abb. 4). Dabei bindet zunächst ein Primärantikörper an das spezifische Epitop des zu untersuchenden Antigens und an diesen nachfolgend wiederum ein mit Peroxidase konjugierter Sekundärantikörper. Bei Zugabe einer Substratlösung, die Wasserstoffperoxid und ein Chromogen enthält, wird das Chromogen von der Peroxidase am Reaktionsort zu einem unlöslichen Farbprodukt polymerisiert.



**Abb. 4. Schematische Darstellung der Peroxidase-Methode.** Der Primärantikörper bindet spezifisch an das Antigen auf der Zelloberfläche. An diesen wiederum bindet der mit dem Enzym Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper. Die Peroxidase katalysiert die Umsetzung eines farblosen löslichen Chromogens zu einem farbigen unlöslichen Polymer. Sowohl die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper als auch die Umsetzung sehr vieler Chromogenmoleküle durch die Peroxidase führen zu einer deutlichen Signalverstärkung.

#### **3.2.1.2 Durchführung der Peroxidase-Methode**

Die auf Objektträgern fixierten 4 µm dicken Paraffinschnitte wurden zunächst für 3 x 10 Minuten im Xylolbad entparaffiniert und dann in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert (je 2 x 3 Minuten in 100% bzw. 96%, 1 x 3 Minuten in 70 %). Anschließend wurden die Präparate 3 x 3 Minuten in deionisiertem Wasser gespült (Protokoll in Abschnitt 8.3.1).

Es wurde nachfolgend eine Antigendemaskierung durchgeführt, um Einflüsse der Fixierung und Einbettung des Präparates auf Proteinstrukturen des Antigens rückgängig zu machen und so die Epitoperkennung durch den Antikörper zu optimieren. Dazu wurden die Präparate in Citratpuffer (pH 6) in der Mikrowelle fünf Minuten bei 900 Watt erhitzt, wobei der Puffer aufkocht, und anschließend 2 x 7 Minuten bei 360 Watt inkubiert. Hierbei sollte der Puffer nicht kochen und ein Austrocknen der Präparate durch Nachfüllen von deionisiertem Wasser verhindert werden. Nachdem die Präparate im Puffer nach 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie 3 x 3 Minuten im Schüttelbad mit deionisiertem Wasser gewaschen. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer. Vor Beginn der Antigen-spezifischen Färbung wurde das Präparat mit Wasserstoffperoxid behandelt, um gewebseigene Peroxidaseaktivität zu blockieren, die eine unspezifische Färbung verursachen könnte. Hierzu wurden die Präparate mit je 200 µL 3 %igem Wasserstoffperoxid überdeckt, für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x 3 Minuten im Schüttelbad mit TBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen im Präparat erfolgte daraufhin eine Überdeckung der Abschnitte mit Blockierungslösung (Dako Protein Block Serum Free Ready to Use). Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung von den Objektträgern abgossen und 200 µL verdünnte Primärantikörperlösung aufgetragen. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurden die Objektträger 3 x 5 Minuten in TBS im Schüttelbad gewaschen. Anschließend wurden die Präparate mit Sekundärantikörperlösung überdeckt (Anti-Mouse für Anti-CD44, Anti-CD166 und Anti-CD326, Anti-Rabbit für Anti-CD133) und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten abermals drei Waschschrte für je 5 Minuten im Schüttelbad mit TBS. Nach Zugabe von Substratlösung auf die Präparate wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Objektträger wurden nun 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen, dann eine Minute mit Hämatoxylin gegengefärbt und anschlie-

### 3. Material und Methoden

ßend abermals 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Nach Eindecken mit Aquatex wurden die Objektträger über Nacht getrocknet, bevor sie mikroskopiert wurden (Protokolle in Abschnitt 8.3.2 und 8.3.3).

#### **3.2.1.3 Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Präparate**

Die immunhistochemische Färbung wurde durch vier Beobachter in Zusammenarbeit mit Prof. Thorns (Institut für Pathologie, UKSH Lübeck) unabhängig voneinander mittels eines semiquantitativen Scorings beurteilt. Anhand des Anteils angefärbter Zellen erfolgte für jeden der vier Antikörper die Zuordnung zu einem von vier Scores (Score 0: < 1% positive Zellen, Score 1:  $\geq$  1-20% positive Zellen, Score 2: > 20-50%, Score 3: > 50-100%) jeweils für Tumorgewebe und, falls vorhanden, Normalgewebe eines Präparates.

#### **3.2.2 Ploidiemessung**

Bei der Feulgen-Densitometrie wird die DNA des zu untersuchenden Gewebes selektiv gefärbt, so dass sich der DNA-Gehalt einzelner Zellkerne mikroskopisch messen lässt. Ein Vergleich mit diploiden Referenzkernen ermöglicht die Ermittlung der Ploidie der untersuchten Kerne.

##### **3.2.2.1 Reaktionsprinzip der Feulgenfärbung**

Bei dem erstmals 1924 von Feulgen und Rossenbeck beschriebenen, hier etwas modifizierten Verfahren, werden durch Säurebehandlung die durch Wasserstoffbrücken verbundenen DNA-Doppelstränge getrennt und selektiv die N-glykosidische Bindung zwischen Desoxyribose und Purinbasen hydrolysiert. Dadurch werden an den Desoxyriboseresten der nun purinbasenfreien DNA Aldehydgruppen exponiert. Bei Zugabe des Pararosanilin (= Parafuchsin), Kaliumdisulfit ( $K_2S_2O_5$ ) und Salzsäure enthaltenden Schiff's Reagenz zum Nachweis freier Aldehydgruppen bindet eine Aminogruppe des Pararosanilins kovalent über  $SO_2$  an die freie Aldehydgruppe der Desoxyribose. Während im Schiff's Reagenz an das zentrale Kohlenstoffatom des Pararosanilins  $SO_2$  gebunden ist und die Verbindung

### 3. Material und Methoden

konjugierter Doppelbindungen zwischen den drei Benzenringen unterbricht, so dass der Farbeffekt verloren geht, wird während der Bindung an Aldehyd  $\text{SO}_2$  wieder freigesetzt und die Farbigekeit des Pararosanilins wieder hergestellt. Da der Farbstoff nicht spezifisch an andere Bestandteile des vorbehandelten Gewebes bindet und die Menge gebundenen Farbstoffs direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zellkerne ist, lässt sich dieser mittels Extinktionsmessung mikroskopisch ermitteln.

#### **3.2.2.2 Färbeprozess**

Die 28  $\mu\text{m}$  dicken Gewebeschnitte wurden zunächst im Xylolbad entparaffiniert, in absteigender Alkoholreihe rehydriert (Protokoll in Abschnitt 8.4.1) und über Nacht bei Raumtemperatur in 4,5% Formaldehyd fixiert. Am folgenden Tag wurden die Präparate nach vorsichtigem Spülen in Leitungswasser für 60 Minuten bei Raumtemperatur in 5M Salzsäure hydrolysiert. Anschließend wurden sie in Aqua dest. gespült und für 120 Minuten bei Raumtemperatur im abgedunkelten Schiff's Reagenz inkubiert. Nach erneutem Spülen wurden sie dreimal für 10 Minuten in Natriumdisulfidlösung gewaschen und unter fließendem Leitungswasser gespült. Schließlich erfolgte die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylolbad sowie die Eindeckung mit Entellan (detailliertes Protokoll in Abschnitt 8.3.4).

#### **3.2.2.3 Messprinzip der Densitometrie**

Die Feulgen-Densitometrie beruht auf der Lichtabsorption durch an die DNA gebundenen Farbstoff. Um diese zu ermitteln, wird die Lichttransmission einer Kernregion gemessen. Als Referenzwert dient eine kernfreie Region des Objektträgers. Da die Transmission im Wesentlichen von der Menge gebundenen Farbstoffs und der vom Lichtstrahl zu durchdringenden Schichtdicke abhängt, kommt bei der Berechnung der Absorbanz das Lambert-Beersche Gesetz zur Anwendung. Um der inhomogenen DNA-Verteilung innerhalb eines Zellkerns und unterschiedlichen Kerngrößen Rechnung zu tragen, wird bei der bildanalytischen Feulgen-Densitometrie die Kernregion nicht als Einheit gemessen, sondern durch einen Charge-coupled Device (CCD)-Sensor der Videokamera, die das Mikroskopbild auf

### 3. Material und Methoden

einen Computer überträgt, in ein Raster aus optisch homogenen Pixeln gleicher Größe eingeteilt. Die Lichtintensität der einzelnen Pixel wird über Graustufen gemessen und aus den Einzelwerten der Pixel die Absorbanz des jeweiligen Kerns errechnet.

#### **3.2.2.4 DNA-zytometrischer Messvorgang**

Nach Einstellung eines zu untersuchenden Präparateabschnittes am Mikroskop (Zeiss Axio-plan Mikroskop, Achroplan-Objektiv 40x) wurde das durch die auf dem Mikroskop installierte CCD-Video-Kamera erzeugte Bild auf einem Rechner digitalisiert. Am Bildschirm markierte der Untersucher mit der Computermaus Zellkerne, die für die Analyse in Frage kamen. Die Partikeldetektion erfolgte daraufhin über einen Schwellenwert relativ zum Umgebungslicht. Der Untersucher konnte dabei durch Regelung der Diskriminationsempfindlichkeit die DNA-Detektion durch die Software so steuern, dass der Kern vollständig markiert wurde. Da von der Software gleichzeitig die Partikelfläche bestimmt wurde, konnte der Extinktionswert aus der Anzahl und den Grauwerten der einzelnen Pixel eines Partikels durch die Software berechnet werden.

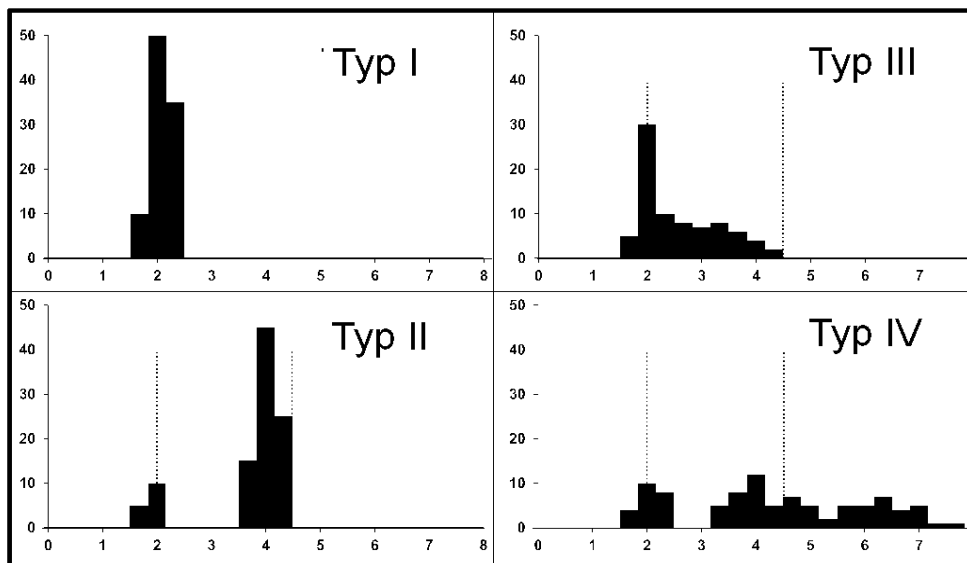
Pro Präparat wurden je nach Verfügbarkeit 150 bis 300 Zellkerne untersucht, wobei beschädigte, pyknische oder mitotische Zellkerne von der Analyse ausgeschlossen wurden. Als Referenz dienten während des gleichen Messvorgangs 30 lymphatische Zellen aus einem Tonsillenabstrich auf einem separaten Objektträger, der zusammen mit den zu untersuchenden Tumorpräparaten fixiert und gefärbt worden war. Zusätzlich wurden im Tumorpräparat Lymphozyten untersucht.

#### **3.2.2.5 Interpretation der DNA-Histogramme**

Aus den Zellkern-DNA-Gehalten einer Messung wurden mit dem Computer-Programm ACAS ICM (Ahrens Messtechnische Beratung, Bargteheide) Histogramme dargestellt und diese anschließend von drei Beobachtern unabhängig voneinander den vier von Auer et al. (1980) beschriebenen Histogrammtypen zugeordnet (Abb. 5). Beim Histogrammtyp I liegt der mittlere DNA-Gehalt der untersuchten Kerne in der Region des diploiden Wertes normaler Zellen von 1,5-2,5C, wobei 1C dem DNA-Gehalt von Gameten entspricht. Der An-

### 3. Material und Methoden

teil der Zellen mit einem DNA-Gehalt über  $2,5C$  beträgt weniger als 10%. Beim Typ II weisen die untersuchten Kerne entweder tetraploide oder di- und tetraploide Werte auf, der Anteil der Kerne mit mehr als  $4,5C$  liegt unter 10%. Typ III zeigt ebenfalls jeweils einen Peak in der diploiden und der tetraploiden Region auf, die dabei leicht von diesen abweichen, aber auch Zellen mit DNA-Gehalten zwischen diesen Werten entsprechend einer S-Phase normaler Zellen. Weniger als 5% der Kerne liegen über  $4,5C$ . Aufgrund dieser Konstellation sind diese drei Typen als nahezu euploid anzusehen. Beim Typ IV hingegen findet sich eine sehr ausgeprägte Aneuploidie, die stufenlos viele Werte zwischen diploid und mehr als oktaploid annehmen kann. Hier haben mehr als 5% der Kerne einen DNA-Gehalt über  $4,5C$ .



**Abb. 5.** Die vier DNA-zytometrischen Histogrammtypen nach Auer (1980). Typ I: ein Peak im Bereich diploider Kerne; Typ II: tetraploide oder di- und tetraploide Kerne; Typ III: di- und tetraploide sowie zwischen diesen Bereichen liegende Kerne; Typ IV: ausgeprägte Aneuploidie.

### 3.2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der immunhistochemischen Daten zur Phänotypisierung von Tumorstammzellen in klinischen Geweben erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS Statistics Version 19, die grafische Darstellung mittels SigmaPlot 2000.

Die Immunpositivität der vier getesteten Tumorstammzellmarker im Pankreasgewebe wurde anhand des beschriebenen semiquantitativen Scoring-Systems ausgewertet.

Zur Ermittlung von Korrelationen zwischen der Expression der einzelnen Tumorstammzellmarker und klinischen Parametern wie Malignität, Tumorlokalisierung innerhalb des Pankreas (Pankreaskopf, -korpus oder -schwanz), UICC-Stadium, TNM-Status und Grading sowie des Geschlechts dienten der  $\chi^2$ -Test und Fisher's Exact Test. Als nicht-parametrische Tests wurden der Mann-Whitney-U-Test (für 2 ungepaarte Gruppen) und der Kruskal-Wallis-Test (für mehr als zwei ungepaarte Gruppen) verwendet. Hiermit wurden signifikante Unterschiede zwischen Markerexpressionen verschiedener Gruppen bzw. Zusammenhänge zwischen Markerexpression und Alter ermittelt. Korrelationen zwischen den Expressionsintensitäten einzelner Tumorstammzellmarker wurden mit dem Spearman-Test detektiert. Korrelationskoeffizienten  $\rho$  zwischen 0,2 und 0,5 wurden als Hinweis auf eine schwache bis moderate und solche zwischen 0,5 und 0,8 als Hinweis auf eine mediane bis starke Korrelation angesehen.

Die Bedeutung des Ploidiestatus für das Patientenüberleben wurde ermittelt, indem die unterschiedliche Überlebenszeit in Monaten zwischen den Gruppen mittels U-Test auf Signifikanz geprüft wurde. Weiterhin wurde die Überlebenszeit beginnend mit dem Zeitpunkt der Tumorresektion nach Kaplan–Meier analysiert. Der Vergleich der Überlebenskurven der einzelnen Gruppen erfolgte mittels Log-Rank Test. P-Werte  $\leq 0,05$  wurden bei allen Analysen als statistisch signifikant angesehen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Immunhistochemische Färbung der Pankreas-Gewebeschnitte**

Die immunhistochemische Färbung (IHC) von Karzinom- und Normalgewebe wurde in 44 von 47 Fällen in verschiedenen Arealen innerhalb desselben Paraffinschnitts eines jeweiligen Patienten beurteilt. In einem Fall lag nur Normalgewebe ohne Tumoranteile vor, für zwei Patienten war nur Tumorgewebe ohne Anteile von Normalgewebe verfügbar. Somit standen insgesamt 46 Tumor- und 45 Normalgewebe von 47 Patienten für die IHC zur Verfügung. Die Bewertung der Färbung erfolgte in Kooperation mit Prof. Thorns, Institut für Pathologie, UKSH Lübeck, mittels des vorher bereits beschriebenen semiquantitativen Scorings (siehe Abschnitt 3.2.1.3). Dabei wurden nur Zellen des Gangepithels bzw. Gangepithel-ähnlicher Strukturen, nicht aber Azini in die Bewertung einbezogen.

Einige Schnitte mussten von der Auswertung ausgeschlossen werden, da sie sich während des Färbevorgangs zum Teil abgelöst hatten oder kein Pankreasgewebe aufwiesen. Eine Zwischenauswertung zeigte für den Marker CD166 keinerlei Zusammenhänge mit den übrigen untersuchten Parametern, so dass keine weiteren IHC-Experimenten mit diesem Marker erfolgten und insgesamt nur 21 Normalgewebe und 22 Tumoren bezüglich der CD166-Expression ausgewertet wurden. Bei den übrigen Markern gingen 31 Normalgewebe und 34 Tumoren für CD44, 39 Normalgewebe und 38 Tumoren für CD133 sowie 35 Normalgewebe und 36 Tumoren für CD326 in die Auswertung ein.

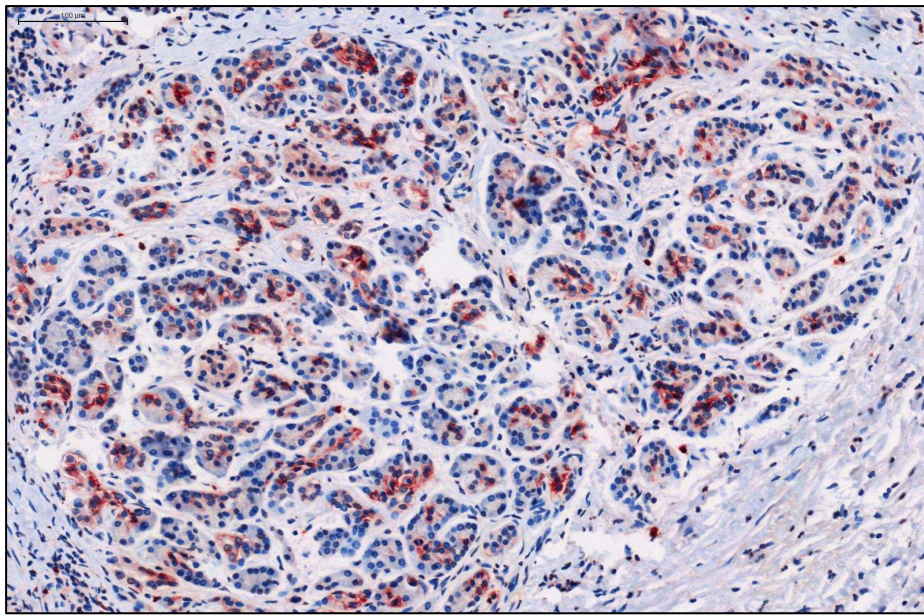
Die Marker-Expression wurde vier verschiedenen Kategorien zugeordnet (Scores 0-3, siehe Abschnitt 3.2.1.3).

## 4. Ergebnisse

### 4.1.1 Tumorstammzellmarker-Expression in Pankreas-Gewebe

#### 4.1.1.1 CD44

Im Normalgewebe exprimierten Zellen des Gangepithels CD44 gleichmäßig basolateral, wobei die Färbeintensität zu den größeren Ausführungsgängen hin abnahm (Abb. 6).

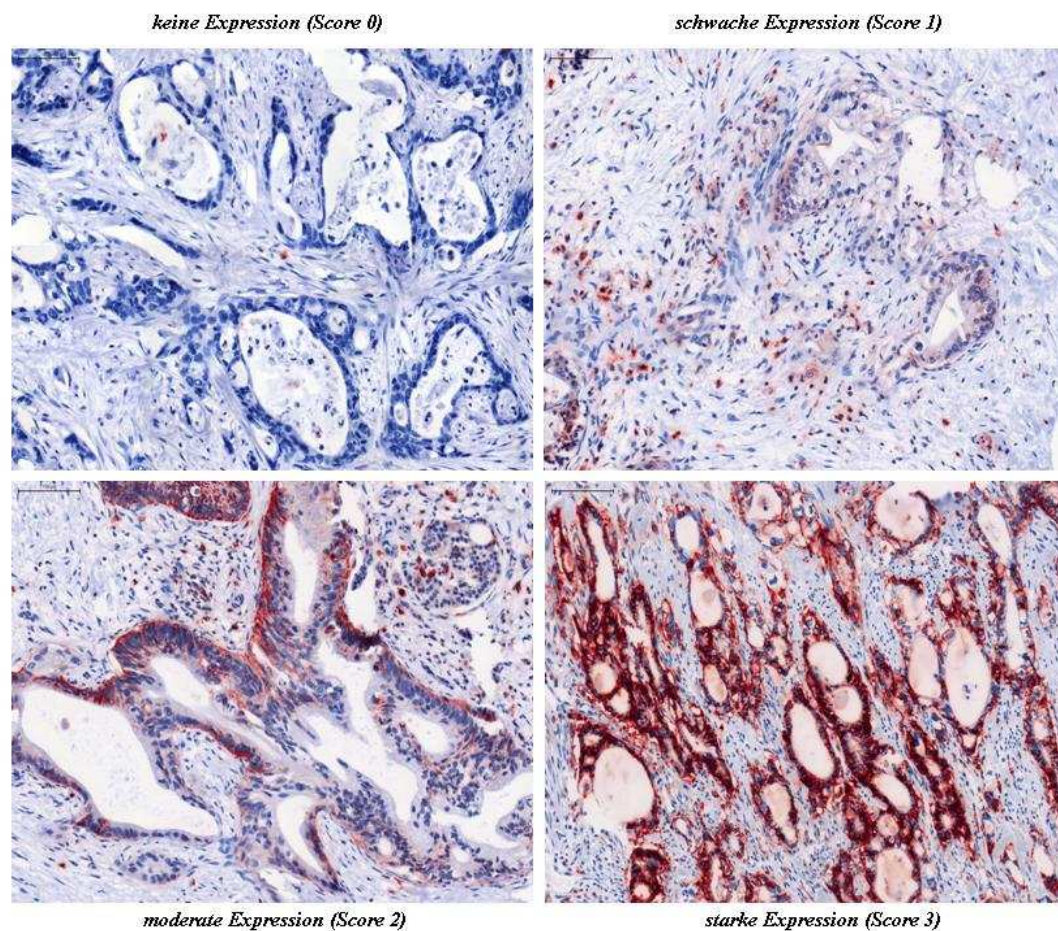


*Abb. 6. CD44-Expression in nicht-neoplastischem Pankreasgewebe. Die Färbung trat basolateral in Zellen des exokrinen Pankreas auf und war in kleineren Gängen intensiver als in größeren. (Maßstabsbalken: 100 µm)*

Von den 31 ausgewerteten Paraffinschnitten mit Normalgewebe wiesen 10 (32,3%) keine gefärbten Zellen auf (Score 0), 16 (51,6%) zeigten eine schwache Färbung (Score 1), drei (9,7%) entsprachen mit einer moderaten Färbung dem Score 2 und zwei (6,4%) zeigten eine starke Färbung (Score 3; Tab. 6).

