
Aus dem Institut für Pathologie
(Prof. Dr. med. H.-J. Radzun, Prof. Dr. med. P. Ströbel)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

***uPAR* und *c-MYC* beim duktalem
Adenokarzinom des Pankreas**

Die Suche nach einem Zusammenhang mittels FISH
zur Identifikation individueller Patientensubgruppen mit hohem Risiko

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Frieder Fuchs

aus

Köln

Göttingen 2018

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. med. P. Ströbel
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Peter Burfeind
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 22.08.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel

***uPAR* und *c-MYC* beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas** - Die Suche nach einem Zusammenhang mittels FISH zur Identifikation individueller Patientensubgruppen mit hohem Risiko

eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Der Urokinaserezeptor.....	1
1.1.1 Grundlagen.....	1
1.1.2 Strukturelle Aspekte.....	3
1.1.3 Funktionelle Aspekte.....	5
1.1.3.1 Der uPAR im System der Plasminregulation.....	5
1.1.3.2 Die Mechanismen des uPAR-Abbaus.....	7
1.1.3.3 Der uPAR und die Signaltransduktion.....	8
1.1.4 Zusammenfassung.....	13
1.2 Das <i>c-MYC</i> -Onkogen.....	14
1.2.1 Grundlagen.....	14
1.2.2 <i>c-MYC</i> beim Pankreaskarzinom	18
1.3 Hypothesen eines Zusammenhangs von MYC und uPAR	20
1.3.1 Aktueller Stand.....	21
1.3.2 Zusammenfassung.....	22
1.4 Das Duktale Adenokarzinom des Pankreas.....	22
1.4.1 Epidemiologische Fakten	23
1.4.2 Risikofaktoren	24
1.4.2.1 Erworbene Risikofaktoren.....	24
1.4.2.2 Hereditäre Risikofaktoren.....	25
1.4.3 Pathogenetische Aspekte.....	27
2 Material und Methoden	30
2.1 Patientenkollektiv	30
2.2 Untersuchungsmaterial.....	31
2.2.1 Formalin-Fixed Paraffin-Embedded-Tissue (FFPE).....	31
2.3 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	32
2.3.1 Prinzip	32
2.3.2 Sonden.....	33

2.3.2.1	<i>uPAR</i> -Sonde.....	33
2.3.2.2	<i>c-MYC</i> -Sonde	33
2.3.3	Durchführung.....	34
2.4	Immunhistochemische Diagnostik.....	38
2.4.1	Einführung.....	39
2.4.2	p53	39
2.4.3	p16	40
2.5	KRAS	41
2.5.1	Einführung	41
2.5.2	Durchführung.....	43
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Ergebnisse der FISH-Analyse	45
3.1.1	Auswertung.....	45
3.1.2	Ergebnis der <i>uPAR</i> -Sonde.....	47
3.1.3	Ergebnis der <i>c-MYC</i> -Sonde.....	48
3.2	Ergebnisse der Immunhistochemie.....	48
3.2.1	Auswertung.....	48
3.2.2	Ergebnisse p53.....	49
3.2.3	Ergebnisse p16.....	50
3.3	Ergebnisse der KRAS-Sequenzierung.....	51
3.4	Auswertung und Korrelation.....	52
3.4.1	<i>uPAR</i> und <i>c-MYC</i> im Zusammenhang	52
3.4.2	Genamplifikation in Korrelation mit dem krankheitsspezifischen Überleben.....	53
3.4.2.1	<i>uPAR</i> -Amplifikation	53
3.4.2.2	<i>c-MYC</i> -Amplifikation	54
3.4.3	Multivariate Auswertung und Zusammenfassung.....	54
4	Diskussion.....	56
4.1	Übersicht.....	56
4.2	Methodische Aspekte.....	56
4.2.1	FISH	56
4.3	Kritik der Ergebnisse und Abgleich mit anderen Studien	59
4.4	<i>uPAR</i> als therapeutisches Target	62
4.5	p16, p53 und KRAS.....	65
5	Zusammenfassung.....	66
6	Anhang	67
	- Originalprotokoll p53 und p16	
7	Literaturverzeichnis	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der EZM.....	2
Abbildung 2: Funktionelle Dimensionen des uPAR.....	13
Verwendung erfolgt durch Lizenzierung (Lizenznr: 3906391235649) des Georg Thieme Verlags	
Abbildung 3: Zentrales Dogma der Molekularbiologie.....	14
Abbildung 4: Zentrales Dogma der Molekularbiologie modifiziert.....	15
Abbildung 5: MYC als Transkriptionsfaktor.....	16
Abbildung 6: Invasive Tumorzellen eines duktales Adenokarzinoms.....	27
Abbildung 7: Beispiele pankreatischer intraepithelialer Neoplasien.....	28
Abbildung 8: <i>c-MYC</i> -amplifizierte Zellen a-c, Diagnoseveranschaulichung.....	38
Abbildung 9: Theoretisches Pyrogramm, Analyse KRAS, Qiagen Pyromark2.0.....	42
Abbildung 10: Zwei Pyrogramme des Kollektivs im Vergleich, Qiagen Pyromark2.0.....	44
Abbildung 11: FISH, mit Darstellung einer PanIN ohne Amplifikation.....	46
Abbildung 12: FISH, Patient mit Low-Level-Amplifikation von <i>c-MYC</i>	47
Abbildung 13: FISH, High-Level-Amplifikationen von uPAR.....	47
Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der <i>uPAR</i> -Amplifikationen im Kollektiv.....	48
Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der <i>c-MYC</i> -Amplifikationen im Kollektiv.....	48
Abbildung 16: p53-positive Tumorzellen.....	50
Abbildung 17: p53-negative Tumorzellen.....	50
Abbildung 18: p16-positive Tumorzellen.....	50
Abbildung 19: p16-negative Tumorzellen.....	51
Abbildung 20: KRAS-Mutationsverteilung im Kollektiv.....	51
Abbildung 21: KRAS-Mutationen Subspezifizierung.....	51
Abbildung 22: Amplifikationscharakteristika von <i>uPAR</i> und <i>c-MYC</i> im selben Tumor.....	52
Abbildung 23: Amplifikationen im <i>uPAR</i> -Gen im Zusammenhang mit dem Überleben.....	53
Abbildung 24: Amplifikationen im <i>c-MYC</i> -Gen im Zusammenhang mit dem Überleben.....	54
Abbildung 25: Multivariate statistische Auswertung, ausgesuchte Größen.....	55
Abbildung 26: Vergleich zweier Kollektive, <i>uPAR</i> -Amplifikation.....	60
Abbildung 27: Vergleich zweier Kollektive, <i>c-MYC</i> -Amplifikation.....	61
Abbildung 28: Schematische Darstellung des uPARs in Bezug auf die Pharmakotherapie.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemikalien und Geräte FISH.....	34
Tabelle 2:	Chemikalien und Geräte, immunhistochemische Routinediagnostik.....	38
Tabelle 3:	Chemikalien und Geräte, KRAS-Sequenzierung.....	43
Tabelle 4:	Mutationsraten beim Pankreaskarzinom.....	65

Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene
AGN	Average Gene Copy Number
ALK	Anaplastische Lymphom-Kinase
ATF	Amino-Terminales Fragment
ATP	Adenosin-Triphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BCR	Breakpoint Cluster Region
BCR-ABL	Fusionsgen aus BCR und ABL
BRCA1	Breast Cancer 1 Gen
BRCA2	Breast Cancer 2 Gen
CA19-9	Carbohydrat Antigen 19-9 oder Cancer Antigene 19-9
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p16
CEP	Centromeric Enumeration Probe
<i>c-MYC</i>	cellular Myelocytomatosis Oncogen
CNV	Copy Number Variation
CRM	Circumferential Resection Margin
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DSS	Desease-Specific Survival
eEF2K	Eukaryotische-Elongationsfaktor 2-Kinase
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	at alii
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FAMMMS	Familiäres Atypisches Muttermal-Melanom-Syndrom
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FOXM1c	Forkhead Box M1 Transkriptionsfaktor Isoform c
FPC	Familial Pancreatic Cancer
FPRL1	Formyl Peptide Receptor Like Typ 1
g	Gramm
GAG	Glycosaminoglycan
GDP	Guanosindiphosphat
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
GF	Growth Factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosin-Trisphosphat
HE	Hämatoxylin Eosin
HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HL	High Level (Amplification)

HNPCC	Hereditary Non-Polypoid Colorectal Cancer
IHC	Immunhistochemie
JAK	Januskinase
JAK1	Januskinase 1
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Oncogene
l	Liter
LL	Low Level Amplification
LSI	Locus Specific Identifier
LXA4R	Lipoxin A4 Rezeptor
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
Mac-1	Macrophage 1 Antigen
MAP	Mitogen Activated Protein (Kinase)
MMP	Matrix Metalloproteasen
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NP-40	Nonoxinol 40
OT	Objektträger
PAG	Proteoglycan
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1
PAI-2	Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 2
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PJS	Peutz-Jeghers-Syndrom
<i>PLAUR</i>	Gen des Plasminogen-Aktivators, Urokinase Rezeptors
pTNM	Primärtumor, Nodi lymphatici und Metastasen, histopathologische Klassifikation gemäß WHO 2010
Rac	Ras related C3 botulinum toxin substrat
Raf-MAP	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, Mitogen Activated Protein (Signalweg)
Ras	Rat Sarcoma (G-Protein)
Rb1	Retinoblastom Protein 1
Rho	Ras homologue (GTPase)
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
RTU	Ready to use
scuPA	single chain Urokinase Plasminogen Activator
SMAD	Small body size MAD Protein (Mothers Against Decapentaplegic)
SPC	Sporadic Pancreatic Cancer
Src	Sarcoma (Kinase)
SSC	Saline Sodium Citrat
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
suPAR	soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor
tcuPA	two chain Urokinase Plasminogen Activator
TFPDF	Three fingered protein domain fold oder Drei-Finger-Faltung
TGF- β	Transforming Growth Factor Typ beta
TNM	Tumor, Nodi Lymphatici und Metastasen, Klassifikation allgemein
tPA	Tissue Plasminogen Activator
UICC	International Union Against Cancer
UMG	Universitätsmedizin Göttingen

uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
uPAS	Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System
uPAR	Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor
<i>uPAR</i>	Gen des Urokinaserezeptors
USA	United States of America
WCP	Whole Chromosome Painting
WHO	World Healthy Organization
Wnt	wingless und Int-1

1 Einleitung

1.1 Der Urokinaserezeptor

1.1.1 Grundlagen

„Ein Gewebe ist ein Verband aus gleichartig differenzierten Zellen, die durch Interzellulärkontakte und Extrazellulärmatrix zusammengehalten werden.“

(Lüllmann-Rauch 2012, S.99)

Die obige Begriffsbestimmung vereinfacht die Einordnung des Urokinaserezeptors (*urokinase plasminogen activator receptor*, uPAR) in den vielschrittigen Prozess des Übergangs von gesundem Gewebe in eine komplexe Pathologie wie das Pankreaskarzinom. Grundsätzlich ist intaktes Gewebe durch einen ausgeglichenen Zellumsatz gekennzeichnet, es halten sich also Wachstum bzw. Vermehrung von Zellen und Zelltod die Waage (Rheem und Thompson 2000). Wenn man einen Tumor als eine unkontrollierte Vermehrung anormaler Körperzellen betrachtet, wird deutlich, dass Störungen der oben beschriebenen Wesenszüge des gesunden Gewebes die Folge sind.