Die Färbung des Tumorgewebes war sehr heterogen, und zwar auch innerhalb eines Schnittes und unabhängig vom Differenzierungsgrad eines Tumors. Die Tumorzellen exprimierten CD44 wie normale Epithelzellen v.a. basolateral, in aufgelockerten Zellverbänden aber auch in der gesamten Zellmembran, so z.B. in einigen schlecht differenzierten Tumoren (Abb. 7).

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 7. CD44-Expression im Pankreaskarzinom.** Tumorzellen exprimierten CD44 v.a. basolateral. Dargestellt sind exemplarisch die vier Intensitätsstufen der Markerexpression.

(Maßstabsbalken: 100 μm)

Von den 34 beurteilten Paraffinschnitten mit Tumorgewebe zeigten vier Präparate (11,8%) keine CD44-Expression (Score 0), 13 (38,2%) wiesen eine schwache (Score 1), sechs (17,6%) eine moderate (Score 2) und 11 (32,3%) eine starke CD44-Expression auf (Score 3).

Ein Vergleich von Tumor- und Normalgewebe zeigte häufiger eine starke Färbung des Tumorgewebes. In 50% der Tumoren wiesen mindestens 20% der Zellen eine CD44-Expression auf (Score 2+3), während dies nur auf 16% der Normalgewebe zutrifft. Die unterschiedliche Positivität der beiden Gruppen erweist sich im  $\chi^2$ -Test als signifikant ( $P =$

#### 4. Ergebnisse

0,019). Die positive Korrelation ist schwach, aber hochsignifikant ( $p = 0,368$ ,  $P = 0,001$ ).

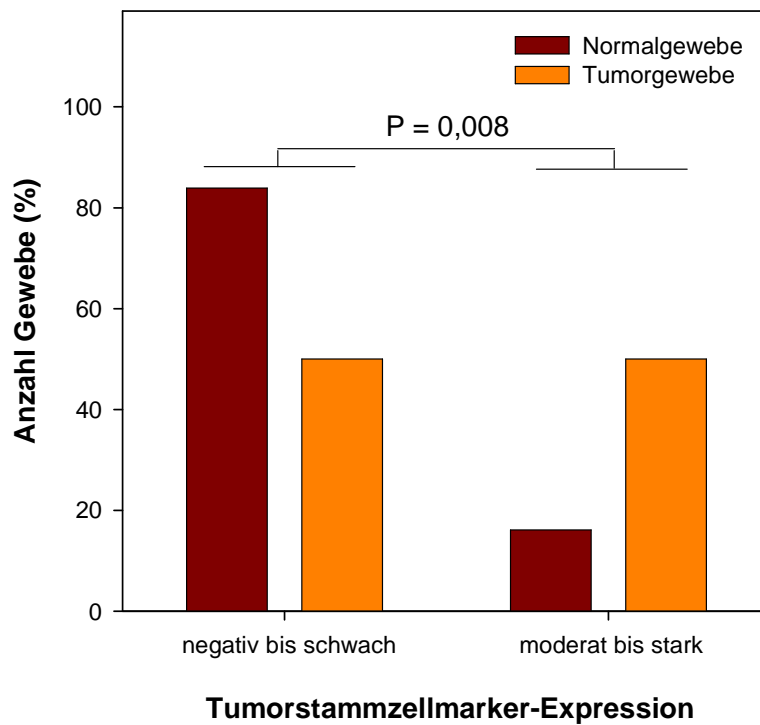
**Tab. 6. CD44-Expression in Karzinom- und Normalgewebe des exokrinen Pankreas**

Die Expression ist in vier Scores unterteilt (Score 0: < 1%, Score 1:  $\geq 1$ -20%, Score 2: > 20-50%, Score 3: > 50-100% positive Zellen) und der Anteil der Gewebeproben mit dem jeweiligen Score in absoluten Zahlen sowie in Prozenten angegeben (in Klammern).

<b>CD44-Expression</b>	<b>Karzinom- gewebe</b>	<b>Normal- gewebe</b>	<b>P-Wert</b>	<b>Spearman-Korrelation</b>	
				<i>Korrelationsfaktor</i>	<i>P-Wert</i>
<i>negativ (Score 0)</i>	4 (11,8%)	10 (32,3%)			
<i>schwach (Score 1)</i>	13 (38,2%)	16 (51,6%)	0,019	$p = 0,368$	0,001
<i>moderat (Score 2)</i>	6 (17,6%)	3 (9,7%)			
<i>stark (Score 3)</i>	11 (32,3%)	2 (6,4%)			
<i>Score 0+1</i>	17 (50,0%)	26 (83,9%)	0,008		
<i>Score 2+3</i>	17 (50,0%)	5 (16,1%)			

Fasste man die Scores 0 und 1 zu einer schwachen Expression zusammen und stellte diese einer starken Expression (Score 2 und 3) gegenüber, so ergab sich eine noch stärkere Signifikanz ( $P = 0,008$ ). Hierbei wiesen 26 Normalgewebe (83,9%), aber nur 17 Tumorgewebe (50,0%) eine schwache Expression auf. Eine starke Expression war nur bei fünf Normalgeweben (16,1%) aber 17 Tumorgeweben (50%) zu beobachten (Tab. 6, Abb. 8).

#### 4. Ergebnisse

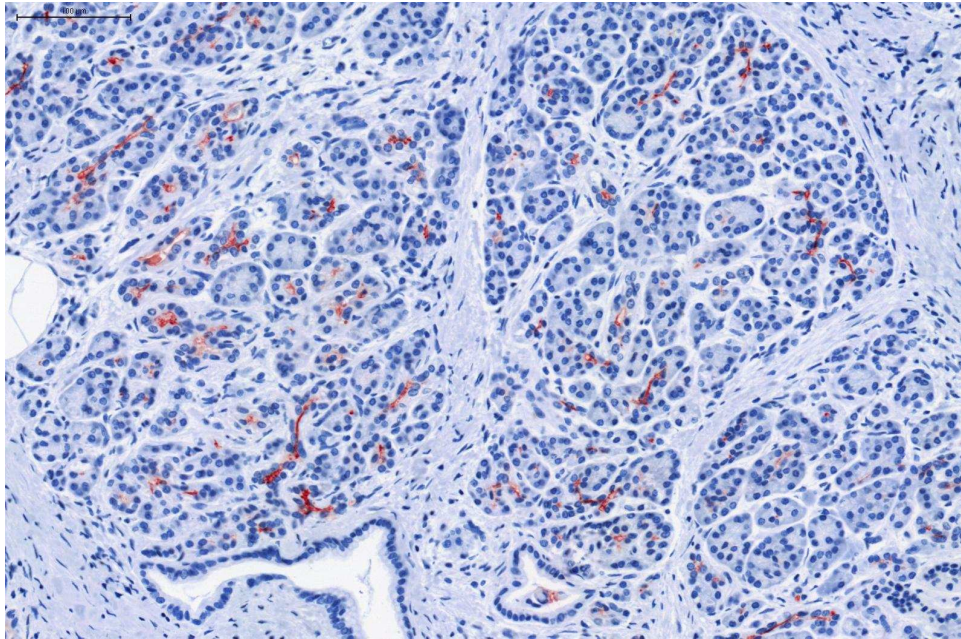


*Abb. 8. CD44-Expression in Tumor- und Normalgewebe. Die Scores 0 und 1 wurden zur Gruppe mit negativer und schwacher Expression zusammengefasst, die Score 2 und 3 zur Gruppe mit moderater bis starker Expression.*

#### 4.1.1.2 CD133

Auch CD133 wurde im Normalgewebe im Gangepithel mit abnehmender Intensität hin zu größeren Ausführungsgängen exprimiert, wobei die Färbung allerdings apikal und nicht basolateral auftrat (Abb. 9). Von den 46 Paraffinschnitten konnten 39 analysiert werden, unter denen 12 (30,8%) keine Expression aufwiesen (Score 0), acht (20,5%) eine schwache (Score 1), drei (7,7%) eine moderate (Score 2) und 16 (41,0%) eine starke (Score 3; Tab. 7).

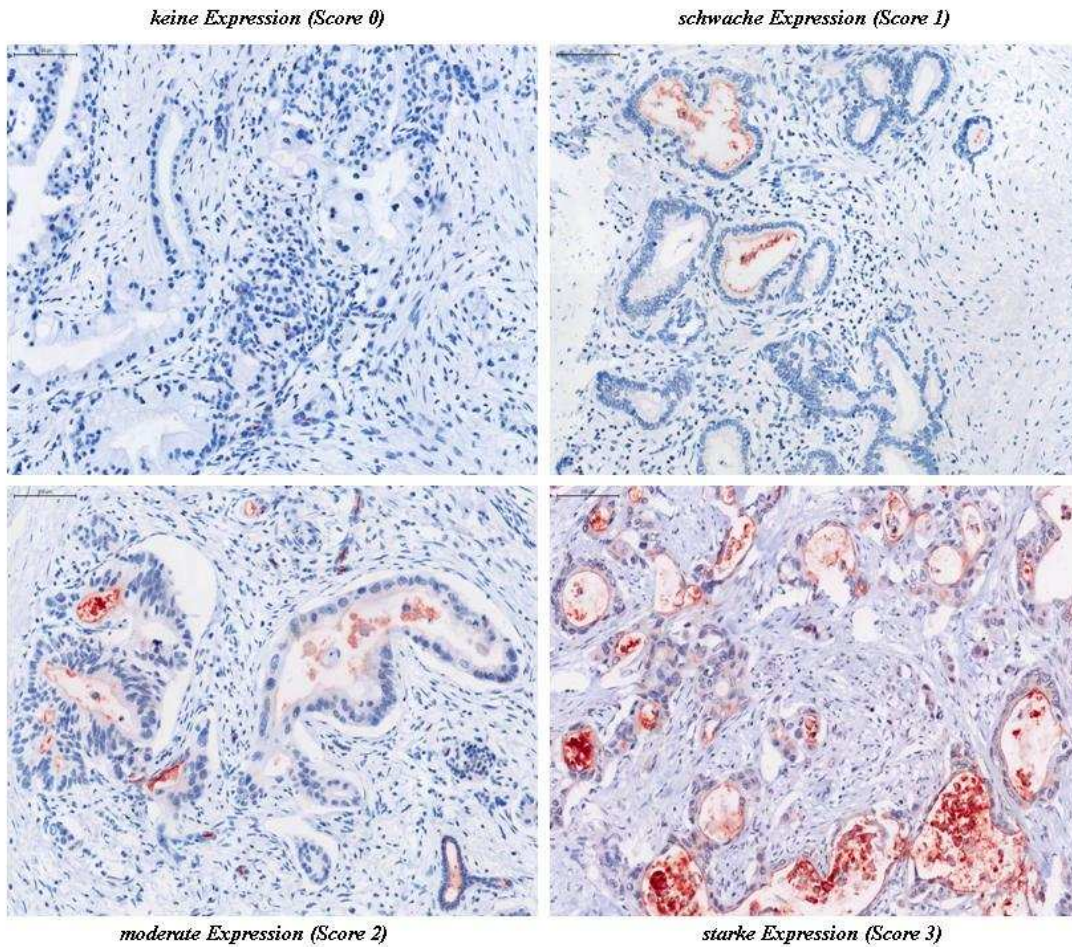
#### 4. Ergebnisse



**Abb. 9. CD133-Expression in nicht-neoplastischem Pankreasgewebe.** Die Färbung trat apikal in Zellen des exokrinen Pankreas auf und war intensiver in kleineren Ausführungsgängen als in größeren. (Maßstabsbalken: 100  $\mu\text{m}$ )

Im Tumorgewebe waren die dukta len Strukturen nicht durchgehend gefärbt wie im Normalgewebe, sondern einzelne Zellen exprimierten CD133 an der Apikalmembran (Abb. 10). Dementsprechend zeigten im Gegensatz zum Normalgewebe fast 81,6% der Tumoren eine schwache Expression (Score 0: 16 Tumoren [42,1%], Score 1: 15 Tumoren [39,5%]) und nur 18,4% eine starke (Score 2: 1 Tumor [2,6%], Score 3: sechs Tumoren [15,8%]). Anders als bei CD44 besteht eine negative Korrelation zwischen Malignität und CD133-Expression, die abermals schwach ( $p = -0,243$ ) aber ebenfalls signifikant ist ( $P = 0,033$ ). Weiterhin war die unterschiedliche CD133-Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe auch im  $\chi^2$ -Test statistisch signifikant ( $P = 0,041$ , Abb. 11).

#### 4. Ergebnisse



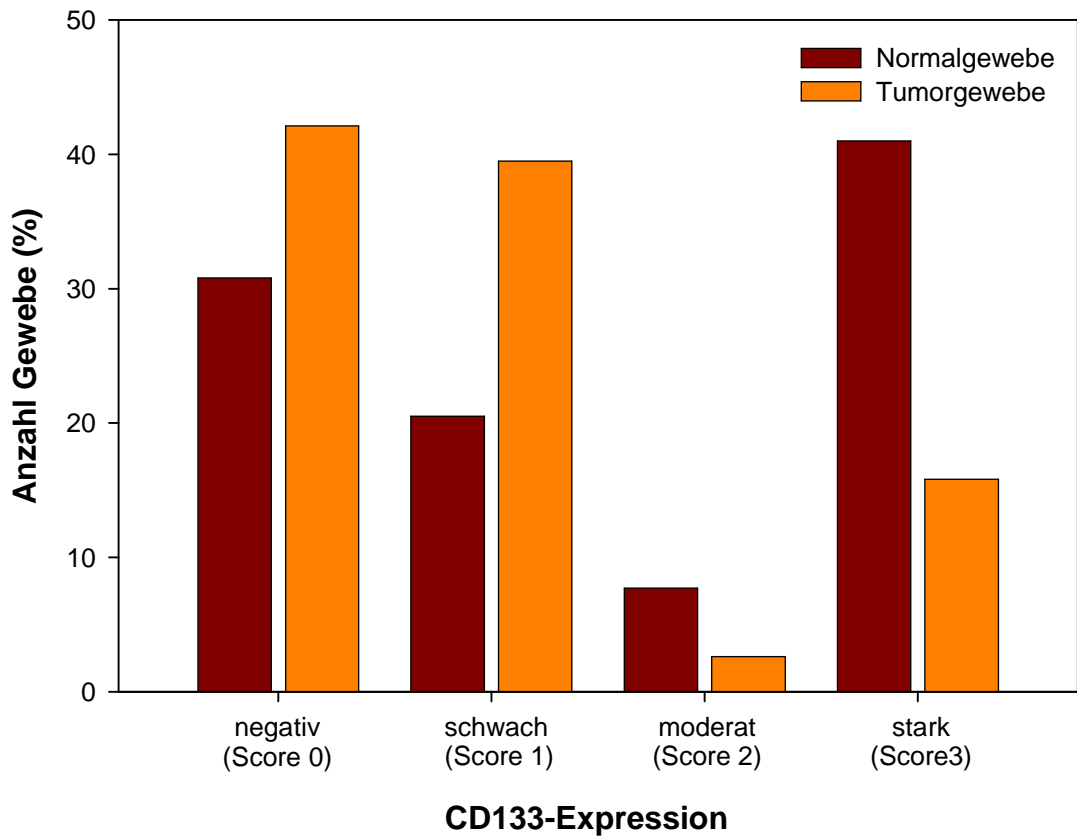
**Abb. 10. CD133-Expression im Pankreaskarzinom.** Tumorzellen exprimierten CD133 v.a. apikal. Dargestellt sind exemplarisch die vier Intensitätsstufen der Markerexpression. (Maßstabsbalken: 100 µg)

**Tab. 7. CD133-Expression in Karzinom- und Normalgewebe des exokrinen Pankreas**

Die Expression ist in vier Scores unterteilt (Score 0: < 1%, Score 1: ≥ 1-20%, Score 2: > 20-50%, Score 3: > 50-100% positive Zellen) und der Anteil der Gewebeproben mit dem jeweiligen Score in absoluten Zahlen sowie in Prozenten angegeben (in Klammern).

CD133-Expression	Karzinom- gewebe	Normal- gewebe	P-Wert	Spearman-Korrelation	
				Korrelationsfaktor	P-Wert
negative (Score 0)	16 (42,1%)	12 (30,8%)	0,041	$p = -0,243$	0,033
schwach (Score 1)	15 (39,5%)	8 (20,5%)			
moderat (Score 2)	1 (2,6%)	3 (7,7%)			
stark (Score 3)	6 (15,8%)	16 (41,0%)			

#### 4. Ergebnisse



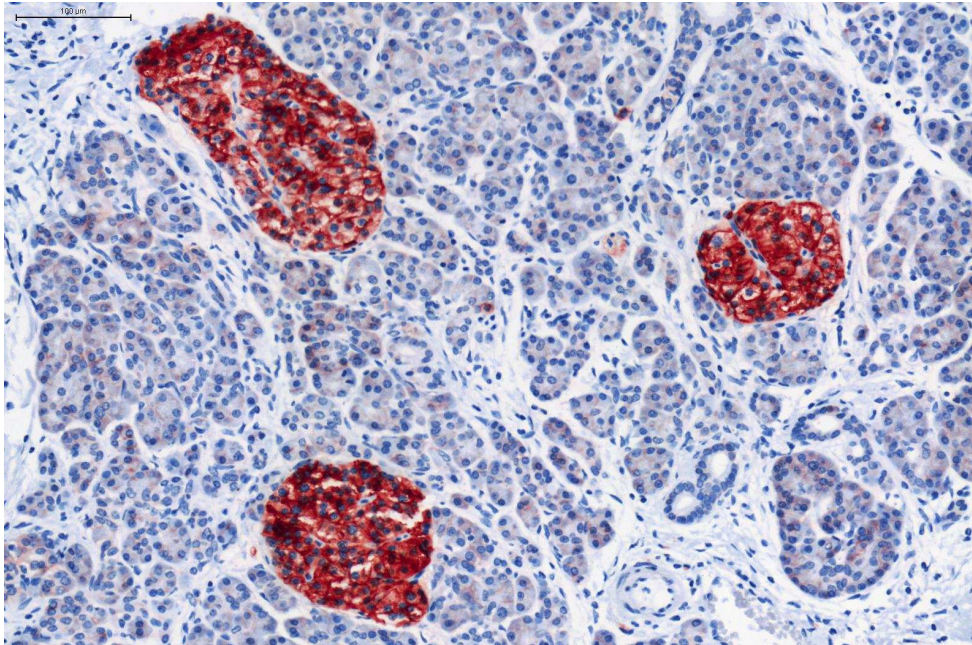
*Abb. 11. CD133-Expression in Tumor- und Normalgewebe. Die CD133-Expression in Tumor- und Normalgewebe war statistisch signifikant unterschiedlich ( $P = 0,041$ ).*

#### 4.1.1.3 CD166

CD166 wurde im nicht-neoplastischen Pankreas in den Membranen der Azinuszellen und, noch intensiver, der endokrinen Zellen exprimiert (Abb. 12). Im Pankreaskarzinom trat die Färbung im Zytoplasma der Epithelzellen duktaler Strukturen auf (Abb. 13). Der Marker war in Normal- und Tumorgewebe ähnlich stark exprimiert (Tab. 8). Bei einem (4,8%) Normal- bzw. zwei (9,1%) Tumorgeweben war keine CD166-Expression nachzuweisen (Score 0). Eine schwache Expression (Score 1) zeigte sich bei jeweils neun Normal- und Tumorgeweben (42,9% bzw. 40,9%), eine moderate Expression (Score 2) bei acht (38,1%) Normal- und fünf (22,7%) Tumorgeweben und eine starke Expression (Score 3) bei drei

#### 4. Ergebnisse

(14,3%) Normal- und sechs (27,2%) Tumorgeweben. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $P > 0,05$ ).



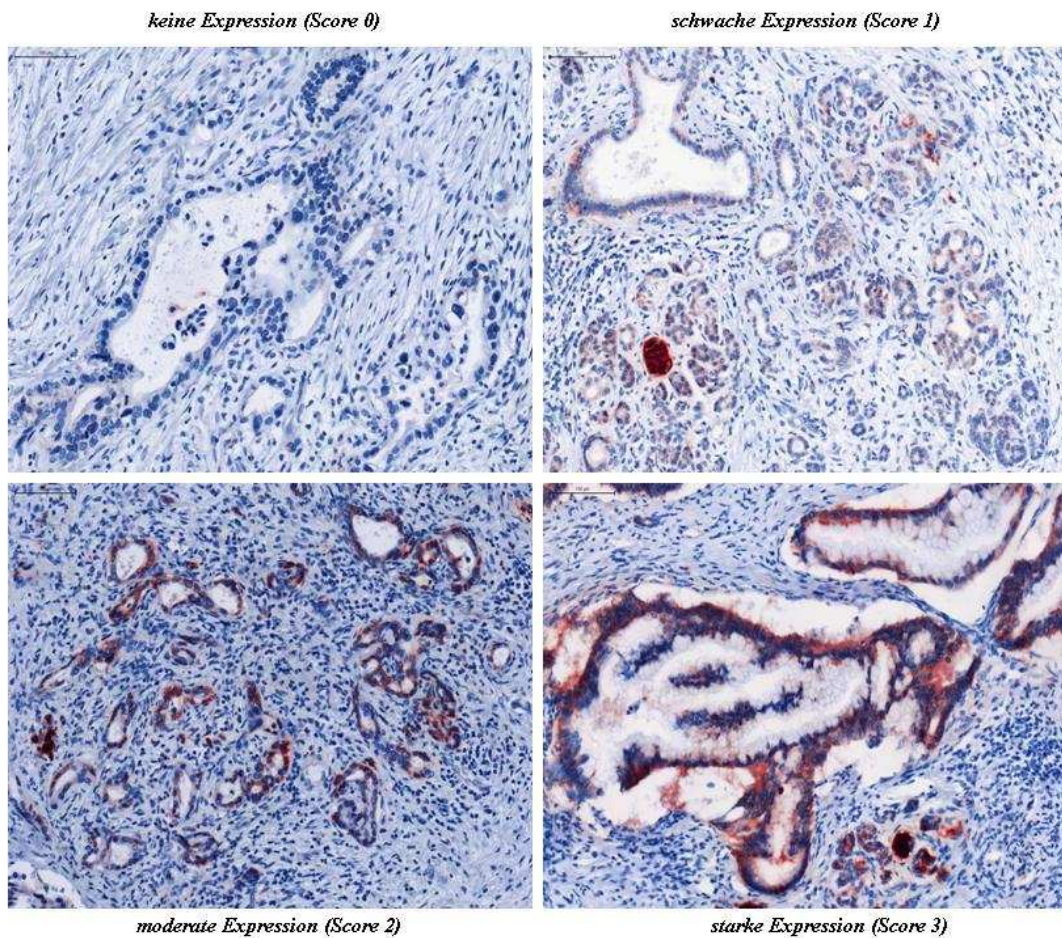
**Abb. 12. CD166-Expression in nicht-neoplastischem Pankreasgewebe.** Die Färbung trat in der Zellmembran der Azini und endokriner Zellen auf. Letztere waren deutlich intensiver gefärbt. (Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m)

**Tab. 8. CD166-Expression in Karzinom- und Normalgewebe des exokrinen Pankreas**

Die Expression ist in vier Scores unterteilt (Score 0:  $< 1$ , Score 1:  $\geq 1$ -20%, Score 2:  $> 20$ -50%, Score 3:  $> 50$ -100% positive Zellen) und der Anteil der Gewebeproben mit dem jeweiligen Score in absoluten Zahlen sowie in Prozenten angegeben (in Klammern).

<b>CD166-Expression</b>	<b>Karzinomgewebe</b>	<b>Normalgewebe</b>	<b>P-Wert</b>	<b>Spearman-Korrelation</b> P-Wert
<i>negativ (Score 0)</i>	2 (9,1%)	1 (4,8%)		
<i>schwach (Score 1)</i>	9 (40,9%)	9 (42,9%)	$> 0,05$	<i>n.s.</i>
<i>moderat (Score 2)</i>	5 (22,7%)	8 (38,1%)		
<i>stark (Score 3)</i>	6 (27,2%)	3 (14,3%)		

#### 4. Ergebnisse

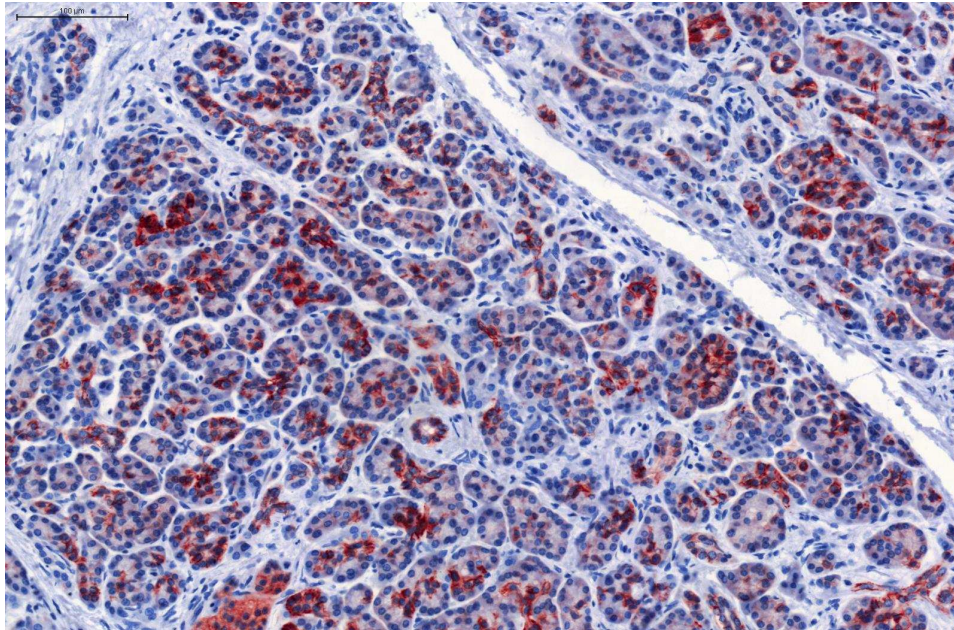


**Abb. 13. CD166-Expression im Pankreaskarzinom.** Tumorzellen exprimierten CD166 v.a. im Zytoplasma. Langerhans-Inseln wurden, soweit vertreten, ebenfalls gefärbt. Dargestellt sind exemplarisch die vier Intensitätsstufen der Markerexpression. (Maßstabsbalken: 100 µm)

#### 4.1.1.4 CD326

CD326 wurde im nicht-neoplastischen Pankreasgewebe v.a. in den Zellmembranen der kleineren Ausführungsgänge exprimiert, teilweise auch in denen der Azinuszellen (Abb. 14). Seltener lag eine zytoplasmatische Färbung vor. Im Pankreaskarzinom lag v.a. eine basolaterale Färbung duktaler Zellen vor, oft war basal auch das Zytoplasma gefärbt (Abb. 15). Auch Langerhans-Inseln exprimierten CD326 teilweise.

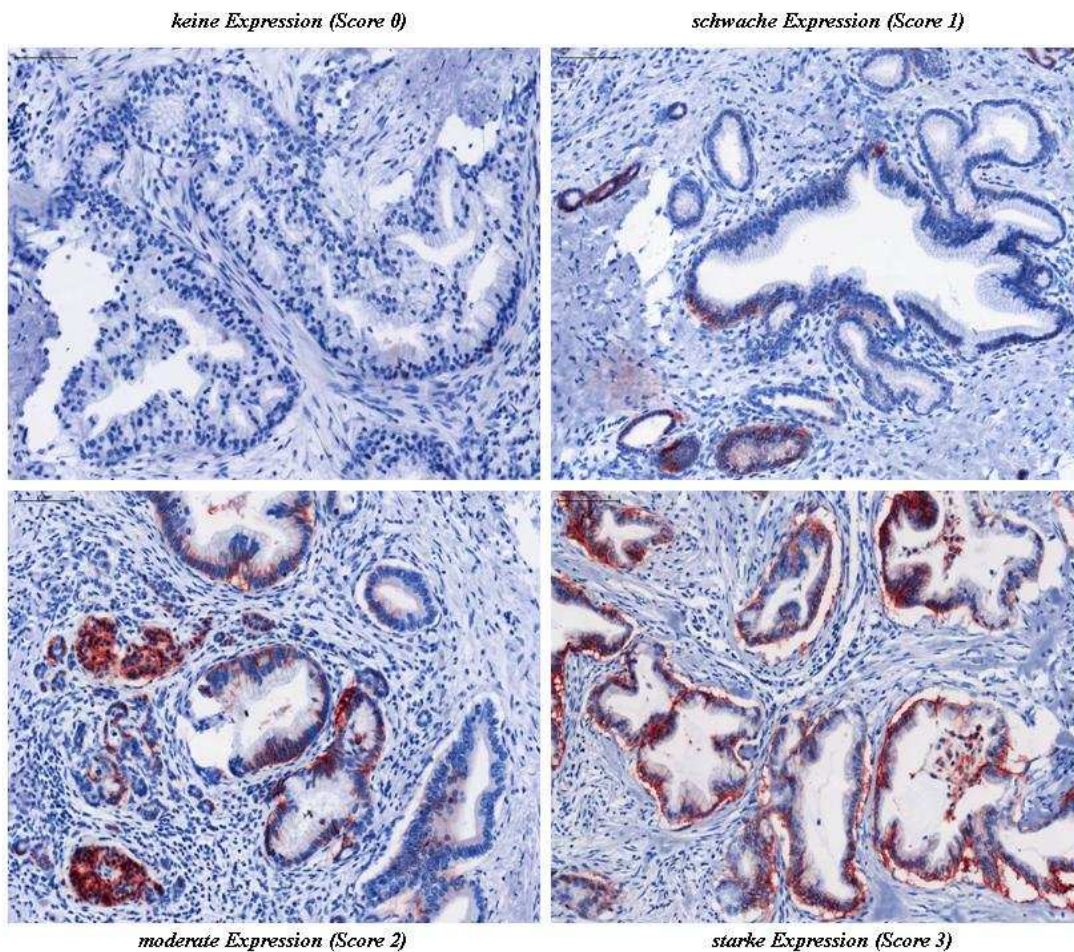
#### 4. Ergebnisse



**Abb. 14. CD326-Expression in nicht-neoplastischem Pankreasgewebe.** Die Färbung trat in der Zellmembran kleinerer Ausführungsgänge und weniger der Azini auf. Teilweise war auch das Zytoplasma gefärbt. (Maßstabsbalken: 100  $\mu\text{m}$ )

Hinsichtlich der Intensität gilt für den Marker CD326 ähnliches wie für CD166. Tumorgewebe zeigte tendenziell eine höhere CD326-Expression als Normalgewebe. Bei drei (8,3%) der Tumoren ließ sich keine CD326-Expression nachweisen (Score 0), zehn (27,8%) zeigten eine schwache (Score 1), acht (22,2%) eine moderate (Score 2) und fünfzehn (41,7%) eine starke Expression, wohingegen vier (11,4%) Normalgewebe keine (Score 0), elf (31,4%) eine schwache (Score 1), zwölf (34,3%) eine moderate (Score 2) und acht (22,9%) eine starke (Score 3) Expression aufwiesen (Tab. 9). Diese unterschiedliche Tendenz war statistisch nicht signifikant ( $P > 0,05$ ).

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 15. CD326-Expression im Pankreaskarzinom.** Tumoren exprimierten CD326 v.a. in der Zellmembran basolateral, oft auch basal im Zytoplasma. Langerhans-Inseln wurden ebenfalls gefärbt. Dargestellt sind exemplarisch die vier Intensitätsstufen der Expression. (Maßstabsbalken: 100 μm)

**Tab. 9. CD326-Expression in Karzinom- und Normalgewebe des exokrinen Pankreas**

Die Expression ist in vier Scores unterteilt (Score 0: < 1%, Score 1: ≥ 1-20%, Score 2: > 20-50%, Score 3: > 50-100% positive Zellen) und der Anteil der Gewebeproben mit dem jeweiligen Score in absoluten Zahlen sowie in Prozenten angegeben (in Klammern).

CD326-Expression	Karzinomgewebe	Normalgewebe	P-Wert	Spearman-Korrelation P-Wert
negative (Score 0)	3 (8,3%)	4 (11,4%)	> 0,05	n.s.
schwach (Score 1)	10 (27,8%)	11 (31,4%)		
moderat (Score 2)	8 ( 22,2%)	12 (34,3%)		
stark (Score 3)	15 (41,7%)	8 (22,9%)		

## 4. Ergebnisse

### 4.1.1.5 Korrelationen zwischen den Markern

CD133 war im Tumorgewebe deutlich geringer exprimiert als CD44, CD166 und CD326 (Tab. 6-9). Während mehr als 80% der Tumorgewebe CD133 nicht oder nur schwach exprimierten (Score 0 und 1), wurden CD44, CD166 und C326 nur in 17 (50,0%), 11 (50,0%) bzw. 13 (36,1%) der Tumorgewebe nicht oder nur schwach exprimiert. Allerdings ergab sich für CD133 nur mit CD326, nicht aber mit CD44 und CD166, eine schwache signifikante negative Korrelation ( $p = -0,263$ ,  $P = 0,032$ ). Diese war ausgeprägter und statistisch höher signifikant, wenn für CD326 die Scores 0 und 1 sowie 2 und 3 jeweils zusammengefasst wurden ( $p = -0,306$ ,  $P = 0,012$ ).

### 4.1.2 Korrelationen zwischen Tumorstammzellmarker-Expression und klinischen Parametern

Die Tumorstammzellmarker-Expression in Tumorgeweben wurde nachfolgend mit klinischen Parametern wie Tumorstadium, Lymphknotenbefall, distante Metastasierung, UICC-Stadium und Überlebenszeit sowie Patientenalter und Geschlecht korreliert.

#### 4.1.2.1 Tumorstammzellmarker und distante Metastasierung

Der Marker CD44 ist in Tumorgewebe von Patienten, die distante Metastasen aufweisen ( $n=7$ ), stärker exprimiert als in Tumorgeweben ohne Metastasenbildung ( $n = 4$ ; Tab. 10). In metastasierten Tumorgeweben zeigten drei (75%) eine moderate (Score 2) und einer (25%) eine starke CD44-Expression (Score 3), während die nicht-metastasierten Tumorgewebe in einem Fall (14,3%) CD44 nicht (Score 0) und in drei Fällen (42,9%) schwach exprimierten (Score 1). Im  $\chi^2$ -Test erwies sich die Korrelation zwischen CD44-Expression und distanter Metastasierung allerdings nur als Trend ( $P = 0,051$ ).

**Tab. 10. Korrelation zwischen CD44-Expression und distanter Metastasierung**

*M0: Tumoren ohne Metastasenbildung; M1: Tumoren mit Bildung von Fernmetastasen. Die Anzahl ist in absoluten Werten und in Prozenten (in Klammern) angegeben.*

<b>CD44-Expression</b>	<b>M0</b>	<b>M1</b>	<b>P-Wert</b>
<i>keine (Score 0)</i>	1 (14,3%)	0 (0,0%)	0,051
<i>schwach (Score 1)</i>	3 (42,9%)	0 (0,0%)	
<i>moderat (Score 2)</i>	0 (0,0%)	3 (75,0%)	
<i>stark (Score 3)</i>	3 (42,9%)	1 (25,0%)	

#### 4.1.2.2 Tumorstammzellmarker und UICC-Stadium

Ein signifikanter Zusammenhang bestand weiterhin zwischen der Expression von CD44 und dem UICC-Stadium der 34 untersuchten Tumoren ( $P = 0,039$ ; Tab. 11, Abb. 16). Alle fünf Tumorgewebe im UICC-Stadium 4 und fast alle im Stadium 2a (9 von 10) konnten hinsichtlich der CD44-Expression beurteilt werden, aber nur 18 von 26 im Stadium 2b und 2 von 5 im Stadium 3 (Tab. 11). Dabei wiesen 77,8% der Tumorgewebe ( $n=7$ ) im Stadium 2a eine schwache Expression auf (Score 1) und nur 22,2% ( $n=2$ ) eine starke Expression (Score 3). In den Tumorgeweben des Stadiums 2b exprimierten 6 (33,3%) CD44 schwach (Score 1) und sieben (38,9%) stark (Score 3). Die Tumorgewebe des Stadiums 3 wiesen eine moderate bis starke Expression (Score 2 und 3) auf, während von den Geweben im Stadium 4 drei (60%) eine moderate Expression (Score 2) und eines (20%) eine starke Expression (Score 3) zeigten. Insgesamt war also mit zunehmendem UICC-Stadium eine höhere CD44-Expression assoziiert.

CD133 war in allen UICC-Stadien überwiegend gering exprimiert (Tab. 11). Jeweils mindestens zwei Drittel aller Tumorgewebe waren CD133-negativ oder exprimierten CD133 nur schwach (Scores 0 und 1), in den UICC-Stadien 2a und 3 waren es je 66,6%, in den Stadien 2b und 4 sogar 90,5% bzw. 80% der Tumorgewebe. In den Stadien 2a, 2b und 3 war die Expression in den übrigen Tumorgeweben stark (Score 3), und zwar in 33,3 % ( $n=3$ ), 9,5% ( $n=2$ ) bzw. 33,3% ( $n=1$ ) der Fälle. Umgekehrt wies kein Tumorgewebe im UICC-Stadium 4 eine starke Expression auf (Score 3) und nur ein Tumor eine schwache Expression (Score 2). Trotz dieser Unterschiede offenbarte der  $\chi^2$ -Test einen signifikanten

#### 4. Ergebnisse

Zusammenhang zwischen CD133-Expression und UICC-Stadium erst, wenn eine CD133-Expression (Scores 1-3) einer fehlenden Expression (Score 0) gegenübergestellt wurde (P = 0,034; Tab. 11). Hier ergab sich bei den 38 beurteilbaren Tumoren eine Tendenz, die umgekehrt zu der des Markers CD44 war (Abb. 16).

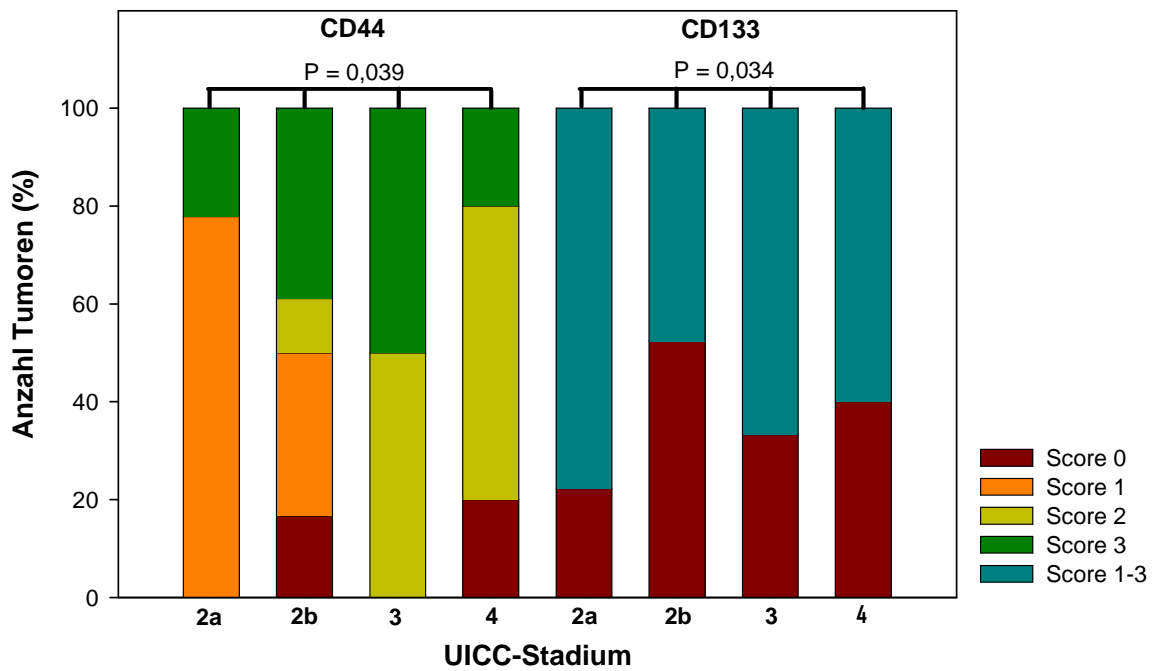
Zwischen der Expression der Marker CD166 und CD326 und dem Tumorstadium war keinerlei Zusammenhang erkennbar (Tab. 11).

**Tab. 11. Korrelationen zwischen Tumorstammzellmarker-Expression und Tumorstadium nach UICC**

Das UICC-Stadium 1 war nicht vertreten. Nur hinsichtlich der Marker CD44 und CD133 zeigte sich eine statistisch signifikante Relation zwischen Expression und Tumorstadium, bei CD133 jedoch erst, wenn die Marker-Expression in die Kategorien Score 0 und Score 1-3 gruppiert wurde. Die Anzahl ist in absoluten Werten und in Prozenten (in Klammern) angegeben.

Marker	Score	UICC 2a	UICC 2b	UICC 3	UICC 4	P-Wert
<b>CD44</b> (n = 34)	0	0 (0,0%)	3 (16,7%)	0 (0,0%)	1 (20,0%)	0,039
	1	7 (77,8%)	6 (33,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
	2	0 (0,0%)	2 (11,1%)	1 (50,0%)	3 (60,0%)	
	3	2 (22,2%)	7 (38,9%)	1 (50,0%)	1 (20,0%)	
<b>CD133</b> (n = 38)	0	2 (22,2%)	11 (52,4%)	1 (33,3%)	2 (40,0%)	n.s.
	1	4 (44,4%)	8 (38,1%)	1 (33,3%)	2 (40,0%)	
	2	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (20,0%)	
	3	3 (33,3%)	2 (9,5%)	1 (33,3%)	0 (0,0%)	
<b>CD133</b> (n = 38)	0	2 (22,2%)	11 (52,4%)	1 (33,3%)	2 (40,0%)	0,034
	1-3	7 (77,8%)	10 (47,6%)	2 (66,7%)	3 (60,0%)	
<b>CD166</b> (n = 22)	0	1 (33,3%)	1 (7,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	n.s.
	1	1 (33,3%)	6 (46,1%)	0 (0,0%)	2 (50,0%)	
	2	1 (33,3%)	3 (23,1%)	1 (50,0%)	0 (0,0%)	
	3	0 (0,0%)	3 (23,1%)	1 (50,0%)	2 (50,0%)	
<b>CD326</b> (n = 35)	0	1 (11,1%)	1 (5,0%)	1 (50,0%)	0 (0,0%)	n.s.
	1	2 (22,2%)	7 (35,0%)	0 (0,0%)	1 (20,0%)	
	2	3 (33,3%)	3 (15,0%)	0 (0,0%)	2 (40,0%)	
	3	3 (33,3%)	9 (45,0%)	1 (50,0%)	2 (40,0%)	

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 16.** Korrelation zwischen Marker-Expression und Tumorstadium nach UICC. Das UICC-Stadium 1 war nicht vertreten. Die CD44-Expression korrelierte statistisch signifikant mit dem Tumorstadium, ebenso die CD133-Expression, wenn die Tumorgewebe in eine CD133-positive (Score 1-3) und eine CD133-negative (Score 0) Gruppe eingeteilt wurden.

## **4.2 Ergebnisse der Feulgen-Färbung**

### **4.2.1 Ploidiestatus-Einteilung nach Auer**

Von allen 46 Tumorgeweben wurde nach Feulgen-Färbung je eines Paraffinschnittes der DNA-Gehalt von ca. 150-300 Zellkernen pro Gewebeprobe densitometrisch gemessen. Einige Tumorgewebe wiesen dabei Regionen mit deutlich unterschiedlichen DNA-Gehalten der Zellkerne auf. Bei der Messung wurde versucht, diese Regionen unter Bevorzugung auffälliger und mutmaßlich aneuploider Zellkerne repräsentativ zu berücksichtigen. Der Ploidiestatus jedes Tumors wurde einem der vier Histogrammtypen nach Auer (1980) zugeordnet (siehe Abschnitt 3.2.2.5). Dem Histogrammtyp I gehörten nur sechs (13,3%) Tumorgewebe an, dem Histogrammtyp III zwölf (26,7%) Tumorgewebe und mit 27 Tumorgeweben (60%) die Mehrzahl dem Histogrammtyp IV. Der Histogrammtyp II war nicht vertreten.

Zu Zusammenhängen zwischen dem Ploidiestatus und der Überlebenszeit der Patienten, dem UICC-Status sowie der Tumorstammzellmarker-Expression der Tumorgewebe wurden Korrelationsanalysen durchgeführt.

### **4.2.2 Korrelation zwischen Ploidie und Überleben**

Die mittlere Überlebenszeit der Patienten nach Diagnosestellung betrug 21,3 Monate (Spanne: 0,5 - 139,9 Monate). Im Mittel erreichten Patienten mit euploiden Tumoren des Histogrammtyps III mit 25,3 Monaten die längste und Patienten mit aneuploiden Tumoren des Histogrammtyps IV mit 19,3 Monaten die kürzeste Überlebenszeit nach Diagnosestellung (Tab. 12). Beim Histogrammtyp I betrug sie 22,8 Monate. Die minimale Überlebenszeit war bei Histogrammtyp I mit 7,7 Monaten deutlich länger als bei Histogrammtyp III (0,5 Monate) und Histogrammtyp IV (1,5 Monate). Die maximale Überlebenszeit war bei Histogrammtyp I und III mit 52,3 und 54,3 Monaten nahezu gleich, während sie bei Histogrammtyp IV mit 139,9 Monaten mehr als 2,5 mal so lang war.