Mit dem Begriff „differenziert“ meint man letztlich die geordnete Regulation der Gene einer Zelle, die dann in eine selektive Expression von Proteinen mündet. Die Loslösung von dieser Regulation ist ein zentrales Charakteristikum von Tumorzellen und mündet beispielsweise in deren autonomes Wachstum, wenn Gene dereguliert sind, die Prozesse des Zellwachstums oder Zellunterganges steuern. Wechselbeziehungen einer Zelle im Sinne von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten beeinflussen diese Regulation. Die Extrazelluläre Matrix (EZM) ist demnach nicht nur ein strukturgebendes Element, sondern für die Funktionen von Zellen von zentraler Bedeutung. Eine vereinfachte schematische Darstellung zur Einordnung der Begrifflichkeiten liefert Abbildung 1.

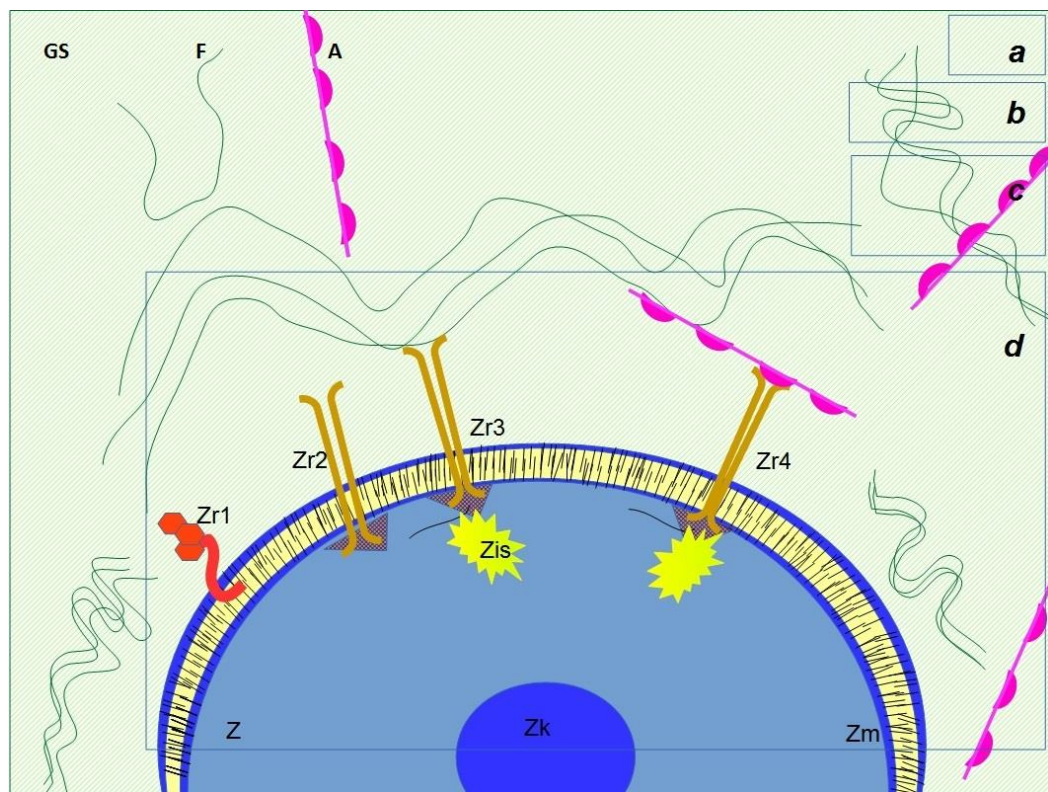


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Extrazellulären Matrix (EZM)

Quelle: Abbildung erstellt durch F. Fuchs (Darstellungsinhalte teilweise angelehnt an Gonias und Hu 2015, Creative Commons- Lizenz)

Schematische Darstellung der EZM mit Unterscheidung von vier Dimensionen (Kästen *a, b, c, d*) zur grundsätzlichen Einordnung des uPAR. Klassischerweise besteht die EZM vereinfacht aus drei Komponenten: Grundsubstanz [GS], Faserproteine [F] und Adhäsionsproteine [A]. Die Grundsubstanz ist ungeformt und besteht aus Molekülen, die Wasser in der EZM binden. Faserproteine sind die strukturgebende geformte Komponente. Adhäsionsproteine vernetzen die geformten und ungeformten Komponenten und ermöglichen über Adhäsionsrezeptoren der Zellen Zell-Matrix-Beziehungen

a - Grundsubstanz der EZM, insbesondere Glykosaminoglycane (GAG) und Proteoglycane (PAG); **b** - Grundsubstanz mit Faserproteinen, z. B. kollagene Fasern, elastische Fasern oder retikuläre Fasern; **c** - Grundsubstanz mit Adhäsionsprotein, z. B. Fibronectin, Laminin, Vitronectin; Adhäsionsproteine können mit Faserproteinen interagieren; **d** - Zell-Matrix-Beziehungen, eine Zelle [Z] mit Zellkern [Zk] und Zellmembran [Zm], sowie unterschiedlichen Zellrezeptoren [Zr1-4] und potentiellen EZM-Interaktionsmustern; [Zr1] als Rezeptor ohne intrazelluläre Domäne (z. B. uPAR) mit Bindungsstelle für extrazelluläre Moleküle; [Zr2] als inaktiver Transmembranrezeptor; [Zr3] als aktiver Transmembranrezeptor (z. B. Integrin) in Interaktion mit EZM-Faserproteinen und konsekutiv intrazellulärem Effekt [Zis]; [Zr4] Adhäsionsrezeptor in Interaktion mit Adhäsionsprotein (z. B. Integrin und Vitronectin) mit konsekutivem intrazellulärem Signal [Zis]

Für die Dynamik der Ab- und Umbauprozesse der EZM sind unter bestimmten Bedingungen (z. B. Wundheilung, Organwachstum) Enzyme erforderlich, die die Elemente der EZM spalten können und so in der Folge eine Restaurierung ermöglichen. Gewebsumbauten sind in der Regel zeitlich limitiert, sodass die Regulation der betreffenden Enzyme in einem System stattfinden muss, das die Initiation und Termination der enzymatischen Aktivität gleichermaßen bewältigen kann. Wie in Abbildung 1 nahegelegt wird, kann eine Zelle z. B. über die Expression bestimmter Rezeptoren auf die EZM Einfluss ausüben und ihrerseits durch Moleküle der EZM reguliert werden.