#### 4. Ergebnisse

**Tab. 12. Beziehung zwischen der Ploidie der Tumoren und der Überlebenszeit der Patienten**

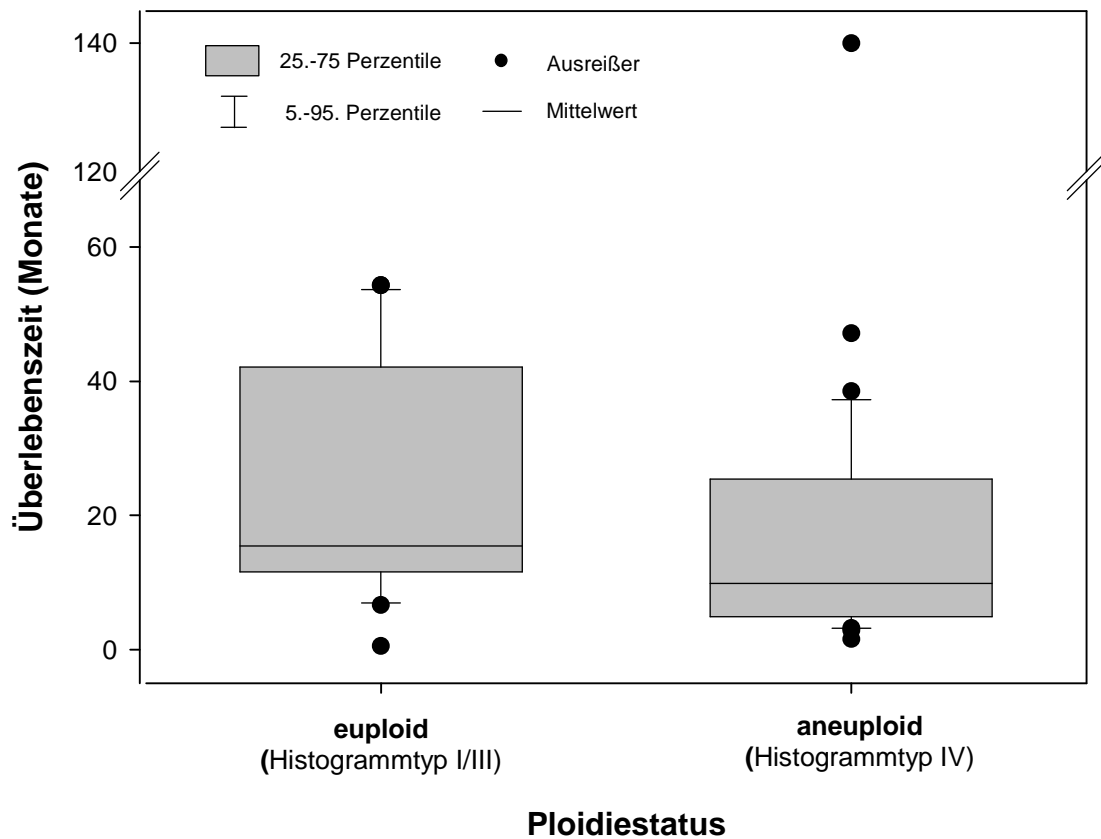
Der Ploidiestatus wurde entsprechend den Histogrammtypen nach Auer (1980) eingeteilt (siehe Abschnitt 3.2.2.5) Typ I: ein Peak im Bereich diploider Kerne; Typ III: di- und tetraploide und zwischen diesen Bereichen liegende Kerne; Typ IV: ausgeprägte Aneuploidie. Der Histogrammtyp II lag nicht vor. Auch wenn die Histogrammtypen I und III als euploide Gruppe den aneuploiden Tumoren (Histogrammtyp IV) gegenübergestellt wurden, ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation.

<i>Ploidiestatus</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Überlebenszeit (Monate)</i>			<i>P-Wert</i>
		<i>Mittelwert ± Std.</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	
<b>Histogrammtyp I</b>	6	22,8 ± 17,7	7,7	52,3	
<b>Histogrammtyp III</b>	12	25,3 ± 19,1	0,5	54,3	> 0,05
<b>Histogrammtyp IV</b>	27*	19,3 ± 27,0	1,5	139,9	
<b>Histogrammtyp I/III</b>	18	24,4 ± 18,1	0,5	54,3	0,085
<b>Histogrammtyp IV</b>	27*	19,3 ± 27,0	1,5	139,9	

\*Eine Patientin mit einem Tumor des Histogrammtyps IV lebte zur Zeit der Datenauswertung.

Der  $\chi^2$ -Test ergab bezüglich der Überlebenszeit keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Histogrammtypen. Auch wenn der Ploidiestatus als euploid (Histogrammtypen I und III) und aneuploid (Histogrammtyp IV) verglichen wurde, war der Unterschied statistisch nicht signifikant ( $P = 0,085$ ). Ein Trend zur Korrelation von Überlebenszeit und Ploidiestatus bzw. Histogrammtyp konnte so zwar beobachtet werden, erreichte aber nicht die Signifikanzgrenze (Tab. 12, Abb. 17).

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 17. Beziehung zwischen der Ploidie der Tumoren und der Überlebenszeit der Patienten**

Der Ploidiestatus ist anhand der Histogrammtypen nach Auer (1980) in die Typen I-IV eingeteilt (siehe Abschnitt 3.2.2.5). Der Histogrammtyp II lag nicht vor. Auch wenn euploide (Histogrammtypen I und III) den aneuploiden Tumoren (Histogrammtyp IV) gegenübergestellt wurden, ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation.

#### 4.2.3 Korrelation zwischen Ploidie und Grading

Von den 46 Tumoren waren zwei (4,3%) gut differenziert (Stadium G1), während je 19 (41,3%) mäßig (G2) bzw. schlecht (G3) differenziert waren (Tab. 13, Abb. 18). Für sechs Tumoren lag keine Bestimmung des Differenzierungsgrades vor. Die beiden gut differenzierten Tumoren waren euploid (Tab. 13). Von den G2-Tumoren waren vier (21%) diploid (Histogrammtyp I), sieben (36,8%) diploid-proliferativ (Histogrammtyp III) und acht

#### 4. Ergebnisse

(42,1%) aneuploid (Histogrammtyp IV). Damit waren fast 60% der G2-Tumoren euploid. Im Gegensatz dazu waren 16 (84,2%) der G3-Tumoren aneuploid (Histogrammtyp IV), während lediglich zwei (10,5%) diploid-proliferativ (Histogrammtyp III) und sogar nur einer (5,3%) diploid (Histogrammtyp I) waren.

**Tab. 13. Beziehung zwischen Ploidie und Differenzierungsgrad der Tumoren**

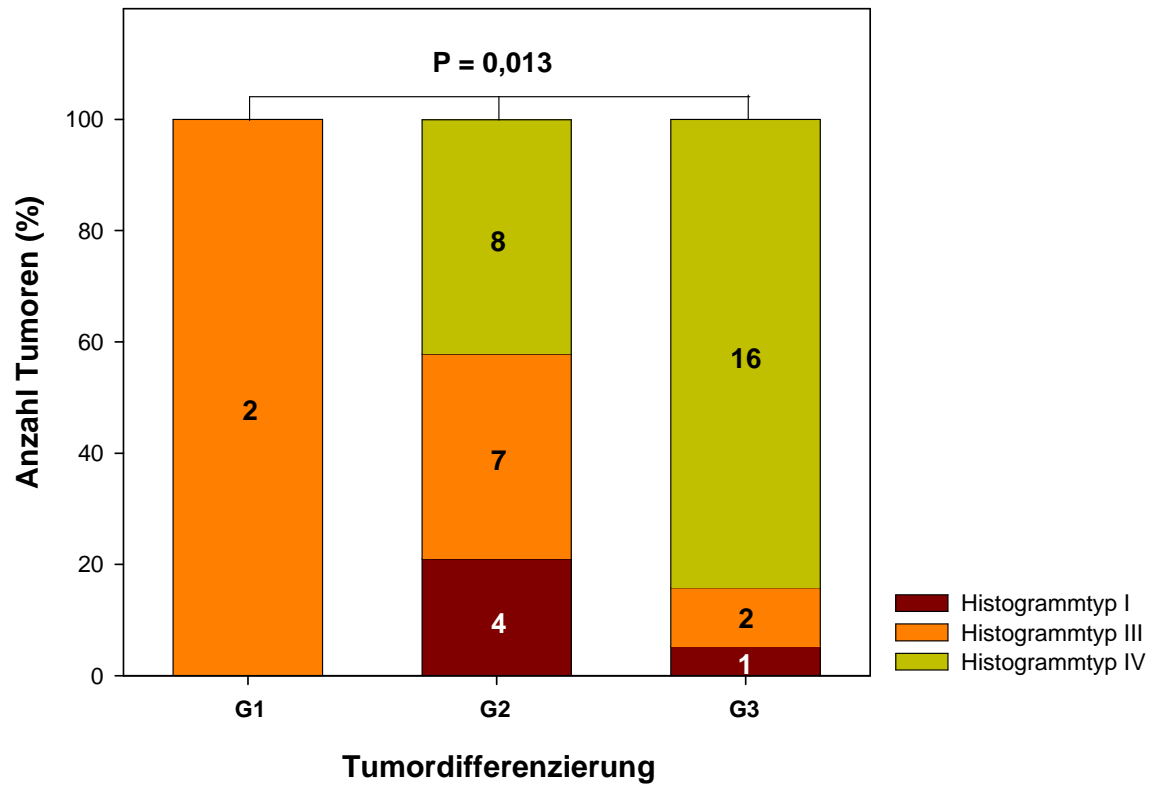
*G1, G2 und G3 geben den Differenzierungsgrad der Tumoren wieder (gut, mäßig bzw. schlecht differenziert). Der Ploidiestatus ist als Histogrammtyp nach Auer wiedergegeben (siehe Abschnitt 3.2.2.5). Eine Zusammenfassung der Histogrammtypen I und III als euploide Gruppe gegenüber den aneuploiden Tumoren (Histogrammtyp IV) ergab eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Ploidie und Differenzierungsgrad der Tumoren. Die Anzahl ist in absoluten Werten und in Prozenten (in Klammern) angegeben.*

<b>Ploidiestatus</b>	<b>Differenzierungsgrad</b>			<b>P-Wert</b>
	<b>G1</b> <i>n = 2</i>	<b>G2</b> <i>n = 19</i>	<b>G3</b> <i>n = 19</i>	
<b>Histogrammtyp I</b> <i>(n = 5)</i>	0 (0,0%)	4 (21,0%)	1 (5,3%)	0,013
<b>Histogrammtyp II</b> <i>(n = 0)</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Histogrammtyp III</b> <i>(n = 11)</i>	2 (100,0%)	7 (36,8%)	2 (10,5%)	
<b>Histogrammtyp IV</b> <i>(n = 24)</i>	0 (0,0%)	8 (42,1%)	16 (84,2%)	
<b>Histogrammtypen I-III</b> <i>(n = 16)</i>	2 (100,0%)	11 (57,9%)	3 (15,8%)	0,006
<b>Histogrammtyp IV</b> <i>(n = 24)</i>	0 (0,0%)	8 (42,1%)	16 (84,2%)	

Je geringer also die Tumoren differenziert waren, desto seltener waren sie rein diploid (Histogrammtyp I) oder euploid (Histogrammtypen I und III). Der  $\chi^2$ -Test ergab eine statistisch signifikante Beziehung zwischen dem Differenzierungsgrad der Tumoren und der Ploidie ausgedrückt als Histogrammtyp nach Auer (P = 0,013). Die Beziehung wurde

#### 4. Ergebnisse

hochsignifikant, wenn Tumoren der Histogrammtypen I und III als euploide Gruppe zusammengefasst und Tumoren des Histogrammtyps IV als aneuploide Gruppe beibehalten wurden ( $P = 0,006$ ; Tab. 13).



*Abb. 18. Beziehung zwischen Ploidie und Differenzierungsgrad der Tumoren. G1, G2, G3: Differenzierungsgrad der Tumoren (gut, mäßig bzw. schlecht differenziert). Die Ploidie ist als Histogrammtyp nach Auer wiedergegeben (siehe Abschnitt 3.2.2.5). Die Zahlen in den Blöcken zeigen die jeweilige absolute Anzahl von Tumoren an. Es ergab sich eine statistisch signifikante Relation zwischen Ploidie und Differenzierungsgrad.*

#### **4.2.4 Korrelation zwischen Ploidie und Tumorstammzellmarker-Expression der Tumoren**

Die Tumorstammzellmarker CD44, CD166 und CD326, nicht aber CD133, wurden in Zellpopulationen mit Aneuploidie und Proliferation häufiger stark exprimiert (Tab. 14). In den beiden diploiden Tumoren (Histogrammtyp I) waren CD44, CD133 und CD166 schwach (Score 1) und CD326 gar nicht exprimiert (Score 0). Demgegenüber wurden CD44, CD166 und CD326 in aneuploiden Tumoren des Histogrammtyps IV in 60% (CD44, CD166) bzw. 70% (CD326) der Tumorgewebe moderat bis stark exprimiert (Scores 2 und 3). Euploide, proliferative Tumoren des Histogrammtyps III nahmen eine mittlere Stellung ein. Für CD133 ergab sich ein leicht gegenläufiges Bild, indem die Expression in Tumoren des Histogrammtyps IV schwächer war als in Tumoren des Histogrammtyps III. Die einzige im  $\chi^2$ -Test signifikante Korrelation zwischen Tumorstammzellmarker-Expression und Histogrammtypen ergab sich für CD44 ( $P = 0,03$ ), wenn die Tumoren mit den Histogrammtypen I und III als euploide Gruppe mit den aneuploiden Tumoren des Histogrammtyps IV verglichen wurden (Tab. 14, Abb. 19). In der euploiden Gruppe wiesen einer (9,1%) der Tumoren keine (Score 0), sieben (63,6%) eine schwache (Score 1) und nur drei (27,3%) eine moderate (Score 2) CD44-Expression auf, wohingegen in der aneuploiden Gruppe eine starke Expression (Score 3) überwog (47,8% der Tumoren) und nur in je 13,0% keine bzw. eine moderate (Scores 0 und 2) und in 26,1% eine schwache Expression vorlag.

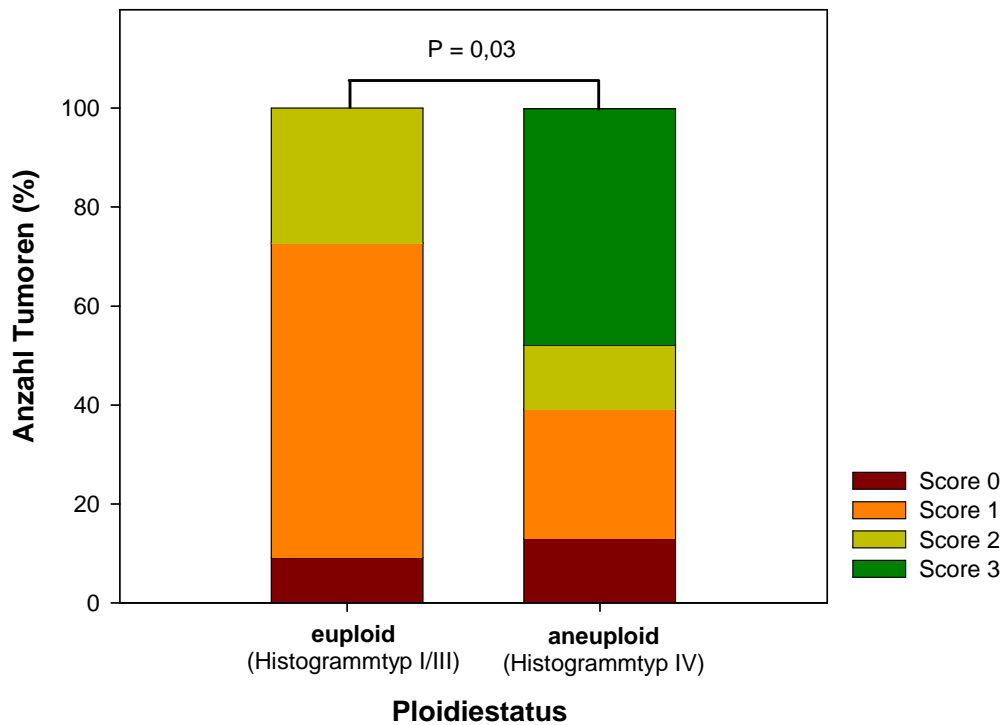
#### 4. Ergebnisse

**Tab. 14. Beziehung zwischen Ploidie und Marker-Expression der Tumoren**

Die Expression der Marker ist in vier Scores 0-3 eingeteilt, die Ploidie in die Histogrammtypen I, III und IV. Der Histogrammtyp II war nicht vertreten. Erst bei Zusammenfassung der Histogrammtypen I und III als euploide Gruppe gegenüber den aneuploiden Tumoren mit Histogrammtyp IV zeigte sich eine statistisch signifikante Relation zwischen Ploidie und CD44-Expression. Die Anzahl der Tumoren ist in absoluten Werten und in Prozenten (in Klammern) angegeben.

<b>Marker</b>	<b>Score</b>	<b>Euploid (Histogrammtypen I/III)</b>	<b>Aneuploid (Histogrammtyp IV)</b>	<b>P-Wert</b>
<b>CD44</b> (n = 34)	0	1 (9,1%)	3 (13,0%)	0,03
	1	7 (63,6%)	6 (26,1%)	
	2	3 (27,3%)	3 (13,0%)	
	3	0 (0,0%)	11 (47,8%)	
<b>CD133</b> (n = 37)	0	4 (33,3%)	10 (40,0%)	n.s.
	1	5 (41,7%)	11 (44,0%)	
	2	0 (0,0%)	1 (4,0%)	
	3	3 (25,0%)	3 (12,0%)	
<b>CD166</b> (n = 23)	0	0 (0,0%)	2 (15,4%)	n.s.
	1	7 (70,0%)	3 (23,1%)	
	2	1 (10,0%)	4 (30,8%)	
	3	2 (20,0%)	4 (30,8%)	
<b>CD326</b> (n = 36)	0	3 (23,1%)	2 (8,7%)	n.s.
	1	4 (30,8%)	5 (21,7%)	
	2	2 (15,4%)	6 (26,1%)	
	3	4 (30,8%)	10 (43,5%)	

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 19. Beziehung zwischen Ploidie und CD44-Expression der Tumoren.** Die Expression der Marker ist in vier Scores 0-3 eingeteilt, der Ploidiestatus in die Histogrammtypen I, III und IV. Der Histogrammtyp II war nicht vertreten. Bei Zusammenfassung der Histogrammtypen I und III als euploide Gruppe gegenüber den aneuploiden Tumoren (Histogrammtyp IV) zeigte sich eine statistisch signifikante Relation zwischen Ploidie und CD44-Expression..

## 5. Diskussion

### 5.1 Tumorstammzellmarker-Expression

#### 5.1.1 Expression von CD44

In dieser Arbeit wurde ein Antikörper gegen die Basisform des CD44-Proteins (CD44s) verwendet. Dieser bindet auch an die verschiedenen CD44-Isoformen, die zusätzlich zum CD44s-Molekül variable Anteile besitzen. Die Ergebnisse zeigten, dass Zellen duktaler Strukturen sowohl in Normal- als auch in Karzinomgewebe basolateral CD44 exprimierten. Im Normalgewebe nahm die Intensität der CD44-Expression dabei von kleinen zu größeren Gängen hin ab. In Karzinomen waren 30 der 34 Gewebe CD44-positiv (88,2%), jedoch dabei sehr heterogen immunopositiv.

Immervoll et al. (2011) fanden im Normalgewebe eine ähnliche Verteilung mit besonders häufiger, teilweise auch zytoplasmatischer Markierung zentroazinärer Zellen. In entzündlichem oder atrophischem Pankreas zeigte sich die Expression dabei besonders intensiv. In Karzinomgewebe wiesen Immervoll et al. (2011) in 34 von 51 Tumoren (66,7%) eine CD44 Expression nach. Die Expression war ebenfalls sehr inhomogen, teilweise geclustert und selten auch apikal. In einigen Tumoren waren v.a. Stromazellen positiv. In der Studie von Hong et al. (2009) wurde für 30 von 56 Pankreaskarzinomen (53,6%) eine CD44-Expression gezeigt. Auch hier waren die Antikörper an die Zellmembran gebunden. Maeda et al. (2009) untersuchten 80 Tumoren, von denen 34 (42,5%) mit basolateraler Färbung ebenfalls positiv waren. In den Studien von Castella et al. (1996) und Gotoda et al. (1998) zeigten alle Normalgewebe eine CD44-Expression. Dabei waren bei Gotoda et al. (1998) auch alle Pankreaskarzinome, bei Castella et al. (1996) hingegen nur 70% CD44-positiv. Die Expression lag jeweils an der Membran vor.

Damit wurde in allen immunhistochemischen Untersuchungen eine sehr ähnliche Expression in Normalgeweben und Tumorzellen gefunden, auch hinsichtlich des vornehmlichen Vorliegens in der Zellmembran. Hinsichtlich des Anteils positiver Zellen besteht jedoch mit 43 bis 100% eine sehr breite Spannweite, obwohl in allen zitierten Studien Antikörper

## 5. Diskussion

gegen CD44s und nicht gegen eine der Isoformen verwendet wurden, bei Immervoll et al. (2011) und Maeda et al. (2009) sogar der gleiche Klon wie in dieser Arbeit.

Dieser Unterschied scheint auf einen starken Einfluss der Methode hinzuweisen. Zusätzlich gibt es Faktoren, die die Expression bzw. Detektion von CD44 durch Antikörper im Pankreaskarzinom beeinflussen könnten. In Zelllinien des Prostata-Karzinoms zum Beispiel, für das eine negative Korrelation zwischen CD44 Expression und Gleason-Score sowie Metastasierung besteht, wurde CD44 bei Hypermethylierung des Promotors nicht exprimiert. Zudem wurde gezeigt, dass CD44 in Prostata-Normalgewebe seltener als in Primärtumoren und in diesen wiederum seltener als in Metastasen exprimiert wird (Lou et al. 1999). Weiterhin unterliegt CD44 umfangreichen posttranslationalen Modifikationen in Form von Glykosylierungen und Bindungen von Glukosaminoglykanen, durch die die Masse des CD44s-Protein zwischen 37 und 95 Kilodalton variieren kann (Naor et al. 2002, Marhaba und Zöller 2004). Diese könnte die Erkennung des Epitops durch den Antikörper beeinflussen. Möglicherweise variieren posttranslationale Modifikationen in Abhängigkeit vom Tumortyp oder Differenzierungsgrad eines Pankreaskarzinoms. Allerdings wäre zu erwarten, dass bei ausreichend großem Stichprobenumfang in den einzelnen Studien die Unterschiede in den Ergebnissen vernachlässigbar werden, solange kein wesentlicher Unterschied in der Methode besteht.

### **5.1.1.1 Prognostische Bedeutung der CD44-Expression**

In dieser Arbeit wiesen Tumoren höherer UICC-Stadien eine statistisch signifikant stärkere CD44-Expression auf. Hinsichtlich einzelner klinikopathologischer Parameter zeigte sich nur mit der Bildung von Fernmetastasen eine nahezu signifikante Korrelation, indem alle metastasierten Tumoren eine moderate bis starke CD44-Expression aufwiesen, während dies nur auf 42,3% der Tumoren ohne Metastasen zutraf.

In der Studie von Hong et al. (2009) zeigte sich eine stärkere CD44-Expression in geringer differenzierten Tumoren ( $P < 0,001$ ) und bei geringeren Überlebenszeiten ( $P < 0,05$ ). Immervoll et al. (2011) fanden lediglich eine stärkere Lymphknoteninfiltration bei stärkerer Markerexpression ( $P = 0,036$ ). Maeda et al. (2009) konnten keine statistisch signifikante

## 5. Diskussion

Beziehung zwischen Markerexpression und Überlebenszeit feststellen. Zusammenhänge mit anderen klinischen Parametern wurden nicht analysiert.

In verschiedenen Tumor-Entitäten wurde den unterschiedlichen CD44-Isoformen eine unterschiedliche Bedeutung zugeschrieben. Je nach Tumorart kann die Herauf- oder Herunterregulierung einer bestimmten Isoform der Tumorprogression oder -metastasierung förderlich oder hinderlich sein (Naor et al. 2008, Rall et al. 1995). Das in dieser Arbeit und von Immervoll et al. (2011) beschriebene Ergebnis deutet auf einen Zusammenhang zwischen CD44 und Tumor-Metastasierung im Pankreaskarzinom hin. Für den Prozess der Metastasierung ist es notwendig, dass Zellen den Verband verlassen, die Basalmembran durchwandern, in Blut- oder Lymphgefäße einwandern und in diesen an das Endothel anhaften, um sie wieder verlassen zu können (Wong et al. 2012). Das CD44-Protein geht Bindungen mit der Extrazellulärmatrix ein, wobei Hyaluronsäure, die einen wesentlichen Bestandteil der Extrazellulärmatrix darstellt, als Hauptbindungspartner fungiert. CD44v unterhält dabei eine durch unterschiedliche Glykosylierungen variable aber insgesamt schwächere Bindung als CD44s. Weiterhin wird durch CD44 die Extrazellulärmatrix verändert, indem z.B. der CD44-Hyaluronsäure-Komplex internalisiert und abgebaut wird oder CD44 Hyaluronsäure-abbauende Metalloproteinasen bindet (Sneath et al. 1998). Aufgrund dieser Funktionen des Proteins ist bei variabler Expression eine Rolle von CD44 bei der Metastasierung vorstellbar.

Rall et al. (1995) fanden in gesundem Pankreas, primärem Pankreaskarzinom und Metastasen jeweils mehrere CD44-Isoformen. Von diesen war CD44v6 nur in 33% der Normalgewebe, 40% der Primärtumoren, aber sogar 67% der Metastasen exprimiert. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant. Die Expression von CD44v6 im Pankreas wurde von Castella et al. (1996) und Gotoda et al. (1998) immunhistochemisch näher untersucht. In beiden Studien wurde CD44v6 nicht im Normalgewebe, aber in je ca. 50% der Tumoren gefunden. In keiner der beiden Studien fand sich ein Zusammenhang zwischen CD44v6-Expression und T-, N- oder M-Status oder Differenzierungsgrad. In der Studie von Gotoda et al. (1998) korrelierte sie allerdings mit der Überlebenszeit. Diese Autoren bezogen auch die Isoform CD44v2 in die Studie ein, die ebenfalls nicht in Normalgewebe aber in 38% der Karzinome exprimiert wurde und hier statistisch signifikant mit der Gefäßinvasion durch Tumorzellen und der Überlebenszeit korrelierte. Alle

## 5. Diskussion

CD44v2-positiven Proben waren auch CD44v6-positiv, aber nicht umgekehrt. Die verschiedenen CD44-Isoformen werden also in Normal- und Tumorgewebe des Pankreas und auch zwischen verschiedenen Tumoren unterschiedlich exprimiert, liegen in verschiedenem Ausmaß nebeneinander vor und unterscheiden sich in ihren Eigenschaften. Daher könnte anhand von Antikörpern, die gegen verschiedene Isoformen gerichtete sind, möglicherweise eine genauere Aussage zur Bedeutung von CD44 im Pankreaskarzinom getroffen werden.

### 5.1.2 Expression von CD133

In dieser Arbeit ließ sich CD133 in Zellen des normalen Pankreas-Gangepithels nachweisen. Dabei wurde die Expression von kleinen zu größeren Gängen hin schwächer. In Pankreaskarzinomen war CD133 in gangartigen Strukturen ebenfalls apikal exprimiert, aber nicht so durchgehend wie im Normalgewebe. Die Mehrzahl der Tumoren (82%) zeigte eine schwache Expression mit höchstens 20% positiver Zellen. In anderen Studien finden sich hierzu sehr widersprüchliche Angaben (Tab. 16). In guter Übereinstimmung mit den hier beschriebenen Daten fanden Immervoll et al. (2008) CD133 im Gangepithel des nicht-neoplastischen Pankreas mit abnehmender Intensität bei zunehmender Ganggröße, aber auch in Azini, die ein Lumen aufwiesen. Zudem befand sich das Protein im Zytoplasma einzelner Gang- und Azinuszellen des zentroazinären Bereichs. Ähnlich wiesen Lardon et al. (2008) und Welsch et al. (2009) CD133 apikal in allen gesunden Gangepithelien des Pankreas nach. Im Gegensatz dazu fanden Hermann et al. (2007) CD133 sehr selten und nur im Zytoplasma gesunder Pankreas-Gangepithelzellen, während in der Studie von Maeda et al. (2008) alle Zellen negativ waren.

Hinsichtlich des Nachweises von CD133 im Gewebe von Pankreastumoren besteht eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Immervoll et al. (2008), die das Protein wie in dieser Arbeit v.a. in Membranen fanden, und drei anderen Untersuchungen, in denen es ausschließlich intrazellulär nachgewiesen wurde. Immervoll et al. (2008) fanden in 80% der 51 untersuchten Pankreaskarzinome das Protein in der Apikalmembran gangähnlicher Gewebe. Auch in papillären Tumoren, invasiven Zellgruppen in Gefäßen und Lymphknotenmetastasen fand sich das Protein an der Zelloberfläche. In weniger als 1% der Zellen

## 5. Diskussion

der 10 daraufhin untersuchten Tumorgewebe wurde eine zytoplasmatische Expression festgestellt. Diese konnte sich entweder wie im Normalgewebe in vereinzelt Zellen gangähnlicher Strukturen finden oder in Zellkonglomeraten in soliden Anteilen des Tumors. Welsch et al. (2009) hingegen konnten im Tumorgewebe in Zellmembranen keine CD133-Expression nachweisen, fanden aber ebenfalls das Protein äußerst selten im Zytoplasma der Tumorzellen. Auch Hermann (2009) gelang in Gewebeschnitten ausschließlich der zytoplasmatische Nachweis in sehr wenigen Zellen in neun von elf untersuchten Pankreaskarzinomen. In fünf Karzinom-Zellsuspensionen fand er durchflusszytometrisch durchschnittlich ca. 1,8% CD133<sup>+</sup>-Zellen mit einem Maximum von ca. 3,2%. Maeda et al. (2008) hingegen wiesen CD133 deutlich häufiger ebenfalls vor allem im Zytoplasma von 60% der 80 untersuchten Karzinome nach, wobei in ca. einem Drittel der Tumoren weniger als 5% der Zellen positiv waren, in ca. 15% 5-10% der Zellen und in weniger als 5% der Tumoren 11-15% der Zellen.

Sowohl für normales Gangepithel des Pankreas als auch das Pankreaskarzinom finden sich also sehr unterschiedliche immunhistochemische Ergebnisse hinsichtlich des CD133-Proteins. Als Ursache dafür ist v.a. die Verwendung unterschiedlicher Anti-CD133-Antikörper vorstellbar, die an verschiedene Epitope von CD133 binden.

Das Membranprotein CD133 weist fünf Transmembrandomänen mit zwei großen extrazellulären und zwei kleinen intrazellulären Loops auf. Erstere besitzen je 4 mutmaßliche Glykosylierungsstellen. Der N-Terminus liegt extrazellulär (Miraglia et al. 1997). Durch alternatives Splicing gibt es mindestens sieben Isoformen des menschlichen CD133, die gewebe- und entwicklungspezifisch auftreten (Grosse-Gehling et al. 2013, Kemper et al. 2010). Das Protein ist an Cholesterol der Plasmamembran gebunden und in Mikrodomänen der Mikrovilli epithelialer Zellen und Membranvorsprüngen nicht-epithelialer Zellen lokalisiert (Fargeas et al. 2011, Weigmann et al. 1997). Es befindet sich in direkter Nachbarschaft von Gangliosiden, an die es teilweise v.a. mit membrannahen Anteilen bindet (Fargeas et al. 2011). Seine genaue Funktion ist nicht bekannt, jedoch scheint es bei der Formation der Mikrodomänen und damit der Membranfunktion eine wichtige Rolle zu spielen (Fargeas et al. 2011, Jaszai et al. 2007).

Drei für Pankreasgewebe gebräuchliche monoklonale CD133-Antikörper sind die Klone AC133 (Anti-CD133/1), AC141 und 293C3 (beide Anti-CD133/2), die Glykosylierungs-

5. Diskussion

stellen der extrazellulären Domäne erkennen (Tab. 15). Das Epitop AC133 befindet sich N-terminal, 293C3 und AC141 liegen einander überlappend auf dem zweiten extrazellulären Loop. Ein weiterer Klon, K-18, erkennt ein C-terminales Epitop (Grosse-Gehling 2013, Kemper et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde der Klon C24B9 eingesetzt, der wie die Klone 293C3 und AC141 ein Epitop auf dem zweiten extrazellulären Loop erkennt, das allerdings im Gegensatz zu diesen keine Glykosylierungsstelle aufweist (Hermansen et al. 2011).

**Tab. 15. Klone von CD133-Antikörpern, die in verschiedenen Studien (siehe Tab. 16) bisher an Pankreasgewebe getestet wurden**

<i>Antikörper-Klon</i>	<i>Lokalisation des Epitops im CD133-Protein</i>	<i>Epitop mit Glykosylierungsstelle?</i>
<i>AC133</i>	<i>N-terminal</i>	<i>nein</i>
<i>AC141</i>	<i>zweiter extrazellulärer Loop</i>	<i>ja</i>
<i>293C3</i>	<i>zweiter extrazellulärer Loop</i>	<i>ja</i>
<i>C24B9</i>	<i>zweiter extrazellulärer Loop</i>	<i>nein</i>
<i>K-18</i>	<i>C-terminal</i>	<i>nein</i>

Immervoll et al. (2008) verglichen die drei Klone AC133, AC141 und K-18 (Tab. 16), die sehr unterschiedliche Epitope erkennen (Tab. 15). Menschliche Retina, die CD133 konstitutiv exprimiert, und gesundes Pankreasgewebe wurden von den Klonen AC133 und K-18 in gleicher Weise gefärbt. Der Klon AC141 brachte sowohl an Retina als auch im Westernblot mit Proteinextrakten aus Tumor- und Normalgewebe des Pankreas im Gegensatz zu Klon AC133 negative Ergebnisse (Immervoll et al. 2008). Da der Klon AC133 bei weniger Background sensitiver war, benutzten die Autoren ihn für weitere Untersuchungen. Außer Miraglia et al. (1997) hatten auch die übrigen Autoren an gesundem (Hermann 2009, Lardon et al. 2008, Welsch et al. 2009) bzw. neoplastischem Pankreasgewebe (Hermann 2009, Welsch et al. 2009) positive Ergebnisse mit diesem Klon (Tab. 16). Der Unterschied bestand wie beschrieben darin, dass nur Immervoll et al. (2008) in Tumoren das Protein in der Membran nachweisen konnte. Welsch et al. (2009) fanden im Western-Blot mit K-18 neben CD133 eine zusätzliche nicht näher charakterisierte Bande. Unter Verwendung desselben Klons wiesen Maeda et al. (2008) CD133 in neoplastischem, nicht aber

## 5. Diskussion

normalem Pankreasgewebe nach. Sowohl mit dem Klon 239C3 als auch mit dem Antiserum  $\alpha$ HE2 fanden Lardon et al. (2008) CD133 im normalen Pankreasgewebe. Welsch et al. (2009) testeten an Tumorgewebe neben dem Klon AC133 auch den Klon C24B9, der ebenfalls in dieser Arbeit benutzt wurde, und fanden im Gegensatz zu dieser Arbeit auch mit jenem Klon CD133 nicht in der Membran, sondern nur im Zytoplasma.

Eine Ursache für diese Unterschiede zwischen den Studien könnte darin liegen, dass CD133 im selben Gewebe unterschiedlich exprimiert sein kann. So war in der Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 (Florek et al. 2005) und Kolonkarzinomen (Kemper et al. 2010) ein Verlust der mittels der Antikörper-Klone AC133 bzw. AC133, W6B3C1, 293C und AC141 gemessenen CD133-Expression während der Zelldifferenzierung festgestellt worden. Da Kemper et al. (2010) CD133 jedoch im Immunoblot weiterhin in gleicher Menge nachweisen konnten und Promoter-Aktivität, mRNA-Level und Splicevarianten-Expression unverändert blieben, untersuchten sie den Einfluss der Glykosylierung auf die Epitoperkennung. Dass diese nicht von der Glykosylierung per se abhängt, wiesen die Autoren durch bakteriell exprimiertes und somit nicht glykosiliertes CD133 nach, das im Immunoblot von allen vier Antikörpern gebunden wurde. Zusätzlich konnten die Autoren zeigen, dass durch eine veränderte Glykosylierung der Proteintransport an die Zelloberfläche nicht behindert ist. Im Prinzip ist weiterhin denkbar, dass durch alternatives Splicen bestimmte Epitope nicht mehr an der Zellmembran präsentiert werden. Alle bekannten CD133-Splicevarianten enthalten allerdings den zweiten extrazellulären Loop (Kemper et al. 2010), so das zumindest die Epitope 293C3, AC141 und C24B9 nicht davon betroffen wären. Weiterhin verglichen die Autoren zwei verschiedene Methoden der Gewebekonservierung und färbten auf diese Weise in denselben Tumorproben nur einzelne bzw. alle epithelialen Tumorzellen. Damit betonten sie die Bedeutung der Methode für die Antigenerkennung. Dies weist möglicherweise auf die Bedeutung der Konformation des Proteins oder der Membran-Mikrodomäne hin, die die Zugänglichkeit des Proteins für den Antikörper beeinflusst. Auch Fargeas et al. (2011) wiesen darauf hin, dass aufgrund der vielfältigen Wechselwirkungen zwischen CD133 und anderen Membranmolekülen die Methode bei der Untersuchung eine sehr wichtige Rolle spielt.

Für die in Tab. 16 dargestellten uneinheitlichen Ergebnisse scheinen weder die verwendeten Antikörper noch die Methode verantwortlich zu sein. Immervoll et al. (2008), Hermann

5. Diskussion

(2009) und Welsch et al. (2009) benutzten den gleichen Antikörper mit unterschiedlichen Ergebnissen. Immervoll et al. (2008) testeten ihn sowohl an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Tumorproben als auch an Gefrierschnitten jeweils mit dem gleichen Ergebnis. Demnach scheint hier die Art der Konservierung unbedeutend zu sein. Die immunhistochemische Prozedur jedoch ist unterschiedlich in den Untersuchungen von Immervoll et al. (2008) und Welsch et al. (2009), in der Studie von Hermann (2009) ist sie nicht näher beschrieben. Welsch et al. (2009) wandten die gleiche Prozedur an wie in dieser Arbeit. Dabei erhielten sie jeweils das gleiche Ergebnis mit den Klonen AC133 und C24B9. Mit dem Klon C24B9 sind jedoch in der vorliegenden Arbeit Ergebnisse wie in der Untersuchung von Immervoll et al. (2008) erzielt worden und damit andere als von Welsch et al. (2009).

**Tab. 16. Ergebnisse verschiedener CD133-Antikörper im Pankreasgewebe.**

(+ = positiv, - = negativ)

<i>Antikörper- Klon</i>	<i>Normalgewebe</i>	<i>Karzinom</i>		<i>Autor</i>
		<i>apikal</i>	<i>zytoplasmatisch</i>	
<b>AC133</b>	+	+	+	<i>Immervoll et al. (2008)</i>
	+	-	+	<i>Hermann (2009)</i>
	+	-	+	<i>Welsch et al. (2009)</i>
	+	<i>nicht getestet</i>		<i>Lardon et al. (2008)</i>
	-	<i>nicht getestet</i>		<i>Miraglia et al. (1997)</i>
<b>C24B9</b>	+	-	+	<i>Welsch et al. (2009)</i>
	+	+	<i>nicht geprüft</i>	<i>vorliegende Arbeit</i>
<b>AC141</b>	-	-	-	<i>Immervoll et al. (2008)</i>
<i>(Westernblot)</i>				
<b>K-18</b>	+	<i>nicht getestet</i>		<i>Immervoll et al. (2008)</i>
	-	-	+	<i>Maeda et al. (2008)</i>
<b>239C3</b>	+	<i>nicht getestet</i>		<i>Lardon et al. (2008)</i>
<b>Antiserum ahE2</b>	+	<i>nicht getestet</i>		<i>Lardon et al. (2008)</i>

## 5. Diskussion

Die CD133-Expression in Tumorstammzellen ist weiterhin vom Mikromilieu der Zellen abhängig, unter anderem vom Sauerstoffpartialdruck, wobei die Reaktion vom Tumortyp abhängt. In Zelllinien von Hirn-, Lungen- und Pankreastumoren führt Hypoxie zur Hochregulierung der CD133-mRNA, ebenso in hepatozellulären, Hirn- und Prostata-Tumoren, und zur Herunterregulierung in Magen- und Kolon-Karzinomen (Grosse-Gehling 2013). Auch dieser Effekt kann aber nicht für die geschilderten unzusammenhängenden oder widersprüchlichen Ergebnisse der unterschiedlichen Studien verantwortlich sein, da er zur Inhomogenität innerhalb eines Tumors, nicht aber zwischen verschiedenen Studien führen würde.

### 5.1.2.1 Prognostische Bedeutung der CD133-Expression

Hinsichtlich der Bedeutung der CD133-Expression bei Tumorerkrankungen gibt es unterschiedliche Angaben, wobei die meisten Ergebnisse für eine negative Korrelation zwischen der CD133-Expression und der Prognose in Hirntumoren und epithelialen Tumoren sprechen (Grosse-Gehling et al. 2013). In dieser Arbeit war CD133 in Normalgewebe stärker exprimiert als in Tumorgewebe. Dies befindet sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Immervoll et al. (2008). In dieser Arbeit zeigte sich eine Korrelation zwischen CD133-Expression und UICC-Stadium, wenn man Tumoren mit CD133-Expression solchen ohne CD133-Expression gegenüberstellte. Maeda et al. (2008) untersuchten den Zusammenhang zwischen der CD133-Expression und klinischen Parametern und fanden jeweils statistisch signifikant eine stärkere Expression in weniger gut differenzierten Tumoren, bei Lymphknotenmetastasen oder sonstiger Invasion lymphatischen Gewebes sowie bei kürzerer Überlebenszeit. Da die Autoren CD133 ausschließlich intrazellulär nachwiesen, sind ihre Ergebnisse mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen Korrelation zwischen CD133-Expression und UICC-Stadium schlecht vergleichbar. In der Studie von Immervoll et al. (2008) wechselte die Intensität der Membranfärbung mit der morphologischen Heterogenität der Tumoren, zeigte aber keinen Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad, dem TNM-Status oder der Überlebenszeit der Patienten. Die übrigen Autoren stellten keine Untersuchung zur Beziehung der Marker-Expression zu klinischen Parametern an.

### **5.1.3. Expression von CD166**

Da eine Zwischenauswertung für den Marker CD166 keine Trends und Korrelationen zeigte, wurden keine weiteren Experimente durchgeführt, so dass nur 22 Tumorproben und 21 Normalgewebe auf die Expression dieses Markers hin untersucht wurden. In je ca. 50% der Proben war eine moderate bis starke CD166-Expression mit mehr als 20% positiver Zellen zu beobachten. Zusammenhänge mit klinischen Parametern wurden nicht gefunden.

Kahlert et al. (2009) berichten von unterschiedlicher CD166-Expression in Normal- und Tumorgewebe des Pankreas. Im Normalgewebe wurde CD166 besonders in Azini und ausschließlich in der Membran exprimiert, 48 der 60 Proben waren positiv. In 50 von 97 Tumoren wurde das Protein im Zytoplasma exprimiert, in 6 zusätzlich in der Zellmembran, 41 Tumoren waren negativ. In der Studie von Tachezy et al. (2012) wiesen sowohl alle Tumoren als auch alle Normalgewebe eine CD166-Expression in der Membran auf. Teilweise war das Protein zudem im Zytoplasma exprimiert, dann aber schwächer als in der Membran. Tumoren exprimierten es im Mittel stärker als Normalgewebe. Im Gegensatz dazu war CD166 in der Studie von Hong et al. (2010) in Normal- und Tumorgewebe im Zytoplasma exprimiert, im Normalgewebe ebenfalls schwach, und in einigen Tumoren mit unterschiedlicher Intensität innerhalb desselben Tumors. Wenige Tumoren (6 von 39) wiesen auch eine Expression in der Membran auf. In allen drei Untersuchungen wurde wie auch in dieser Arbeit der Klon MOG/07 benutzt. Aufgrund des relativ großen Probenumfangs ist es unwahrscheinlich, dass die Auswahl des Probenmaterials selbst die Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse trotz gleicher Antikörper ist. Daher kommen am ehesten Unterschiede bei der Probenfixierung, bei der Vorbereitung der Proben für die Färbung sowie beim eigentlichen Färbevorgang in Frage.