Für die Situation einer Ausbreitung von Tumorzellen ist diese Matrixdegradation ebenfalls notwendig (Danø et al. 1999) . Insofern ist es naheliegend, dass entartete Zellen die physiologischen Mechanismen des Matrixabbaus nutzen, insbesondere wenn es um Kennzeichen der Malignität, wie Invasion, Destruktion oder Metastasierung geht.

Im Zusammenhang mit der Frage, welche Enzyme hier konkret eine Rolle spielen, steht die Regulation der Serinprotease Plasmin. Die proteolytische Überführung des Plasmins aus der Vorstufe Plasminogen durch die Plasminogenaktivatoren stellt die Aktivierung des Schlüsselenzyms für extrazelluläre Umbauprozesse dar (Baricos et al. 1995). Unter anderem ist der uPAR bei dieser Regulation von besonderer Bedeutung.

Der uPAR ist als membranständiges Element der Plasminregulation erstmalig 1985 an menschlichen Monozyten beschrieben worden, also an Zellen, die den Blutkreislauf verlassen und in andere Gewebe einwandern können (Vasalli et al. 1985). Kurze Zeit darauf wurde uPAR an menschlichen Tumorzellen nachgewiesen (Nielsen et al. 1988) und die zentrale Bedeutung der Plasminaktivität bei vielen pathologischen Mechanismen führte dazu, dass die strukturellen und funktionellen Zusammenhänge bis heute Gegenstand intensiver Forschung sind.

1.1.2 Strukturelle Aspekte

Der uPAR ist ein glykosyliertes Polypeptid, das in der Membran der Zellen verschiedener Organsysteme vorkommt. Durch einen Lipidanker (Glykosylphosphatidylinositol (GPI) - Anker) ist das extrazelluläre Glykopeptid kovalent mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran verknüpft. Nach Abschluss der posttranslationalen Modifikation besteht es aus 283 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht zwischen 50 und 60 kDa, je nach Grad der Glykosylierung. Eine zytosolische Domäne gibt es nicht (Kjaergaard et al. 2008).

Strukturell lässt es sich somit als integrales Typ-VI-Membranprotein bezeichnen (vgl. hierzu Rassow 2012). Funktionell sind verschiedene Interaktionen mit Strukturen der EZM beschrieben. In erster Linie ist der Rezeptor Bestandteil des Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Systems (uPAS) und so für die Regulation der Aktivität der Peptidase Plasmin mitverantwortlich. Neben dem uPAR werden zu diesem Regulationssystem der

Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA), die Inhibitoren der Plasminogenaktivatoren, also der Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI) 1 und der PAI 2, sowie das alpha-2-Antiplasmin gezählt (Smith und Marshall 2010).

Zentrales Korrelat für die Bindung seines wichtigsten Liganden uPA ist die räumliche Anordnung der drei funktionellen Domänen des Rezeptors (Huai et al. 2006). Alle Domänen enthalten ein charakteristisches topologisches Motiv, die sogenannte Drei-Finger Faltung oder *three-fingered protein domain fold* (TFPDF). Die Polypeptidkette ist dabei in mehreren β -Ketten organisiert, die sich durch starke Disulfidbindungen zu drei großen Schleifen anordnen. Übertragen auf das namengebende Bild dieses Motivs erinnern die Schleifen an drei Finger, an deren Basis wie eine Handfläche ein hydrophober Raum entsteht (Galat et al. 2008). Ein Großteil der β -Ketten aller drei Domänen lagert sich zu einem einzigen zentralen β -Faltblatt zusammen und so entsteht eine Tertiärstruktur, die treffend als Croissant-ähnlich beschrieben wurde (Kjaergaard et al. 2008). Die konkave Seite stellt eine hydrophobe Senke dar, die einen Bindungspartner beinahe zu umschließen vermag. Kjaergaard et al. sehen hierin z. B. die Ursache für die vergleichsweise hohe Bindungsaffinität der uPA-uPAR-Interaktion und leiten unter anderem auch die Fähigkeit des Rezeptors, einen beständigen Komplex mit seinem Liganden zu bilden, aus dieser Tertiärstruktur ab.

Der GPI-Anker macht den uPAR membranständig und die funktionellen Aspekte sind in der Regel im Zusammenhang mit der Zelloberfläche beschrieben (Blasi und Sidenius 2010). Allerdings gibt es auch die lösliche Variante des uPAR, die als *soluble* uPAR (suPAR) auch im Blut nachweisbar ist. Erstmals aufgefallen ist diese Variante in vitro, durch gezielte enzymatische Spaltung des GPI-Ankers (Ploug et al. 1991). Hinsichtlich der klinischen Relevanz steht suPAR vor allem als potenzieller Blutmarker für entzündliche Prozesse zur Diskussion (Thunø et al. 2009). Auch bei Tumoren lassen sich regelhaft erhöhte suPAR-Werte in vivo nachweisen, insbesondere bei fortgeschrittenen Tumorstadien (Gao et al. 2001). Beim Pankreaskarzinom sind die Publikationen zur prognostischen Relevanz einer genetischen uPAR-Amplifikation (Hildenbrand et al. 2009) mit den erhöhten suPAR-Werten im Urin von Pankreaskarzinompatienten (Sorio et al. 2011) vereinbar.