#### **5.1.3.1 Prognostische Bedeutung der CD166-Expression**

In vielen Malignomen erwies sich die CD166-Expression als prognostisch bedeutsam (Ofori-Acquah 2008). In Melanomen korrelierte sie mit der Eindringtiefe nach Breslow bzw. dem Clark-Level. Metastasen zeigten oft eine positive Expression (ca. 50-70%). Im Prostata-Karzinom wurde immunhistochemisch in Tumoren mit Gleason-Score 1-3 eine

## 5. Diskussion

höhere Expression gemessen als in intraepithelialen Neoplasien, während sie bei Gleason-Score 4 und 5 oftmals wieder geringer war (Ofori-Acquah 2008). Die meisten Untersuchungen zum Mammakarzinom sprechen ebenfalls für eine geringere Expression bei Vorliegen ungünstiger klinischer Parameter (Ofori-Acquah 2008). Bei kolorektalen Karzinomen war eine Expression im Zytoplasma häufiger als in der Membran (59 bzw. 31% der untersuchten Tumoren), wobei die Expression in der Membran mit einer kürzeren Überlebenszeit korrelierte (Ofori-Acquah 2008). Im Harnblasenkarzinom korrelierte die CD166-Expression mit Tumorstadium, Differenzierung und Überlebenszeit, beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mit Tumorstadium, Invasivität und Lymphknotenmetastasen (Ofori-Acquah 2008).

Für das Pankreaskarzinom fanden Kahlert et al. (2009) eine inverse Korrelation zwischen CD166-Expression und Überlebenszeit ( $P = 0,03$ ). Dabei war zudem bei Vorliegen des Proteins in der Membran zusätzlich zum Vorliegen im Zytoplasma wie in der Mehrzahl der Tumoren die Überlebenszeit nochmals kürzer ( $P = 0,02$ ). Im Unterschied dazu war die ebenfalls längere Überlebenszeit bei geringerer Marker-Expression mit 659 gegenüber 389 Tagen in der Untersuchung von Hong et al. (2010) statistisch nicht signifikant. Auch Tachezy et al. (2012) fanden keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen CD166-Expression und Überlebenszeit oder klinischen Parametern. Unter Einschluss der Ergebnisse dieser Arbeit erweist sich mehrheitlich die CD166-Expression im Pankreaskarzinom als weniger aussagekräftig für die Prognose im Vergleich mit anderen Karzinomen. Problematisch ist dabei zudem die sehr uneinheitliche Marker-Expression in Zytoplasma und Zellmembran zwischen den Studien.

### 5.1.4 Expression von CD326

CD326 war in dieser Arbeit in fast allen untersuchten Tumoren und normalen Geweben exprimiert, lediglich 8,3% bzw. 11,3% der Proben waren negativ. Hinsichtlich der Stärke der Expression unterschieden sich Tumor- und Normalgewebe nicht signifikant. Jeweils ca. 20-40% der Proben exprimierten das Protein schwach, moderat oder stark.

Went et al. (2004) untersuchten mittels Tissue Microarray über 3000 Proben von 131 verschiedenen Tumortypen und 355 Proben aus 30 verschiedenen gesunden Geweben. Nicht-

## 5. Diskussion

neoplastische mesenchymale Gewebe waren immer negativ, während epitheliale Gewebe meist positiv waren. Ähnliches spiegelte sich auf der Ebene der neoplastischen Gewebe wider. Tumoren mesenchymalen Ursprungs waren fast immer negativ, während nur ein epithelialer Tumortyp in allen 15 Proben negativ war. Nicht-neoplastische Azini des Pankreas exprimierten den Marker stark. Im Pankreaskarzinom war er in 48 von 50 Tumoren exprimiert, in 39 davon stark. Sehr ähnliche Ergebnisse hatten zuvor auch Momburg et al. (1987) berichtet. CD326 lag in der Membran der meisten epithelialen Gewebe vor, teilweise auch schwächer im Zytoplasma. Im Normalgewebe des Pankreas exprimierten Epithelzellen der Azini und der Ausführungsgänge CD326 in der Membran stark, im Pankreaskarzinom diffus auch im Zytoplasma. Cirulli et al. (1998) fanden das Protein im gesunden exokrinen Pankreas v.a. im Gangepithel in den Membranen stark exprimiert, in den Azini schwächer und dann oft im Zytoplasma. Li et al. (2007) fanden durchflusszytometrisch in menschlichen Primärtumoren, die 16 Wochen nach Implantation in Mäusen gewachsen waren, eine Expression in 11 – 70% der Zellen. Während die verschiedenen immunhistochemischen Untersuchungen also sehr ähnliche Ergebnisse hatten, wich das durchflusszytometrische Resultat deutlich von diesen ab.

### 5.1.4.1 Prognostische Bedeutung der CD326-Expression

Im Wesentlichen ist die Expression von CD326 in gesunden Geweben auf Epithelien beschränkt und hier basolateral zu finden. Ein Neuauftreten in normalerweise negativen Epithelien und eine stärkere Expression in normalerweise positiven Epithelien sind ein Hinweis auf eine Dysplasie oder Metaplasie. Dazu passend ist die Expression in Karzinomen meist stärker als im gesunden Ausgangsgewebe (Patriarca et al. 2012). In den meisten Tumoren lässt die CD326-Expression keine Aussage zur Prognose zu, in einigen geht sie aber mit einer schlechten, in anderen wiederum mit einer guten Prognose einher. Beim Prostata-Karzinom ist sie z.B. stärker in hormonrefraktären Tumoren als in frühen Stadien ( $P = 0,015$ ), in Adenokarzinomen der Lunge im Stadium T2 steht eine stärkere Expression hingegen für eine gute Prognose (Baeuerle und Gires 2007). Für Lymphknoten-positive Mammakarzinome besteht eine starke negative Korrelation zwischen Marker-Expression und Prognose, ebenso für Gallenblasenkarzinome, Cholangiokarzinome und Plat-

tenepithelkarzinome des Ösophagus und des Kopfes (Baeuerle und Gires 2007). Eine positive Korrelation wurde bei Magenkarzinomen der Stadien I und II, dem klarzelligen Nierenkarzinom, mäßig differenzierten Kolonkarzinomen im Stadium II und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen gefunden (Baeuerle und Gires 2007). Die Expression in disseminierten Zellen und Metastasen geht meist mit einer schlechten Prognose einher (Bauerle und Gires 2007). Im Pankreaskarzinom gab es bisher keine Untersuchungen zur Korrelation zwischen Marker-Expression und Prognose. In der vorliegenden Arbeit war kein statistisch signifikanter Zusammenhang erkennbar.

### 5.2 Tumorstammzellen im Pankreas

Stammzellen generell zeichnen sich durch Selbsterneuerung aus, d.h. aus Stammzellen können durch Zellteilung wieder Stammzellen entstehen, andererseits können Tochterzellen durch zunehmende Differenzierung der Ausgang für Zelllinien des Gewebes sein (Shipitsin und Polyak 2008). Stammzellen sind langlebig und stehen dem Organismus das ganze Leben zur Gewebserneuerung zur Verfügung.

In Tumoren konnten ähnliche Verhältnisse demonstriert werden. Anhand von Oberflächenmolekülen ließ sich in einigen Tumoren eine kleine Zellpopulation identifizieren (oftmals <1% der Gesamtzellzahl), die im Gegensatz zur Mehrheit der Tumorzellen nach Injektion in immunkompromitierte Mäuse einen neuen Tumor entstehen ließ (Spillane und Henderson 2007, Zhou und Zhang 2008). Dieser enthielt phänotypisch verschiedene Zellen, die denen des Ausgangstumors glichen, sowie eine kleine Zellpopulation, die nach abermaliger Injektion in Mäuse erneut einen gleichen Tumor entstehen ließ (serielle Transplantation; Al-Hajj und Clarke 2004, Reya et al. 2001). Eine seltener angewandte Methode zur Stammzellidentifikation ist die Detektion der durch Farbstoffausschluss gekennzeichneten *side population*, die mit Stammzellen angereichert ist. Es ist nicht geklärt, ob Tumorstammzellen durch Mutationen v.a. aus normalen Stammzellen entstehen und daher von vornherein die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, oder ob sie aus Progenitor- oder sogar stärker differenzierten Zellen hervorgehen und diese Eigenschaft sekundär durch Mutation wieder erwerben (Clarke et al. 2006, Dean et al. 2005, Reya et al. 2001). Weiterhin geht man davon aus, dass Tumorstammzellen sehr resistent gegen Che-

## 5. Diskussion

motherapeutika und radioaktive Bestrahlung sind, indem sie durch Membrantransporter Therapeutika aus der Zellen herausschleusen und zudem eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität aufweisen (Ailles und Weissman 2007, Zhou und Zhang 2008). Zur Resistenz mag auch der teils ruhende Status beitragen, in dem Stammzellen sich vielfach befinden. Im Ruhestadium sind Chemotherapeutika wirkungslos, die die DNA zum Ziel haben, da die von diesen beeinträchtigten Stoffwechselwege nicht oder zu geringfügig aktiv sind.

Als wichtigster Nachweis für die Existenz von Stammzellen gilt die Xenotransplantation (Grosse-Gehling 2013). Diese gelang Hermann (2009) beim Pankreaskarzinom nach magnetischer Sortierung von Zellsuspensionen aus Primärtumoren anhand des Tumorstammzellmarkers CD133. Die serielle Transplantation führte zu annähernd gleichen Ergebnissen. Weiterhin waren die CD133<sup>+</sup>-Zellen negativ für Zytokeratin, was ein Hinweis auf ihren undifferenzierten Zustand angesehen werden kann, und im Tumor deutlich häufiger als im Normalgewebe. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass CD133<sup>+</sup>-Zellen im Pankreaskarzinom mindestens eine mit Tumorstammzellen angereicherte Population darstellen. Einen weiteren Hinweis auf die Stammzeleigenschaften der CD133<sup>+</sup>-Zellen erbrachte Hermann (2009) mit der Pankreaskarzinom-Zelllinie L3.6pl, deren CD133<sup>+</sup>-Zellen in Kultur resistenter gegenüber Gemcitabine waren als CD133<sup>-</sup>-Zellen. Allerdings wiesen Dean et al. (2005) darauf hin, dass bei den meisten medikamentenresistenten Tumoren, z.B. auch dem Pankreaskarzinom, nicht das Problem bestünde, dass wenige Zellen die Chemotherapie überlebten, sondern dass nur wenige Zellen dadurch stürben. Insofern ist dieser Ansatz beim Pankreaskarzinom möglicherweise wenig aussagekräftig.

Im Widerspruch zu den Ergebnissen von Hermann (2009) stehen die Ergebnisse dieser Arbeit sowie von Immervoll et al. (2008), in denen ein Großteil der Tumorzellen CD133-positiv war, wohingegen allgemein davon ausgegangen wird, dass Tumorstammzellpopulationen sehr klein sind. Nach Modellrechnungen können starke Populationen in Abhängigkeit von Teilungs- und Differenzierungsrate aber durchaus vorkommen (Johnston et al. 2010) und sind, wie für Hirntumoren nachgewiesen (Zeppernick et al. 2008), mit fortgeschrittenen Tumoren oder einer schlechten Prognose verbunden. Das wurde in dieser Arbeit nicht bestätigt. Ein anderes Ergebnis zeigt sich allerdings, wenn zur Einschätzung der Prognose anhand der CD133-Markierung nur Zellen mit zytoplasmatischer Färbung berücksichtigt werden. Diese Population CD133<sup>+</sup>-Zellen korrelierte in der Untersuchung von Maeda et al.

## 5. Diskussion

(2008) mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren, dem N-Status und der Überlebenszeit und war auch der Ausgangspunkt für die erfolgreichen Xenograft-Versuche von Hermann (2009). Immervoll et al. (2008) fanden im gesunden Pankreasgewebe neben einer vornehmlich apikalen Expression eine zytoplasmatische CD133-Expression im Bereich zentroazinärer Zellen und mutmaßten, dass in diesem Fall möglicherweise Stammzellen vorliegen könnten, da zentroazinäre Zellen als Stammzellen des exokrinen Pankreas in Betracht gezogen wurden (Stanger und Dor 2006) und somit auch als die Ausgangszelle des Pankreaskarzinoms in Frage kämen. Allerdings ist nahezu jeder Zelltyp des Pankreas bereits als mögliche Stammzelle diskutiert worden (Guerra et al. 2007, Maitra und Hruban 2008, Murtaugh und Leach 2007, Omary et al. 2007, Yalniz und Pour 2005), was auf die bestehende Ungewissheit diesbezüglich hinweist.

Ähnlich wie Hermann (2009) wiesen Li et al. (2007) mittels Xenotransplantation die Tumorigenität von Zellen im Pankreaskarzinom nach, die die Marker CD24, CD44 und CD326 exprimierten. Im Ausgangstumor waren 2-9% der Zellen CD44<sup>+</sup>, 3-28% CD24<sup>+</sup>, 11-70% CD326<sup>+</sup>, 1-17% CD44<sup>+</sup>/CD326<sup>+</sup>, 2-23% CD24<sup>+</sup>/CD326<sup>+</sup>, 0,5-2% CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> und nur 0,2-0,8% CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>/CD326<sup>+</sup>. Die einfach positiven Populationen zeigten ein mindestens zehnfach höheres tumorigenes Potential als die jeweilige negative Population, wobei die CD44<sup>+</sup>-Zellen das höchste aufwiesen. Das tumorigene Potential doppelt positiver Zellen war nochmals erhöht, und das der dreifach positiven am höchsten. Hier reichten 100 Zellen, um in der Hälfte der Mäuse Tumoren zu bilden, die wie der Ausgangstumor histologisch heterogen waren. Durch Kombination potentieller Tumorstammzellmarker grenzten Li et al. (2007) also eine Zellpopulation ein, die ein noch höheres tumorigenes Potential hatte als die von Hermann (2009) beschriebene, ohne den von Hermann (2009) benutzten Tumorstammzellmarker CD133 einzubeziehen. Huang et al. (2008) erhielten mit der Pankreaskarzinom-Zelllinie PANC-1 nach Zellsortierung anhand der Marker CD44 und CD24 ähnliche Ergebnisse wie Li et al. (2007). Nur 2,1-3,5% der Zellen waren doppelt positiv, 5,1-17,5% CD44<sup>+</sup> und 57,8-70,1% CD24<sup>+</sup>. Abermals wiesen die doppelt positiven Zellen die mit Abstand höchste Tumorigenität auf. Dass die CD44-Expression auch von prognostischer Bedeutung war (Hong et al. 2009, Immervoll et al. 2011), unterstreicht die Möglichkeit, dass es sich hier um einen Tumorstammzellmarker im Pankreaskarzinom handeln könnte. Der von Li et al. (2007) benutzte Tumorstammzellmarker CD326 hinge-

gen erwies sich in der vorliegenden Arbeit nicht als prognostischer Marker des Pankreaskarzinoms.

### **5.3 Ploidiestatus im Pankreaskarzinom**

In dieser Arbeit wurde die Ploidie von 46 verschiedenen Pankreaskarzinomen mittels Feulgen-Densitometrie bestimmt und den vier Histogrammtypen nach Auer et al. (1980) zugeordnet (siehe Abschnitt 3.2.2.5). Dabei wiesen 13,3% der Tumoren den Histogrammtyp I auf und waren somit diploid, 26,7% den Histogrammtyp III, 60% den Histogrammtyp IV, aber keiner den Histogrammtyp II.

Weiterhin wurde untersucht, ob die ermittelte Ploidie mit den klinischen Parametern Grading, TNM-Status, UICC-Stadium, der Überlebenszeit der Patienten oder der Expression der vier untersuchten Tumorstammzellmarker korrelierte. Außer einem Zusammenhang mit dem Grading und der Expression von CD44, wenn deren vier Stufen zu zwei Klassen gruppiert wurden, stellte sich weiter kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Ploidie und einem der anderen untersuchten Parameter heraus. Es bestand zwar hinsichtlich der Überlebenszeit ein geringer Unterschied zwischen Patienten mit euploiden und solchen mit aneuploiden Tumoren. Dieser war aber ebenfalls statistisch nicht signifikant.

In zahlreichen Studien finden sich sehr kontroverse Daten sowohl zur Ploidie in Pankreaskarzinomen als auch zu Korrelationen der Ploidie mit klinischen Parametern und der Prognose der Patienten (Tab. 17).

Aus der Aufstellung in Tab. 17a und 17b wird ein klarer Unterschied zwischen Ergebnissen der Feulgen-Densitometrie und der Durchflusszytometrie deutlich. Letztere ergaben meist einen ungefähr gleichen Anteil diploider und nicht-diploider Tumoren (mit Ausnahme von Baisch et al. 1990), während bei Feulgen-densitometrischer Messung die nicht-diploiden Tumoren deutlich überwogen, zumindest aber immer mindestens rund 60% betrug, in den Untersuchungen von Weger et al. (1987) und Böttger et al. (1994) sogar 100%. Hier offenbart sich vermutlich ein Problem der durchflusszytometrischen Messung von Tumorproben, die nur mit Zellsuspensionen erfolgen kann. Sobald eine solche Suspension erstellt wurde, ist, sofern ausschließlich der DNA-Gehalt erfasst wird, eine Unterscheidung zwischen Tumor- und normalen Zellen nicht mehr möglich. Selbst bei sehr

## 5. Diskussion

sorgfältiger Auswahl des Präparates unter weitgehendstem Ausschluss normalen Pankreasgewebes werden diploide Fibrozyten und Leukozyten in die Messung einbezogen, die den Tumor durchsetzen. Damit wird der Anteil diploider Tumorzellen überschätzt und die tatsächlichen Tumorzellen werden relativ vernachlässigt. Entsprechend wiesen Bose et al. (1993) in vergleichenden Messungen von 30 Tumoren durchflusszytometrisch 29, mittels Feulgen-Densitometrie aber nur 9 diploide Tumoren nach. Weiterhin können bei der Gewebepräparation Zell- und Zellkernfragmente entstehen, die die Genauigkeit der Messung beeinträchtigen (Bose et al. 1993).

In fast allen Studien korrelierte die Ploidie statistisch signifikant mit der Prognose der Patienten (Tab. 17). So überlebten in der Studie von Allison et al. (1991) z.B. Patienten mit diploiden Tumoren im Mittel 25 Monate, Patienten mit aneuploiden Tumoren hingegen nur 10,5 Monate. In der Untersuchung von Ruge et al. (1996) waren es sehr ähnlich 21,1 bzw. 9,3 Monate. Alanen et al. (1990) fanden eine Differenz von 10 Monaten (13 vs. 3 Monate) und Porschen et al. (1993) einen Unterschied von durchschnittlich 2,5 Monaten (6,9 vs. 4,5 Monate).

**Tab. 17. Publikationen zur Ploidie im Pankreaskarzinom**

*Prozentangaben zeigen den Anteil der betreffenden Tumoren an*

*a) Ergebnisse mit Feulgen-Densitometrie oder Laser scanning cytometry (Harada et al. 2002)*

<i>Publikation</i>	<i>Anzahl Patienten</i>	<i>di-ploid</i>	<i>aneuploid gesamt</i>	<i>tri-ploid</i>	<i>tetra-ploid</i>	<i>Korrelation mit Prognose</i>
<i>Allison et al. (1991)</i>	47	40%	60%		4%	<i>P = 0,003</i>
<i>Böttger et al. (1994)</i>	41	0%	100%	17%	29%	<i>n.s.</i>
<i>Linder et al. (1994)</i>	96	28%	72%		18%	<i>P &lt; 0,05</i>
<i>Tsavaris et al. (2009)</i>	226	0%	91%			<i>P &lt; 0,001</i>
<i>Weger et al. (1991)</i>	70	11%	89%		50%	<i>P = 0,0003</i>
<i>Weger et al. (1987)</i>	77	0%	100%			<i>P &lt; 0,01</i>
<i>Yeo et al. (1995)</i>	119	43%	57%			<i>P &lt; 0,001</i>
<i>Harada et al. (2002)</i>	20	30%	70%			<i>keine Angabe</i>

## 5. Diskussion

### b) Mittels Durchflusszytometrie gemessene Ploidie

<i>Publikation</i>	<i>Anzahl Patienten</i>	<i>di-ploid</i>	<i>aneuploid gesamt</i>	<i>tri-ploid</i>	<i>tetra-ploid</i>	<i>multi-ploid</i>	<i>Korrelation mit Prognose</i>
<i>Alanen et al. (1990)</i>	62	39%	61%		10%	6%	$P < 0,001$
<i>Baisch et al. (1990)</i>	47	85%	15%				<i>n.s. invers</i>
<i>Eskelinen et al. (1991)</i>	46	48%	52%			2%	$P = 0,015$
<i>Eskelinen et al. (1992)*</i>		49%	51%		8%		<i>signifikant bei Gruppierung</i>
<i>Herrera et al. (1992)</i>	62	48%	52%		3%		<i>n.s.</i>
<i>Porschen et al. (1993)</i>	56	52%	48%				$P < 0,05$
<i>Rugge et al. (1996)</i>	60	35%	65%				$P = 0,0015$
<i>Yoshimura et al. (1992)</i>	72	47%	53%				$P < 0,05$

Für Patienten mit anscheinend tetraploiden Tumoren wurde eine höhere Überlebenszeit ermittelt als für Patienten mit anderweitig nicht-diploiden Tumoren (Böttger et al. 1994, Eskelinen et al. 1992, Linder et al. 1994, Weger et al. 1987). Weger et al. (1987) fanden bei nahezu tetraploiden Tumoren eine Überlebenszeit von mindestens 70 Monaten im Vergleich zu 18 Monaten bei triploiden Tumoren. Böttger et al. (1994) berichteten, dass weniger als 20% der Patienten mit triploiden Tumoren 18 Monate überlebten im Gegensatz zu 50% der Patienten mit tetraploiden Tumoren.

Seltener wurden Korrelationen der Tumor-Ploidie mit pathologischen Parametern geprüft, darunter am häufigsten das Tumorstadium. Hier berichteten Alanen et al. (1990) und Porschen et al. (1993) von statistisch signifikant häufigerer Aneuploidie in fortgeschrittenen Tumor-Stadien. Diese Tendenz fand sich auch in den Studien von Böttger et al. (1994) und Yoshimura et al. (1992), war aber nicht signifikant. Auch Weger et al. (1991) fanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen diesen beiden Faktoren. Meistens war zudem in Tumoren höherer Ploidie der Differenzierungsgrad geringer. Dieser Zusammenhang war

## 5. Diskussion

signifikant in den Untersuchungen von Alanen et al. (1990) und Herrera et al. (1992), nicht aber in denen von Böttger et al. (1994), Linder et al. (1994), Porschen et al. (1993) und Yoshimura et al. (1992). Größere Tumoren hatten eine statistisch signifikant höhere Ploidie in den Untersuchungen von Alanen et al. (1990) und Yoshimura et al. (1992), wobei hier unterschiedliche Größenklassen einander gegenübergestellt wurde, und nicht signifikant in der Untersuchung von Böttger et al. (1994). Nur Yoshimura et al. (1992) fanden eine vermehrte nicht signifikante Infiltration von Lymphknoten bei erhöhter genomischer Instabilität bzw. höherer Plodiestammlinie des Tumors. Dass radikale Operationen bei diploiden Tumoren häufiger als bei aneuploiden Tumoren möglich waren, erwies sich als statistisch signifikant in den Studien von Alanen et al. (1990), Linder et al. (1994) und Weger et al. (1991), aber nicht in der von Porschen et al. (1993). Eine geringfügigere genomische Instabilität stellten Alanen et al. (1990) und Porschen et al. (1993) in Tumoren des Pankreaskopfes gegenüber Pankreaskorpus und -schwanz fest, nicht aber Linder et al. (1994). Dies war nur in der Untersuchung von Alanen et al. (1990) statistisch signifikant.