Das Gen für den uPAR trägt den Namen *PLAUR* und liegt in der Region 19q13 (Børghlum et al. 1992). Die Genexpression hängt stark von der betrachteten Zelle ab. U. a. an Monozyten konnte die Möglichkeit nachgewiesen werden, die uPAR-Expression kurzfristig zu erhöhen, etwa wenn die Zelle aktiviert wird (Min et al. 1992). In einer anderen Arbeit wurde die uPAR-Expression in gesunden Mausorganen mit uPAR-Knockout-Mäusen als Kontrollgewebe verglichen. Auch hier zeigte sich zwischen den Organen, aber auch innerhalb der Organe selbst ein unterschiedliches Expressionsmuster, wobei die Schlussfolgerung gezogen werden konnte, dass insbesondere solche Gewebe viel uPAR exprimierten, die einen hohen Gewebeumsatz aufwiesen (Solberg et al. 2001). Die

physiologische Expression scheint sich also an Zellfunktionen, wie Aktivierung (s.o.) oder Wundheilung (Xia et al. 2003) zu adaptieren.

Die experimentelle Induktion des uPAR-Gens ist ebenfalls oft beschrieben. Beispielhaft erwähnt seien Nikotin (Khoi et al. 2012) und Cadmium (Khoi et al. 2014) oder auch Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor* (EGF) (Baek et al. 2008). Als hemmende Substanz ist Amilorid beschrieben (Wang et al. 1994) und auch Calcitriol (Ma et al. 2013) scheint ein wichtiger Regulator zu sein. Im Hinblick auf das Pankreaskarzinom ist mit dem Forkhead-box-Protein FOXM1c ein Transkriptionsfaktor beschrieben worden, der eine vermehrte Expression des uPARs bewirken kann (Huang et al. 2014).

1.1.3 Funktionelle Aspekte

Die Bedeutung des uPARs für eine Vielzahl biologischer Vorgänge im physiologischen und pathologischen Sinn ergibt sich aus seiner Interaktion als Rezeptor mit verschiedenen zellulären wie perizellulären Substraten.

1.1.3.1 Der uPAR im System der Plasminregulation

Plasmin ist eine Peptidase, also ein Enzym, das Peptidbindungen spaltet. Die Plasminkonzentration ist im Blut nahezu nicht messbar, da es sich um die aktivierte Form des Plasminogens handelt. Plasminogen wird in der Leber synthetisiert, der Blutnormalwert liegt bei 0,2 g/l und die Halbwertszeit beträgt 2,2 Tage (Quelle: Wikipedia).

Die proteolytische Aktivität des Plasmins beeinflusst direkt oder indirekt vielfältige Körperfunktionen, wie die Blutgerinnung (Collen und Lijnen 1995) und die Wundheilung (z. B. Whelan et al. 2014). Die Modulation des Immunsystems ist vielschichtiger als die bereits beschriebene Aktivierung von Zellen wie Monozyten und umfasst z. B. Prozesse der Cytokininduktion und Chemotaxis (Syrovets und Simmet 2004). Plasmin beeinflusst auch Wachstumsfaktoren, wie insbesondere den transforming growth factor β (TGF- β) und hat ferner Einfluss auf die Bildung von Blutgefäßen (Pepper 2001). Zusammen mit der oben angesprochenen Rolle beim Umbau der EZM, ergeben sich somit zahlreiche Aspekte, die Tumorstadium begünstigen können. Der uPAR als integrales Element des uPAS ist ein Kernprotein dieser tumorprogressiven Plasmineffekte. Als primär membranständiger Rezeptor ist er eine dauerhafte Einflussgröße in der direkten Tumorumgebung und aus den Wechselbeziehungen mit den anderen uPAS-Elementen ergeben sich vielschichtige und variable Veränderungen in eben diesem Umfeld (Andreasen et al. 1997). So ist es nicht verwunderlich, dass regelhaft in menschlichen Tumoren Veränderungen des uPAR-Gens nachgewiesen werden, die dann häufig mit einer schlechteren Prognose für den Patienten

einhergehen (Dass et al. 2008). Beim Pankreaskarzinom betrifft das insbesondere solche Patienten mit einer Amplifikation des *uPAR*-Gens (Hildenbrand et al. 2009).

Die proteolytische Aktivität des Plasmins wird generiert, wenn der uPA das Plasminogen zu Plasmin spaltet. Dieser Plasminogenaktivator ist seinerseits eine Serinprotease, die als katalytisch inaktive Vorstufe gebildet und sezerniert wird. Diese Pro-Urokinase wird von vielen verschiedenen Zellen sezerniert (z. B. Endothelzellen, Neutrophilen Granulozyten u.v.m.) und zirkuliert im Blutkreislauf, bis sie durch einen Effektor durch limitierte Proteolyse gespalten und aktiviert wird (Vassalli et al. 1991). Der wichtigste Effektor dieser Aktivierung ist das Plasmin selbst, man spricht also von einer wechselseitigen oder reziproken Aktivierung der beiden Enzyme (Behrendt et al. 2003). Die einzelkettige Form des uPA (single-chain-uPA, scuPA) ist das Proenzym. Durch Spaltung der Einzelkette entsteht die aktivierte zweikettige Form (two-chain-uPA, tcuPA), die dann vor allem das Plasminogen in Plasmin überführen kann.

Sowohl die inaktive, als auch die aktive uPA-Form sind hochaffine Substrate des uPAR (Cubellis et al. 1986). Also hat uPA unabhängig von der proteolytischen Aktivierung eine stabile Domäne für die Bindung an seinen Rezeptor uPAR was die Interaktion mit Plasminogen im Sinne einer wechselseitigen Aktivierung begünstigt (Ellis et al. 1991).

uPAR-unabhängige Einflüsse auf die Plasminaktivierung sind oft beschrieben. Ihre Beachtung ist natürlich von Bedeutung, weil durch den reziproken Zusammenhang der Plasmin-uPA Wechselbeziehung ein Mechanismus vorliegt, der die Unterhaltung einer hohen Plasminaktivität, ganz unabhängig von seinem auslösenden Effekt denkbar erscheinen lässt.

Der Plasminogenaktivator vom Gewebetyp (*tissue type PA*, tPA) gilt als der wesentliche Aktivator des Plasminogens für die intravasale Proteolyse z. B. im Rahmen der Blutgerinnung (Kruithof und Dunoyer-Geindre 2014). Durch die Spaltung von Fibrin hat er einen hohen Stellenwert, z. B. auch als Therapeutikum bei ischämischen Erkrankungen. Eine Relevanz im Rahmen von Tumorerkrankungen ist immer wieder Gegenstand von Veröffentlichungen, auch im Bereich des Pankreaskarzinoms (Diaz 2004). Insgesamt hat die klassische Zweiteilung der Funktionalität der Plasminogenaktivatoren in einen intravasalen fibrinolytischen Typ und einen Plasminogenaktivator für Umbauprozesse bzw. Tumorprogression allerdings nach wie vor Gültigkeit (Deryugina und Quigley 2012). In einer Arbeit wurden z. B. Magenkarzinomzellen im Hinblick auf ihre Expression von uPA und tPA untersucht und mit gesunden Magenzellen verglichen. Die tPA-Expression blieb dabei nahezu unverändert zwischen kanzerösen und gesunden Zellen, obwohl eine deutlich erhöhte Plasminogenaktivierung vorlag, die nachweislich mit einer verstärkten Ausprägung des uPAS assoziiert war (Scicolone et al. 2006).

Weitere denkbare Einflussgrößen auf die uPAR-unabhängige Aktivierung von Plasminogen sind auch die sehr geringe katalytische Grundaktivität des scuPA (Petersen et al. 1988), der grundsätzlich auch ohne uPAR in der Lage ist, Plasminogen zu aktivieren. Auch andere Serinproteasen wie das Trypsin und das Kallikrein können uPA aktivieren (Eaton et al. 1984). Letztlich zeigt aber auch der umfassendere Blick auf die Plasminregulation in der Tumorbiologie, dass aussagekräftige Daten nur mit oder zumindest nicht ohne die ausdrückliche Beachtung der Rolle des uPAS generiert wurden, was die Fokussierung auf dieses System und seine Komponenten nach wie vor rechtfertigt.

Der Umstand, dass dieses System durch einen Rezeptor gekennzeichnet ist, der, wie beschrieben, die Komplexität der einzelnen Komponenten in einen zusammenhängenden Prozess der direkten Tumorumgebung integriert, rechtfertigt seine besondere Stellung als stellvertretender Marker für die Untersuchung der tumorprogressiven Effekte der Plasminregulation.

Zur Vervollständigung des Bildes ist eine Betrachtung der originären inhibitorischen Komponenten des uPAS erforderlich. Mit PAI-1, PAI-2 und alpha-2-Antiplasmin sind drei Enzyme beschrieben, die die Konzentration von katalytisch aktivem Plasmin reduzieren. Ihre Substrate sind die bereits beschriebenen Serinproteasen des uPAS, weshalb sie als Serinprotease-Inhibitoren oder kurz Serpine bezeichnet werden. Sie überführen ihre Zielprotease in eine inaktive Form durch die Etablierung einer kovalenten Bindung zwischen dem aktiven Zentrum der Serinprotease und einer bestimmten Serpindomäne (Stein und Carrell 1995). Strukturell kann man sich die Serpine also als Substrate der Serinproteasen vorstellen, aus deren Bindung mit dem aktiven Zentrum dann allerdings ein stabiler Komplex der Reaktionspartner resultiert, womit die Serinproteasen deaktiviert werden. Als effektivster Inhibitor gilt der PAI-1, weil er eine sehr hohe Affinität zu uPA und auch eine gewisse Affinität zu pro-uPA hat (Ellis 1996). PAI-2 reagiert deutlich langsamer mit uPA und ist beim Gesunden, anders als PAI-1, normalerweise nicht im Plasma detektierbar (Robbie et al. 2000). Zur Hemmung der Plasmineffekte nach stattgehabter Enzymaktivierung kann Plasmin selbst durch alpha-2-Antiplasmin gehemmt werden (Behrendt 2004). Diese inhibitorischen Effekte der Serpine wirken sich ferner mittelbar und unmittelbar auf die Regulation des Rezeptors uPAR aus.

1.1.3.2 Die Mechanismen des uPAR-Abbaus

Wird der uPAR-Ligand uPA durch seine Inhibitoren kovalent gebunden, werden die entstandenen uPA-Serpin-Komplexe endozytotisch in die Zelle überführt und intrazellulär abgebaut. Die endozytosevermittelnden Rezeptoren liegen auf der Zellmembran und gehören u. a. zur Familie der low-density-lipoprotein-Rezeptoren, aber auch der uPAR selbst ist in diese Effektor-regulierende Endozytose eingebunden (Conese et al. 1994).

Hierbei sind verschiedene Konsequenzen im Hinblick auf die uPAR-Expression beobachtet worden. So wird bei Nykjær et al. (1997) u. a. beschrieben, dass der gesamte uPA-Serpin-uPAR-Komplex endozytiert wird, wobei uPAR unspezifisch wieder an der Zellmembran exprimiert wird. Bei in vitro Experimenten mit Karzinomzellen der Brustdrüse fand sich hinsichtlich der uPAR Expression ein deutlich erhöhter Umsatz mit Aufbau neuer- und Abbau alter uPA-Rezeptoren im Zuge der uPA-Serpin-uPAR Endozytose (Webb et al. 1999).

Die zwei wesentlichsten Mechanismen der zellulären uPAR-Expressionsregulation sind allerdings zum einen die Aufspaltung des Rezeptors in Domänenuntergruppen und zum anderen die enzymatische Auslösung des gesamten Rezeptors aus der Zellmembran in seine lösliche Form.