## 5.4 Fazit und Ausblick

### 5.4.1. Fazit

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine relativ einfache, schnelle und gewebesparende Methode zur Identifizierung potentieller Tumorstammzellmarker. Ein Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Studien zeigt jedoch eine weitreichende Heterogenität der Daten auf. Dabei sind die differierenden Ergebnisse verschiedener verwendeter Methoden (Durchflusszytometrie vs. IHC, unterschiedliche Antikörper in der IHC) nicht unerwartet. Wichtig scheint aber bei der IHC neben der Expressionsstärke eines Tumorstammzellmarkers auch der Expressionsort innerhalb der Zelle zu sein. Weiterhin ist die Nutzung einzelner dem gleichzeitigen Einsatz mehrerer Tumorstammzellmarker unterlegen. Auch der Zusammenhang der Expression mit prognostischen Parametern ist kein hinreichendes Kriterium, da ein Oberflächenprotein sich bereits aufgrund seiner normalen physiologischen Rolle auf die Prognose auswirken kann. Die Identifizierung weiterer Tumorstammzellmarker ist notwendig, da bisher auch bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer Tumorstammzellmarker die eigentliche Tumorstammzelle noch nicht identifiziert sondern lediglich weiter ein-

## 5. Diskussion

gegrenzt wurde. Außerdem teilen die Tumorstammzellen verschiedener Tumorentitäten trotz gleicher stammzelltypischer Eigenschaften nicht unbedingt die gleichen Tumorstammzellmarker.

### **5.4.2 Ausblick**

Die Identifikation und Zellkultur von Tumorstammzellen würde die Erforschung ihrer physiologischen Eigenschaften und Resistenzmechanismen zur Entwicklung spezifischer Therapien ermöglichen. Allerdings ist die Spezifität neuer Therapeutika durch die Heterogenität der Tumorstammzellen einer Tumorentität und sogar innerhalb eines Tumors begrenzt, da die Wirkung einerseits so spezifisch sein sollte, dass v.a. Tumorstammzellen betroffen sind, andererseits aber so allgemein, dass sie eine möglichst hohe Variationsbreite von Tumorstammzellen zum Ziel haben.

## 6. Zusammenfassung

Der Tumorstammzell-Theorie zufolge beruhen Tumorentstehung und -progression auf wenigen Tumorzellen mit Stammzellcharakter. Die Identifikation und Charakterisierung dieser Tumorstammzellen ermöglicht potentiell die Entwicklung spezifischer Therapeutika.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Tumor-Stammzellmarker CD44, CD133, CD166 und CD326 im Karzinom- und Normalgewebe des menschlichen exokrinen Pankreas mittels Immunhistochemie untersucht. Weiterhin wurde in Tumoren anhand des Feulgen-densitometrisch gemessenen DNA-Gehalts der Zellkerne der Ploidiestatus bestimmt. Die Korrelationen zwischen Tumor-Stammzellmarker-Expression, Ploidiestatus und klinischen Parametern wurden statistisch analysiert.

CD44 wurde in Normal- und Tumorgewebe v.a. in der basolateralen Zellmembran exprimiert, in Tumorgewebe dabei inhomogener und signifikant häufiger stark. Zudem wurde CD44 in Tumoren mit Fernmetastasen und mit steigendem UICC-Stadium stärker exprimiert. CD133 wurde in der apikalen Zellmembran exprimiert. Die Expression war in Tumorgewebe signifikant schwächer als in Normalgewebe und dabei mit höheren UICC-Stadien des Tumors zunehmend schwächer. CD166 wurde im Normalgewebe in den Membranen der Azini exprimiert, im Tumorgewebe im Zytoplasma duktaler Strukturen. CD326 wurde im Normalgewebe in den Zellmembranen kleiner Ausführungsgänge, weniger auch der Azini exprimiert, im Tumorgewebe in der basolateralen Membran duktaler Zellen, seltener auch zytoplasmatisch. Für CD166 und CD316 konnten keine Korrelationen zu klinischen Parametern gezeigt werden.

Weiter korrelierte ein aneuploider DNA-Status mit einer geringeren Differenzierung und einer kürzeren Überlebenszeit. Die CD44-Expression war in euploiden Tumoren signifikant schwächer als in aneuploiden Tumoren.

Mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden ließen sich erste Korrelationen zwischen Tumorstammzellmarkern und klinischen Parametern zeigen. Die Einbeziehung weiterer potentieller Tumorstammzellmarker, die Untersuchung der Koexpression von Tumorstammzellmarkern, sowie die Auswertung nicht nur der Expressionsintensität, sondern auch des histologischen und subzellulären Expressionsortes, könnten weiteren Aufschluss geben über die Existenz von Tumorstammzellen im Pankreaskarzinom.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adler, G, Seufferlein, T, Bischoff, SC, Brambs, H.-J., Feuerbach, S, Grabenbauer, G, Hahn, S, Heinemann, V, Hohenberger, W, Langrehr, JM, Lutz, MP, Micke, O, Neuhaus, H, Neuhaus, P, Oettle, H, Schlag, PM, Schmid, R, Schmiegel, W, Schlottmann, K, Werner, J, Wiedenmann, B, Kopp, I (2008) S3-Guideline "Exocrine Pancreatic Carcinoma" 2007. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 46, 449-482.
2. Ailles, LE, Weissman, IL (2007) Cancer stem cells in solid tumors. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 460-466.
3. Alanen, KA, Joensuu, H, Klemi, PJ, Nevalainen, TJ (1990) Clinical significance of nuclear DNA content in pancreatic carcinoma. *Journal of Pathology* 160, 313-320.
4. Al-Hajj, M, Clarke, MF (2004) Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 23, 7274-7282.
5. Allison, DC, Bose, KK, Hruban, RH, Piandosi, S, Dooley, WC, Boitnott, JK, Cameron, JL (1991) Pancreatic cancer cell DNA content correlates with long-term survival after pancreatoduodenectomy. *Annals of Surgery* 214, 648-656.
6. André, T, Hammel, P, Lacaine, F, Palazzo, L, Becouarn, Y, Mornex, F (2006) Cancer of the Pancreas. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 30, 2S75-2S80.
7. Atkin, NB, Kay R (1979) Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumours, based on 1465 cases. *British Journal of Cancer*, 210-21.
8. Auer, GU, Caspersson, TO, Wallgren, AS (1980) DNA content and survival in mammary carcinoma. *Analytical and Quantitative Cytology* 2, 161-165.
9. Baisch, H, Klöppel, G, Reinke, B (1990) DNA ploidy and the cell-cycle analysis in the pancreatic and ampullary carcinoma: flow cytometric study of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Virchows Archiv A Pathologische Anatomie* 417, 145-150.
10. Baeuerle, PA, Gires O (2007) EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *British*

## 7. Literaturverzeichnis

Journal of Cancer 96, 417-423.

11. Böcker, W, Denk, H, Heitz, PU, Moch, H, Höfler, G, Kreipe, H (Hrsg.) Pathologie, 5. Auflage, Kapitel 35, S. 680-683. Urban & Fischer, München, Jena, 2012.
12. Bose, KK, Allison, DC, Hruban, RH, Piantadosi, S, Zahurak, M, Dooley, WC, Lin, P, Cameron, JL (1993) A comparison of flow cytometric and absorption cytometric DNA values as prognostic indicators for pancreatic carcinoma. *Cancer* 71, 691-700.
13. Böttger, TC, Störkel, S, Wellek, S, Stöckle, M, Junginger, T (1994) Factors influencing survival after resection of pancreatic cancer. *Cancer* 73, 63-73.
14. Calabrese, P, Tavaré, S, Shibata, D (2004) Pretumor progression – clonal evolution of human stem cell populations. *American Journal of Pathology* 164, 1337-1346.
15. Campbell, LL, Polyak, K (2007) Breast tumor heterogeneity - cancer stem cells or clonal evolution. *Cell Cycle* 6, 2332-2338.
16. Castella, EM, Ariza, A, Ojanguren, I, Mate, JL, Roca, X, Fernandez-Vasalo, A, Navas-Palacios, JJ (1996) Differential expression of CD44v6 in adenocarcinoma of the pancreas: an immunohistochemical study. *Virchows Archiv* 429, 1991-195.
17. Cirulli, V, Crisa, L, Beattie, GM, Mally, MI, Lopez, AD, Fannon, A, Ptasznik, A, Inverardi, L, Ricordi, C, Deerinck, T, Ellisman, M, Reisfeld, RA, Hayek, A (1998) KSA antigen Ep-CAM mediates cell–cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *The Journal of Cell Biology* 140, 1519–1534.
18. Clarke, MF, Dick, JE, Dirks, PB, Eaves, CJ, Jamieson, CHM, Jones, DL, Visvader, J, Weissman, IL, Wahl, GM (2006) Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Research* 66, 9339-9344.
19. Dean, M, Fojo, T, Bates, S (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews* 5, 275-284.
20. Duesberg, P (2007) Das Chaos in den Chromosomen. *Spektrum der Wissenschaft*, Oktober 2007, 55-64.

## 7. Literaturverzeichnis

21. Eskelinen M, Lipponen P, Marin S, Haapasalo H, Makinen K, Puitinen J, Alhava E, Nordling S (1992) DNA ploidy, S-phase fraction, and G2 fraction as prognostic determinants in human pancreatic cancer. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 27, 39-43.
22. Eskelinen, M, Lipponen, P, Collan, Y, Marin, S, Alhava, E, Nordling, S (1991) Relationship between DNA ploidy and survival in patients with exocrine pancreatic cancer. *Pancreas* 6, 90-95.
23. Eurostat 2013: [http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/statistics/search\\_database](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/statistics/search_database) (Tag des Zugriffs: 25.01.2013).
24. Fargeas, CA, Corbeil, D, Huttner, WB (2003) AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature. *Stem Cells* 21, 506-508.
25. Fargeas, CA, Karbanová, J, Jászai, J, Corbeil, D (2011) CD133 and membrane microdomains: Old facets for future hypotheses. *World Journal of Gastroenterology* 17, 4149-4152.
26. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 15/01/2013.
27. Florek, M, Haase, M, Marzesco, A-M, Freund, D, Ehninger, G, Huttner, WB, Corbeil, D (2005) Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell and Tissue Research* 319, 15–26.
28. Frankfurt, OS, Slocum, HK, Rustum, YM, Arbuck, SG, Pavelic, ZP, Petrelli, N, Huben, RP, Pontes, EJ, Greco, WR (1984) Flow cytometric analysis of DNA aneuploidy in primary and metastatic human solid tumors. *Cytometry* 5, 71-80.
29. Gotoda, T, Matsumura, Y, Kondo, H, Saitoh, D, Shimada, Y, Kosuge, T, Kanai, Y, Kakizoe, T (1998) Expression of CD44 variants and its association with survival in pancreatic cancer. *Japanese Journal of Cancer Research* 89, 1033-1040.

## 7. Literaturverzeichnis

30. Gräntzdörffer, I, Carl-McGrath, S, Ebert, MP, Röcken, C (2008) Proteomics of pancreatic cancer. *Pancreas* 36, 329-336.
31. Grosse-Gehling, P, Fargeas, CA, Dittfeld, C, Garbe, Y, Alison, MR, Corbeil, D, Kunz-Schughart, LA (2013) CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *Journal of Pathology* 229, 355-378.
32. Gourgou-Bourgade, S, Bascoul-Mollevis, C, Desseigne, F, Ychou, M, Bouché, O, Guimbaud, R, Bécouarn, Y, Adenis, A, Raoul, J-L, Boige, V, Bérille, J, Conroy, T (2013) Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* 31, 23-29.
33. Guerra, C, Schumacher, AJ, Canamero, M, Grippo, PJ, Verdaguer, L, Perez-Gallego, L, Dubus, P, Sandgren, EP, Barbacid, M (2007) Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 11, 291-302.
34. Harada, T, Okita, K, Shiraishi, K, Kusano, N, Kondoh, S, Sasaki, K (2002) Interglandular cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization in pancreatic cancer. *Cancer Research* 62, 835-839.
35. Helm, JF, Centeno, BA, Coppola, D, Druta, M, Park, JY, Chen, D-T, Hodul, PJ, Kvols, LK, Yeatman, TJ, Carey, LC, Karl, RC, Malafa, MP (2008) Outcomes following resection of pancreatic adenocarcinoma: 20-year experience at a single institution. *Cancer Control* 15, 288-294.
36. Hermann, PC, Huber, SL, Herrler, T, Aicher, A, Ellwart, JW, Guba, M, Bruns, CJ, Heeschen, C (2007) Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1, 313-323.
37. Hermann, PC: Distinkte Populationen von Tumorstammzellen determinieren das Tumorstadium und die metastatische Aktivität im humanen Pankreaskarzinom. *Med. Diss. München*, 2009.

## 7. Literaturverzeichnis

38. Hermansen, SK, Christensen, KG, Jensen, SS, Kristensen, BW (2011) Inconsistent immunohistochemical expression patterns of four different CD133 antibody clones in glioblastoma. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59, 391-407.
39. Herrera , MF, van Heerden, JA, Katzmann, JA, Weiland, LH, Nagorney, DM, Ilstrup, D (1992) Evaluation of DNA nuclear pattern as a prognostic determinant in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Annals of Surgery* 215, 120-124.
40. Hezel, AF, Kimmelman, AC, Stanger, BZ, Bardeesy, N, DePinho, RA (2006) Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development* 20, 1218-1249.
41. Holland, AJ, Cleveland, DW (2009) Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature Reviews* 10, 478-487.
42. Hong, SP, Wen, J, Bang, S, Park, S, Song, SY (2009) CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *International Journal of Cancer* 125, 2323-2331.
43. Hong, X, Michalski, CW, Kong, B, Zhang, W, Raggi, MC, Sauliunaite, D, De Oliveira, T, Friess, H, Kleeff, J (2010) ALCAM is associated with chemoresistance and tumor cell adhesion in pancreatic cancer. *Journal of Surgical Oncology* 101, 564-569.
44. Hong, S-M, Heaphy, CM, Shi, Cj, Eo, S-H, Cho, HJ, Meeker, AK, Eshleman, JR, Hruban, RH, Goggins, M (2011) Telomeres are shortened in acinar-to-ductal metaplasia lesions associated with pancreatic intraepithelial neoplasia but not in isolated acinar-to-ductal metaplasias. *Modern Pathology* 24, 256-266.
45. Hruban, RH, Maitra, A, Goggins, M (2008) Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 1, 306-316.
46. Huang, P, Wang, C-Y, Gou, S-M, Wu, H-S, Liu, T, Xiong, J-X (2008) Isolation and biological analysis of tumor stem cells from pancreatic adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 14, 3903-3907.
47. Immervoll, H, Hoem, D, Sakariassen, PÖ, Steffensen, OJ, Molven, A (2008)

## 7. Literaturverzeichnis

- Expression of the „stem cell marker“ CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. *BioMed Central Cancer* 8, 48.
48. Immervoll, H, Hoem, D, Steffensen, OJ, Miletic, H, Molven, A (2011) Visualization of CD44 and CD133 in normal pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas: non-overlapping membrane expression in cell populations positive for both markers. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59: 441-455.
  49. Ischenko, I, Seeliger, H, Kleespies, A, Angele, MK, Eichhorn, ME, Jauch, K-W, Bruns, CJ (2010) Pancreatic cancer stem cells: new understanding of tumorigenesis, clinical implications. *Langenbeck's Archives of Surgery* 395, 1-10.
  50. Jaszai, J, Fargeas, CA, Florek, M, Huttner, WB, Corbeil, D (2007) Focus on Molecules: Prominin-1 (CD133). *Experimental Eye Research* 85, 585-586.
  51. Johnston, MD, Maini, PK, Chapman, SJ, Edwards, CM, Bodmer, WF (2010) On the proportion of cancer stem cells in a tumour. *Journal of Theoretical Biology* 266, 708-711.
  52. Kahlert, C, Weber, H, Mogler, C, Bergmann, F, Schirmacher, P, Kenngott, HG, Matteredne, U, Mollberg, N, Rahbari, NN, Hinz, U, Koch, M, Aigner, M, Weitz, J (2009) Increased expression of ALCAM/CD166 in pancreatic cancer is an independent prognostic marker for poor survival and early tumour relapse. *British Journal of Cancer* 101, 457-464.
  53. Kemper, K, Sprick, MR, de Bree, M, Scopelliti, A, Vermeulen, L, Hoek, M, Zeilstra, J, Pals, ST, Mehmet, H, Stassi, G, Medema, JP (2010) The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Research* 70, 719-729.
  54. Klapman, J, Malafa, MP (2008) Early detection of pancreatic cancer: why, who, and how to screen. *Cancer Control* 15, 280-287.
  55. Krebs in Deutschland 2007/2008. Häufigkeiten und Trends. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.). Berlin, 2012.
  56. Lapidot, T, Sirard, C, Vormoor, J, Murdoch, B, Hoang, T, Caceres-Cortes, J, Minden,

## 7. Literaturverzeichnis

- M, Paterson, B, Caligiuri, MA, Dick, JE (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.
57. Lardon, J, Corbeil, D, Huttner, WB, Ling, Z, Bouwens, L (2008) Stem cell marker prominin-1/AC133 is expressed in duct cells of the adult human pancreas. *Pancreas* 36, e1-e6.
58. Lee, CJ, Dosch, J, Simeone, DM (2008) Pancreatic cancer stem cells. *Journal of Clinical Oncology* 26: 2806-2812.
59. Lee, MX, Saif, MW (2009) Screening for early pancreatic ductal adenocarcinoma: an urgent call! *Journal of the Pancreas* 20, 104-108.
60. Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., Simeone, D.M. (2007) Identification of the pancreatic cancer stem cell. *Cancer Research* 67: 1030-1037.
61. Li, J, Saif, MW (2009) Any Progress in the management of advanced pancreatic cancer? *Journal of the Pancreas (Online)* 10: 361-365.
62. Linder, S, Falkmer, U, Hagmar, T, Blåsjö, M, Sundelin, P, von Rosen, A (1994) Prognostic significance of DNA ploidy in pancreatic carcinoma. *Pancreas* 9, 764-772.
63. Loos, M, Friess, H, Kleeff, J (2009) Chirurgie maligner Pankreastumoren. *Radiologe* 49:137-143.
64. Lou, W, Krill, D, Dhir, R, Becich, MJ, Dong, J-T, Frierson, HF, Isaacs, WB, Isaacs, JT, Gao, AC (1999) Methylation of the CD44 metastasis suppressor gene in human prostate cancer. *Cancer Research* 59, 2329-2331.
65. Lüllmann-Rauch, R (2006) *Histologie*, 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
66. Maeda, S, Shinchi, H, Kurahara, H, Mataka, Y, Maemura, K, Sato, M, Natsugoe, S, Aikou, T, Takao, S (2008) CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 98, 1389-1397.

## 7. Literaturverzeichnis

67. Maeda, S, Qiang, D, Shinchi, H, Kurahara, H, Mataka, Y, Maemura, K, Natsugoe, S, Takao, S (2009) CD44 and CD133 expressions in primary tumor cells correlate to survival of pancreatic cancer patients. *The Open Surgical Oncology Journal* 1, 1-7.
68. Maitra, A, Fukushima, N, Takaori, K, Hruban, RH (2005) Precursors to invasive cancer. *Advances in Anatomic Pathology* 12, 81-91.
69. Maitra, A, Hruban, RH (2008) Pancreatic Cancer. *Annual Review of Pathology* 3, 157-188.
70. Marhaba, R, Zöller, M (2004) CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *Journal of Molecular Histology* 35: 211–231.
71. Miraglia, S, Godfrey, W, Yin, AH, Atkins, K, Warnke, R, Holden, JT, Bray, RA, Waller, EK, Buck, DW (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: Isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90, 5013-5021.
72. Momburg, F, Moldenhauer, G, Hämmerling, GJ, Möller, P (1987) Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in Normal and Malignant Tissues. *Cancer Research* 47, 2883-2891.
73. Moore, MJ, Goldstein, D, Hamm, J, Figer, Hecht, JR, Gallinger, S, Au, HJ, Murawa, P, Walde, D, Wolff, RA, Campos, D, Lim, R, Ding, K, Clark, G, Voskoglou-Nomikos, T, Ptasynski, M, Parulekar, W (2007) Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1960-1966.
74. Murtaugh, LC, Leach, SD (2007) A case of mistaken identity? Nonductal origins of pancreatic “ductal” cancers. *Cancer Cell* 11, 2011-213.
75. Naor, D, Nedvetzki, S, Golan, I, Melnik, L, Faitelson, Y (2002) CD44 in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 39(6):527–579.

## 7. Literaturverzeichnis

76. Naor, D, Wallach-Dayana, SB, Zahalka, MA, Sionov, RV (2008) Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Seminars in Cancer Biology* 18, 260-267.
77. Neoptolemos, JP, Stocken, DD, Bassi, C, Ghaneh, P, Cunningham, D, Goldstein, D, Padbury, R, Moore, MJ, Gallinger, S, Mariette, C, Wente, MN, Izbicki, JR, Friess, H, Lerch, MM, Dervenis, C, Oláh, A, Butturini, G, Doi, R, Lind, PA, Smith, D, Valle, JW, Palmer, DH, Buckels, JA, Thompson, J, McKay, CJ, Rawcliffe, CL, Büchler, MW; European Study Group for Pancreatic Cancer (2010) Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association* 304, 1073-1081.
78. Nowell, PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
79. Olempska, M, Eisenach, PA, Ammerpohl, O, Ungefroren, H, Fandrich, F, Kalthoff, H (2007) Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 6, 92-97.
80. Ofori-Acquah, SF, King, JA (2008) Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. *Translational Research* 1513, 122-128.
81. Omary, MB, Lugea, A, Lowe, AW, Pandol, SJ (2007) The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 117, 50-59.
82. Ottenhof, NA, de Wilde, RF, Maitra, A, Hruban, RH, Offerhaus, GJA (2011) Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathology Research International* 2011, 1-16.
83. Patriarca, C, Macchi, RM, Marschner, AK, Mellstedt, H. (2012) Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treatment Reviews* 38, 68-75.
84. Ponta, H, Sherman, L, Herrlich, PA (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews – Molecular Cell Biology* 4, 33-45.