1. Aufspaltung in Domänensubgruppen:

Insbesondere Plasmin und uPA sind zur Aufspaltung des Rezeptors in der Lage (Hoyer-Hansen et al. 1992), indem sie die Bindung zwischen der ersten (DI) und zweiten Domäne (DII) spalten, sodass zwei stabile Substrukturen entstehen. DI wird dabei löslich, die Subgruppe aus DII und DIII verbleibt durch den GPI Anker an der Zelloberfläche oder wird ebenfalls löslich (Sidenius et al. 2000). Den Fragmenten hat man insbesondere eine chemotaktische Funktion zuordnen können, die Aktivität des Rezeptors wird dabei aufgehoben (Blasi und Sidenius 2010).

2. Abspaltung des uPARs von der Zellmembran:

Die Loslösung aus der Zellmembran erfolgt am oben beschriebenen GPI-Anker des Rezeptors. Auch dieses ist insofern ein intrinsischer proteolytischer Mechanismus, dass wiederum das Plasmin selbst diese GPI-Spaltung realisieren kann (Blasi und Sidenius 2010). Der lösliche uPAR, soluble uPAR (suPAR), entsteht und kann im Plasma nachgewiesen werden. Hinsichtlich des strukturell intakten Rezeptors suPAR gibt es zahlreiche Untersuchungen die eine inhibitorische Funktion des suPAR nahelegen. Der lösliche Rezeptor kann Liganden des uPAS abfangen (Wilhelm et al. 1994), die Signaltransduktion einschränken (Tarui et al. 2001) und auch die Plasminogenaktivierung an der Zellmembran vermindern (Krüger et al. 2000). In letztgenannter Studie zeigten Krüger et. al. gleichzeitig einen inhibitorischen Effekt auf die Tumorprogression in einem Xenograftmodell mit Zellen des Mammakarzinoms.

1.1.3.3 Der uPAR und die Signaltransduktion

Mit dem Begriff Signaltransduktion ist in erster Linie die Vorstellung verbunden, dass Prozesse, die außerhalb der Zelle ablaufen, durch strukturelle Korrelate einen Weg ins Zellinnere finden und hier einen Effekt generieren, in dessen Folge es zu einer zellulären

Reaktion kommt. Da wirkt es auf den ersten Blick paradox, dass ein GPI-Protein wie der uPAR, der also wie beschrieben membranständig ohne eine intrazelluläre Domäne endet, einen äußeren Reiz in ein intrazelluläres Signal umwandeln kann. Signalkaskaden, mit dem uPAR als Kenngröße bedürfen also zusätzlicher Co-Rezeptoren, die uPAR-assoziierte Stimuli transmembranär überleiten können. Mit römisch I bis V wird im Folgenden ein Überblick hierzu gegeben.

I) Der uPAR und die Integrine

Die Signaltransduktion ist ein hochkomplexes Proteinnetzwerk, in das die Integrine strukturell als Transmembranproteine und funktionell als EZM-Rezeptoren einzuordnen sind. Extrazellulär imponieren die Integrine als Dimere mit einer Alpha- und einer Beta-Untereinheit. Die intrazelluläre Domäne der Integrine inseriert an der Innenseite der Zellmembran in einen Halteapparat, der auch als Plaque bezeichnet wird. Hierüber adaptieren die Integrine an das Zytoskelett und an Funktionsproteine verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden. Je nach äußerem Reiz können so zahlreiche Zellfunktionen beeinflusst werden. Als weitverbreitetste Familie der EZM-Rezeptoren stellen die Integrine einen Grundstein zellulärer Kommunikationsmechanismen dar, beeinflussen Umbauprozesse zytoskelettaler Filamente und eine Vielzahl von Proteinen in der EZM und der Zellmembran. Im Folgenden wird ausgeführt, wie der uPAR Anteil nimmt an der Integrinfunktion und so selbst Repräsentant spezifischer Signaltransduktionsprozesse wird. Eine Übersicht zu Integrinen in der Tumorforschung liefert Stupack mit seinem Review „The biology of integrins“ (Stupack 2007). Grundsätzlich ist der Umstand von Bedeutung, dass leukozytäre Infiltrate ein mikroskopisches Korrelat für entzündliche, aber auch für neoplastische Prozesse (Del Prete et al. 2011) sind. Sie sind das Ergebnis einer gerichteten Mobilisation der Leukozyten und von der Expression leukozytärer Rezeptoren abhängig, z. B. für die Extravasation. Die Fähigkeit zur Adhäsion ist in diesem Zusammenhang eine bedeutende Leukozytenfunktion, für deren Bewerkstelligung Integrine unerlässlich sind.

Mitte der 90er Jahre beschrieben u. a. Di Simon et al. (Di Simon et al. 1996) an dem Mac-1-Rezeptor den ersten funktionellen Zusammenhang von uPAR und Integrinen. Mac-1 ist ein Integrin und ein Zellrezeptor, der die Adhäsion und Migration von Lymphozyten vermittelt. Monoklonale Antikörper, die gegen den uPAR gerichtet waren, reduzierten die Fähigkeit der Lymphozyten zur Adhäsion *in vitro*, was einem funktionellen und strukturellen Zusammenhang zwischen Mac-1 und uPAR zugeordnet werden konnte.

Bis heute sind die genauen Zusammenhänge der uPAR-Integrin Signaltransduktion nicht entschlüsselt und verschiedene Theorien werden postuliert. Im Kern ist klar, dass es um die Modifikation der EZM-Signale geht, die die Integrine erreichen. In diesem Sinne ist der wichtige Ligand des uPAR in diesem Zusammenhang eher nicht der Plasminogenaktivator

Urokinase, sondern es sind Bestandteile der EZM selbst, vor allem das Vitronektin (Ferraris et al. 2014). Effekte der uPAR-Vitronektin-Bindung führen dann über Integrine selbst oder über andere Strukturen, wie Co-Rezeptoren (z. B. Wei et al. 1999, Bass et al. 2005), die ihrerseits funktionell mit Integrinen interagieren, zu zellulären und extrazellulären Effekten. Für die genauen molekularen Mechanismen gibt es verschiedene Hinweise, die entweder mittelbare oder unmittelbare uPAR-Integrin-Interaktionen beschreiben.