## 7. Literaturverzeichnis

85. Porschen, R, Remy, U, Bevers, G, Schauseil, S, Hengels, K-J, Borchard, F (1993) Prognostic significance of DNA ploidy in adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer* 71, 3846-3850.
86. Rall, CJN, Rustgi, AK (1995) CD44 isoform expression in primary and metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Research* 55, 1831-1835.
87. Reya, T, Morrison, SJ, Clarke, MF, Weissman, IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
88. Rugge, M, Sonogo, F, Sessa, F, Leandro, G, Capella, C, Sperti, C, Pasquali, C, Di Mario, F, Pedralozzi, S, Ninfo, V (1996) Nuclear DNA content and pathology in radically treated pancreatic carcinoma. *Cancer* 77, 459-466.
89. Seufferlein, T, Porzner, M, Becker, T, Budach, V, Ceyhan, G, Esposito, L, Fietkau, R, Follmann, M, Friess, H, Galle, P, Geißler, M, Glanemann, M, Gress, T, Heinemann, V, Hohenberger, W, Hopt, U, Izbicki, J, Klar, E, Kleeff, J, Kopp, I, Kullmann, F, Langer, T, Langrehr, J, Lerch, M, Lühr, M, Lüttges, J, Lutz, M, Mayerle, J, Michl, P, Möller, P, Molls, M, Münter, M, Nothacker, M, Oettle, H, Post, S, Reinacher-Schick, A, Röcken, C, Roeb, E, Saeger, H, Schmid, R, Schmiegel, W, Schoenberg, M, Siveke, J, Stuschke, M, Tannapfel, A, Uhl, W, Unverzagt, S, van Oorschot, B, Vashist, Y, Werner, J, Yekebas, E (2013) S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 51, 1395-1440.
90. Shipitsin, M, Polyak, K (2008) The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Laboratory Investigation* 88, 459-463.
91. Simeone, DM (2008) Pancreatic Cancer stem cells: implications for the treatment of pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* 14, 5646-5648.
92. Sneath, RJS, Mangham, DC (1998) The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Molecular Pathology* 51, 191-200.
93. Sobin, LH, Gospodarowicz, MK, Wittekind, C (Hrsg.) TNM classification of malignant tumours, 7<sup>th</sup> edition. Wiley-Blackwell, 2009.
94. Spillane, JB, Henderson, MA (2007) Cancer stem cells: a review. *ANZ Journal of Surgery* 77, 464-468.

## 7. Literaturverzeichnis

95. Stanger, BZ, Dor, Y (2006) Dissecting the cellular origins of pancreatic cancer. *Cell Cycle* 5, 43-46.
96. Swart, GWM (2002) Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *European Journal of Cell Biology* 81, 313 – 321.
97. Tachezy, M, Zander, H, Marx, AH, Stahl, PR, Gebauer, F, Izbicki, IR, Bockhorn, M (2012) ALCAM (CD166) Expression and serum levels in pancreatic cancer. *PLoS ONE* 7(6): e39018. doi:10.1371/journal.pone.0039018.
98. Tang, C, Ang, BT, Pervaiz, S (2007) Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *The FASEB Journal* 21, 3777-3785. *Nature* 367, 645-648.
99. Thomas, C (Hrsg.) *Allgemeine Pathologie*. 3. Auflage. Schattauer, Stuttgart, New York, 2002.
100. Trumpp, A, Wiestler, OD (2008) Mechanisms of disease: cancer stem cells - targeting the evil twin. *Nature Clinical Practice - Oncology*, 337-347.
101. Trzpis, M, McLaughlin, PMJ, de Leij, LMFH, Harmsen, MC (2007) Epithelial cell adhesion molecule - more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *The American Journal of Pathology* 171, 386-395.
102. Tsavaris, N, Kavantzias, N, Tsigritis, K, Xynos, ID, Papadoniou, N, Lazaris, A, Kosmas, C, Agrogiannis, G, Dokou, A, Felekouras, E, Antoniou, E, Polyzos, A, Sarantonis, J, Tsiaras, H, Karatzas, G, Papalambros, A, Patsouris, ES (2009) Evaluation of DNA ploidy in relation with established prognostic factors in patients with locally advanced (unresectable) or metastatic pancreatic adenocarcinoma: a retrospective analysis. *BMC Cancer* 9, 1-11.
103. Tysnes, BB, Bjerkvig, R (2007) Cancer initiation and progression: Involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta* 1775, 283-297.
104. Visvader, JE, Lindeman, GJ (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews - Cancer* 8, 755-768.
105. Von Hoff, DD, Ervin, T, Arena, FP, Chiorean, EG, Infante, J, Moore, M, Seay, T,

## 7. Literaturverzeichnis

- Tjulandin, SA, Ma, WW, Saleh, MN, Harris, M, Reni, M, Dowden, S, Laheru, D, Bahary, N, Ramanathan, RK, Tabernero, J, Hidalgo, M, Goldstein, D, Van Cutsem, E, Wei, X, Iglesias, J, Renschler, M (2013) Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England Journal of Medicine* 369, 1691-1703.
- 106.** Weger, A-R, Graf, A-H, Askenstein, U, Schwab, G, Bodner, E, Auer, G, Mikuz, G (1987) Ploidy as prognostic determinant in pancreatic cancer. *Lancet* 31, 1031.
- 107.** Weger, AR, Glaser, KS, Schwab, G, Oefner, D, Bodner, E, Auer, GU, Mikuz., G (1991) Quantitative nuclear DNA content in fine needle aspirates of pancreatic cancer. *Gut* 32, 325-328.
- 108.** Weigmann, A, Corbeil, D, Hellwig, A, Huttner, WB (1997) Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 12425–12430.
- 109.** Welsch, T, Keleg, S, Bergmann, F, Degrade, L, Bauer, S, Schmidt, J (2009) Comparative analysis of tumorbiology and CD133 positivity in primary and recurrent pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical and Experimental Metastasis* 26, 701-711.
- 110.** Went, PT, Lugli, A, Meier, S, Bundi, M, Mirlacher, M, Sauter, G, Dirnhofer, S (2004) Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Human Pathology* 35, 122-128.
- 111.** Wong, T, Howes, N, Threadgold, J, Smart, HL, Lombard, MG, Gilmore, I, Sutton, R, Greenhalf, W, Ellis, I, Neoptolemos, JP (2001) Molecular diagnosis of early pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk patients. *Pancreatology* 1:486-509.
- 112.** Wong, CW, Dye, DE, Coombe, DR (2012) The Role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *International Journal of Cell Biology* 2012, Article ID 340296, 9 pages.

## 7. Literaturverzeichnis

113. Yalniz, M, Pour, PM (2005) Are there any stem cells in the pancreas? *Pancreas* 31, 108-118.
114. Yao, J, Cai, H-H, Wei, J-S, An, Y, Ji, Z-L, Lu, Z-P, Wu, J-L, Chen, P, Jiang, K-R, Dai, C-C, Qian, Z-Y, Xu, Z-K, Miao, Y (2010) Side population in the pancreatic cancer lines SW1990 and CFPAC-1 is enriched with cancer stem-like cells. *Oncology Reports* 23, 1375-1382.
115. Yeo, CJ, Cameron, JL, Lillernoe, KD, Sitzmann, JV, Hruban, RH, Goodman, SN, Dooley, WC, Coleman, J, Pitt, HA (1995) Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. *Annals of Surgery* 221, 721-733.
116. Yoshimura, T, Manabe, T, Imamura, T, Imanishi, K, Ohshio, G, Yamabe, H, Kitamura, O, Matsumoto, M, Ogasahara, K, Takasan, H, Tobe, T (1992) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content of duct cell carcinoma of the pancreas. *Cancer* 70, 1069-1074.
117. Zeppernick, F, Ahmadi, R, Campos, B, Dictus, C, Helmke, BM, Becker, N, Lichter, P, Unterberg, A, Radlwimmer, B, Herold-Mende, CC (2008) Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clinical Cancer Research* 14, 123-129.
118. Zhou, J, Wang, C-Y, Liu, T, Wu, B, Zhou, F, Xiong, J-X, Wu, H-S, Tao, J, Zhao, G, Yang, M, Gou, S-M (2008) Persistence of side population cells with high drug efflux capacity in pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* 14, 925-930.
119. Zhou, J, Zhang, Y (2008) Cancer stem cells. *Cell Cycle* 7, 1360-1370.

## 8. Anhang

### 8.1 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1.** Klassifikation und Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms  
a) TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms  
b) UICC-Stadien des Pankeaskarzinoms
- Tab. 2.** Am Pankreaskarzinom getestete Tumorstammzellmarker  
a) An Gewebeschnitten von Pankreaskarzinomen getestete Stammzellmarker  
b) An Pankreaskarzinom-Zelllinien getestete Stammzellmarker
- Tab. 3.** Geschlecht, Alter und Überlebenszeit des Patientenkollektivs
- Tab. 4.** Klinische Details des Patientenkollektivs mit Diagnose Pankreaskarzinom
- Tab. 5.** Aufstellung der verwendeten Antikörper  
a) Primärantikörper gegen Stammzellmarker  
b) Sekundärantikörper
- Tab. 6.** CD44-Expression in Karzinom- und Normalgewebe des exokrinen Pankreas
- Tab. 7.** CD133 Expression in Karzinom- und Normalgewebe des exokrinen Pankreas
- Tab. 8.** CD166 Expression in Karzinom- und Normalgewebe des exokrinen Pankreas
- Tab. 9.** CD326 Expression in Karzinom- und Normalgewebe des exokrinen Pankreas
- Tab. 10.** Korrelation zwischen CD44-Expression und distanter Metastasierung
- Tab. 11.** Beziehungen zwischen Tumorstammzellmarker-Expression und Tumorstadium nach UICC
- Tab. 12.** Beziehung zwischen der Ploidie der Tumoren und der Überlebenszeit der Patienten
- Tab. 13.** Beziehung zwischen Ploidie und Differenzierungsgrad der Tumoren
- Tab. 14.** Beziehung zwischen Ploidie und Marker-Expression der Tumoren
- Tab. 15.** Klone von CD133-Antikörpern, die in verschiedenen Studien (siehe Tab. 16)

## 8. Anhang

bisher an Pankreasgewebe getestet wurden

**Tab. 16.** Ergebnisse verschiedener CD133-Antikörper im Pankreasgewebe

**Tab. 17.** Publikationen zur Ploidie im Pankreaskarzinom

a) Ergebnisse mit Feulgen-Densitometrie oder Laser scanning cytometry  
(Harada et al. 2002)

b) Mittels Durchflusszytometrie gemessene Ploidie

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

**Abb. 1.** Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus der vier unterscheidbaren Stufen der PanIN als häufigste Vorstufe des PDAK

**Abb. 2.** Mortalität durch Tumoren insgesamt im Vergleich zur Mortalität durch Pankreastumoren in Deutschland und den Ländern der derzeitigen EU (Eurostat 2013)

**Abb. 3.** Schematische Darstellung der beiden Modelle der Tumorentstehung

**Abb. 4.** Schematische Darstellung der Peroxidase-Methode

**Abb. 5.** Die vier DNA-zytometrischen Histogrammtypen nach Auer (1980)

**Abb. 6** CD44-Expression in nicht-neoplastischem Pankreasgewebe

**Abb. 7.** CD44-Expression im Pankreaskarzinom

**Abb. 8.** CD44-Expression in Tumor- und Normalgewebe

**Abb. 9** CD133-Expression in nicht-neoplastischem Pankreasgewebe

**Abb. 10.** CD133-Expression im Pankreaskarzinom

**Abb. 11.** CD133-Expression in Tumor- und Normalgewebe

**Abb. 12** CD166-Expression in nicht-neoplastischem Pankreasgewebe

**Abb. 13.** CD166-Expression im Pankreaskarzinom

**Abb. 14.** CD326-Expression in nicht-neoplastischem Pankreasgewebe

8. Anhang

**Abb. 15.** CD326-Expression im Pankreaskarzinom

**Abb. 16.** Korrelation zwischen Marker-Expression und Tumorstadium nach UICC

**Abb. 17.** Beziehung zwischen der Ploidie der Tumoren und der Überlebenszeit der Patienten

**Abb. 18.** Beziehung zwischen Ploidie und Differenzierungsgrad der Tumoren

**Abb. 19.** Beziehung zwischen Ploidie und CD44-Expression der Tumoren

## 8.3 Kurzprotokolle der Färbungen

### 8.3.1 Entparaffinierung

#### 1. Lösungen

Xylol, Ethanol (100%, 96%, 70%), deionisiertes Wasser (Millipore)

#### 2. Entparaffinierung

- |                       |  |        |         |
|-----------------------|--|--------|---------|
| a) Entparaffinierung: | Waschen der Objektträger in Xylol                | 3 x 10 | Minute  |
| b) Rehydrierung:      | 1. Waschen der Objektträger in 100% Ethanol      | 2 x 3  | Minuten |
|                       | 2. Waschen der Objektträger in 96% Ethanol       | 2 x 3  | Minuten |
|                       | 3. Waschen der Objektträger in 70% Ethanol       | 1 x 3  | Minuten |
| c) Spülen:            | Waschen der Objektträger in deionisiertem Wasser | 3 x 3  | Minuten |

### 8.3.2 Immunhistochemische Färbung – CD44/CD166/CD133

#### 1. Lösungen:

- deionisiertes Wasser (Millipore), Hämatoxylin
- Antikörper-Demaskierungslösung: 0,01 M Natriumcitratpuffer pH 6,0
- Waschpuffer (TRIS)
- Verdünnungslösung für Antikörper: Dako Antikörper-Verdünnung mit Hintergrund reduzierenden Komponenten
- 3%ige Wasserstoffperoxid-Lösung (angesetzt aus 30%iger Wasserstoffperoxid-Lösung)
- Blockierungslösung: Dako Protein Block Serum-Free Ready-to-Use
- Sekundärantikörper: DakoCytomation EnVision + System labelled Poly-HRP  
(CD44: Anti-Mouse, CD133: Anti-Rabbit, CD166: Anti-Mouse)
- Substratlösung: DakoCytomation AEC Substrate Chromogen Ready-to-Use
- Aquatex

## 8. Anhang

### 2. Antigendemaskierung:

1. Objektträger in Citratpuffer in Mikrowelle bei 900 Watt 5 Minuten lang erhitzen
2. 2 x 7 Minuten bei 360 Watt in der Mikrowelle inkubieren (nicht kochen lassen)
3. Abkühlen lassen auf Raumtemperatur (RT)

### 3. Färbung

Sämtliche Schritte der Färbung finden in einer feuchten Kammer statt, deren Boden mit getränktem Filterpapier bedeckt ist.

- a) Waschen der Objektträger mit deionisiertem Wasser im Schüttelbad 3 x 3 Minuten
- b) Markieren der Präparateabschnitte auf Objektträgern
- c) Überdecken der Präparateabschnitte mit 200 µL 3%igem Wasserstoffperoxid, Inkubation für 10 Minuten bei RT
- d) Waschen der Objektträger mit TBS im Schüttelbad 3 x 3 Minuten
- e) Überdecken der Präparateabschnitte mit Blockierungslösung, Inkubation für 20 Minuten bei RT
- f) Abgießen der Blockierungslösung und Zugabe von 200 µL verdünnter Primärantikörperlösung (CD44 1:50, CD133 1:10, CD166 1:60, CD326 1:100), Inkubation bei 4°C über Nacht
- g) Waschen der Objektträger in TBS im Schüttelbad 3 x 5 Minuten
- h) Zugabe von Sekundärantikörperlösung auf Präparateabschnitte, Inkubation für 30 Minuten bei RT
- i) Abgießen der Lösung und Waschen der Objektträger mit TBS im Schüttelbad 3 x 5 Minuten
- j) Zugabe von Substratlösung auf Präparateabschnitte, Inkubation für 15 Minuten bei RT unter Lichtausschluss
- k) Waschen der Objektträger unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten
- l) Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 1 Minute
- m) Waschen der Objektträger unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten
- n) Eindecken mit Aquatex und Deckgläsern (Größe 24 x 40 mm)
- o) über Nacht trocknen lassen

## 8. Anhang

### 8.3.3 Immunhistochemische Färbung – CD326

#### 1. Lösungen:

- a) deionisiertes Wasser (Millipore), Hämatoxylin
- b) Antikörper-Demaskierungslösung: Dako Target Retrieval Solution
- c) Waschpuffer (TBS)
- d) Verdünnungslösung für Antikörper: Dako Antikörper-Verdünnung mit Hintergrundreduzierenden Komponenten
- e) Dako Peroxidase-Blocking-Lösung
- f) Blockierungslösung: Dako Protein Block Serum-Free Ready-to-Use
- g) Sekundärantikörper: DakoCytomation EnVision + System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse
- h) Substratlösung: DakoCytomation AEC Substrate Chromogen Ready-to-Use

#### 2. Antigendemaskierung:

- a) Objektträger in Gefäß mit Retrieval Solution stellen, 20 Minuten (4 x 5 min) bei 900 Watt in der Mikrowelle aufkochen lassen
- b) Abkühlen lassen auf Raumtemperatur (RT)

#### 3. Färbung:

Sämtliche Schritte der Färbung finden in einer feuchten Kammer statt, deren Boden mit getränktem Filterpapier bedeckt ist.

- a) Waschen der Objektträger in TBS 3 x 3 Minuten
- b) Markieren der Präparatabschnitte auf den Objektträgern
- c) Inkubieren der Objektträger mit DAKO Peroxidase Blocking für 10 Minuten bei RT
- d) Waschen der Objektträger in Küvette mit TBS 3 x 3 Minuten
- e) Zugabe von Blockierungslösung auf die Objektträger (Objektträger vollständig benetzen) – Inkubation für 10 Minuten bei RT
- f) Entfernen der Blockierungslösung und Zugabe von 200 µL verdünnter Primärantikörperlösung (1:100) - Inkubation über Nacht bei 4°C in feuchter Kammer oder 1h bei RT
- g) Waschen der Objektträger in Küvette mit TBS 3 x 3 Minuten

## 8. Anhang

- h) Zugabe von Sekundärantikörperlösung auf die Objektträger (Objektträger vollständig benetzen) – Inkubation für 30 Minuten bei RT
- i) Entfernen der Sekundärantikörperlösung und Waschen der Objektträger in Küvette mit TBS 3 x 3 Minuten
- j) Inkubation der Objektträger mit Substratlösung AEC Substrat Chromogen für 5-15 Minuten bei RT unter Lichtausschluss
- k) Waschen der Objektträger unter fließendem Wasser 5(-10) Minuten
- l) Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 3-5 Minuten (möglicherweise länger)
- m) Waschen der Objektträger unter fließendem Wasser 5(-10) Minuten
- n) Eindecken mit Aquatex und Deckgläsern (Größe 24 x 40 mm)
- o) Über Nacht trocknen lassen

### 8.3.4 Feulgen-Färbung

Pararosanilin ist eine stark kanzerogene Substanz! Direkten Kontakt meiden!

#### 1. Tag: Ansetzen des „Schiff's Reagenz“

- a) 150 mL 1M HCl (Raumtemperatur) in eine 2 Liter-Flasche mit dunklem Glas füllen, dazu 5g Pararosanilin (Basic Fuchsin, Aldrich, 85, 734-4) geben und die Flasche leicht schütteln, bis das Pulver gelöst ist
- b) Eine Lösung aus 5 g Kaliumdisulfit ( $K_2S_2O_5$ ) und 850 mL deionisiertem Wasser herstellen und zu der Pararosanilinlösung geben, Flasche leicht schütteln
- c) Ist die Lösung rot gefärbt, Flasche in Aluminiumfolie einwickeln und im Dunkeln über Nacht stehen lassen

#### 2. Tag

- a) Aluminiumfolie entfernen, der angesetzten Lösung 3 g Aktivkohle zufügen und die Flasche mindestens 4 Minuten lang schütteln
- b) Die Lösung 2 x filtrieren, in 1 Liter-Flasche aus weißem Glas füllen
- c) Ist die Lösung rosafarben transparent, Flasche in Aluminiumfolie einwickeln und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahren

Die Lösung ist maximal bis zu 3 Tage nutzbar, bevor der Farbstoff ausfällt!

## 8. Anhang

- d) Paraffinschnitte vorbereiten
- e) Paraffinschnitte refixieren: über Nacht bei Raumtemperatur (RT) in 4,5% Formaldehyd

### 3. Tag: Feulgen-Färbung

- a) Spülen: Präparate vorsichtig in Leitungswasser spülen, bis Küvetten keinen Formaldehydgeruch mehr abgeben.
- b) saure Hydrolyse: in 5 M HCl für 60 Minuten bei RT
- c) Spülen: vorsichtig 3x in deionisiertem Wasser
- d) Schiff's Reagenz: Inkubation für 120 Minuten im Dunkeln (Aluminiumfolie) bei RT
- e) Spülen: vorsichtig mit Leitungswasser spülen, bis Spülflüssigkeit nicht mehr verfärbt
- f) Waschen: 3 x 10 Minuten in frisch angesetzter  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung
- g) Spülen: 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser
- h) Dehydratation: je 5 Minuten in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 95%, 95%, 100%, 100%)
- i) Reinigung, Eindeckung: aus Xylolbad heraus mit Entellan eindecken

## **9. Danksagung**

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Jens Habermann für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche und geduldige Betreuung sowie die besonders zu Beginn zahlreichen Gespräche zur Arbeit.

Herrn Prof. Christoph Thorns gilt mein Dank für die freundliche Unterstützung bei der Auswertung der immunhistochemischen Gewebeschnitte.

Frau Dr. Stefanie Bünger danke ich für die statistische Auswertung der Messergebnisse, fachliche Unterstützung und die immer wieder umwerfend zügige Durchsicht des Manuskripts und unzählige hilfreiche Anregungen dazu.

Allen Mitarbeitern des chirurgischen Labors des UKSH, Campus Lübeck, danke ich für die guten Arbeitsbedingungen und die freundliche Arbeitsatmosphäre sowie für Rat und ständige tatkräftige Hilfsbereitschaft. Insbesondere Frau Gisela Grosser-Pape danke ich außerdem für die umfangreiche praktische Hilfe bei der Arbeit im Labor.

Meinen Eltern und Schwestern danke ich für fortwährende Begleitung und liebevollen Beistand.

## 10. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name : Martin Barow  
Geburtsdatum : 24.10.1969  
Geburtsort : Delmenhorst  
Email-Adresse : martin.barow@rueckertstrasse5.de

### Ausbildung

Schulabschluss : Abitur im Juni 1989 in Neustadt am Rübenberge  
Biologiestudium : von Oktober 1991 bis Mai 1997 an der Universität Potsdam  
Abschluss : Diplom im Mai 1997  
Weiterbildung : Erwerb des Zertifikats „Fachkraft für Umweltschutz“ von Januar 1998 bis Januar 1999 in Burgdorf bei Hannover  
Promotion : im August 2003 am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben  
Titel der Dissertation : Beziehungen zwischen Genomgröße, Basenzusammensetzung und Endopolyploidie bei Samenpflanzen  
Postdoc : von November 2003 bis Januar 2004 am IPK Gatersleben  
von Februar 2004 bis Januar 2006 an der medizinischen Fakultät der University of Glasgow, Schottland  
Medizinstudium : Oktober 2006 bis November 2012 an der Universität zu Lübeck  
Approbation : November 2012

Halberstadt, 27.08.14

## **11. Hinweis zur Publikation von Daten aus dieser Arbeit**

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Bünger, S, **Barow, M**, Thorns, C, Freitag-Wolf, S, Danner, S, Tiede, S, Pries, R, Görg, S, Bruch, H-P, Roblick, UJ, Kruse, C, Habermann, JK (2012) Pancreatic carcinoma cell lines reflect frequency and variability of cancer stem cell markers in clinical tissue. *European Surgical Research* 49, 88–98.

## 11. Hinweis auf Publikationen