Eine rein räumliche Nähe der Rezeptoren wurde beispielsweise schon früh beschrieben (Myohanen et al. 1993) und den uPAR-Domänen, insbesondere DII (Degryse et al. 2005) und DIII (Chaurasia et al. 2006) wurde auch schon die Fähigkeit zuerkannt, bestimmte Integrine direkt zu binden. Diese Ergebnisse suggerieren eher eine unmittelbare Interaktion z. B. im Sinne einer aktivierenden Konformationsänderung der Integrin-Untereinheiten. Andere Autoren stellen die uPAR-Vitronektin-Interaktion in den Vordergrund, was die Möglichkeit beinhaltet, dass es nur mittelbar zu einer Interaktion von uPAR und Integrinen kommt, z. B., weil einfach die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass Integrine durch die Bindung des kolokalisierten uPARs mit Vitronektin Kontakt zur EZM bekommen (Madsen et al. 2007). Der uPAR ist in diesem Zusammenhang insbesondere bedeutend für die liganden-unabhängige Signaltransduktion der Integrine. Integrine können dann Zellsignale regulieren, ohne durch Liganden aktiviert zu werden, wenn im Rahmen der Zell-EZM-Interaktion des uPAR eine Stimulation erfolgt (Ferraris et al. 2014). Im Folgenden werden einige uPAR-Integrin-Interaktionen kurz beschrieben.

uPAR und Mac-1:

Besonders eindrücklich wurde der oben bereits skizzierte Zusammenhang zwischen uPAR und Mac-1 im Mausmodell gezeigt. uPAR-Knockout-Mäuse wurden mit Wildtypmäusen verglichen. Insbesondere im Rahmen von Versuchsanordnungen mit bakteriellen Infektionen der Lunge zeigte sich bei uPAR-Knockout-Mäusen ein tiefgehender Defekt im Hinblick auf die durch Leukozyten getragene Immunantwort bis hin zum Ausbleiben einer neutrophilen Migration, was dem Zusammenspiel von uPAR und Mac-1 zugeordnet werden konnte (May et al. 1998). Mac-1 als wichtiger Vertreter der β 2-Integrine vermittelt zelluläre Effekte in besonderer Weise über die Phosphorylierung von Tyrosinkinasen (Takami et al. 2001). Allgemeiner betrachtet zeigt sich hier also ein Signalweg, ausgehend vom uPAR zu einem weiteren zentralen Knotenpunkt der Signaltransduktion, nämlich der gezielten Aktivierung und Deaktivierung von Zielproteinen durch phosphorylierende bzw. dephosphorylierende Kinasen. Eine gut erforschte Gruppe der Tyrosinkinasen, auch im Hinblick auf onkogene Eigenschaften, bildet die Gruppe der Sarkom (Src) – Tyrosinkinasen. Src-Kinase-Modulation durch uPAR ist u. a. auch in Bezug auf das Pankreaskarzinom beschrieben (He et al. 2012) und mit dem β 2-Integrin-uPAR-Signalweg assoziiert (Bohuslav et al. 1995).

uPAR und β 1-Integrin:

Auch die β 1-Integrine binden Moleküle der EZM, wie z. B. Laminin und Fibronectin. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt verstärkt wird, wenn der Plasminogenaktivator uPA seinen Rezeptor uPAR bindet (Monaghan et al. 2004). Nachgeschaltete zelluläre Effekte betreffen in ähnlicher Weise, wie oben geschilderte Kinasesignalwege, wobei uPAR über diese Integrine an verschiedene zytosolische Kinasen wie die *mitogen-activated-protein* (MAP) - Kinase (Aguirre-Ghiso et al. 2001) sowie die Fokale Adhäsions Kinase FAK (Aguirre-Ghiso 2002) anknüpft. Da diese Kinasen wichtige proliferative Stimuli für Tumorzellen darstellen, wundert es nicht, dass in diesen Arbeiten über den uPAR experimentell die Proliferation von Tumorzellen gesenkt werden konnte. Die invasiven Eigenschaften von Pankreaskarzinomzellen konnten ebenfalls über diesen Signalweg durch die Antagonisierung der *eucaryotic elongation factor 2-kinase* (eEF2K) reduziert werden (Ashour et al. 2014). Ferner stellt der mit den MAP-Kinase-Signalweg eng verknüpfte *epidermal-growth-factor-Rezeptor* (EGFR) im Zusammenhang mit β 1-Integrinen ebenfalls eine Domäne dar, die durch überexprimierte uPA-Rezeptoren aktiviert werden kann (Liu et al. 2002).

uPAR und β 3-Integrin:

Hinsichtlich des β 3-Integrins rückt das EZM-Molekül Vitronectin wieder in den Vordergrund. Sowohl uPAR als auch β 3-Integrin binden das Vitronectin. Durch diese Integrin-uPAR-Interaktion verwirklicht sich ein Zusammenhang zu intrazellulären Kinasen der Rho-Familie, namentlich der GTPase Rac (Alfano et al. 2012). In phosphoryliertem Zustand wandelt diese Kinase das wichtige Zytoskelettelement Aktin in seine dynamische Form f-Aktin um, was das zentrale Kernelement der bewegten Zellmembran darstellt und damit für Prozesse wie Motilität, Phagozytose und auch die invasive Zellausbreitung unerlässlich ist (Margheri et al. 2014). Die Bedeutung dieses Signalweges für verschiedene Tumorzellen *in vitro*, sowie die im einzelnen beteiligten Proteinstrukturen sind erstmalig 2008 beschrieben worden (Smith et al. 2008).

II) Der uPAR und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren:

Den ersten Nachweis einer direkten Interaktion des uPAS mit einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor erbrachten Resnati et al. mit der Identifikation eines direkten uPAR-Spaltproduktes als Ligand des G-Proteins FPRL1/LXA4R, einem Chemotaxis-Rezeptor (Resnati et al. 2002). In diesem Fall führt suPAR zur Konformationsänderung des Rezeptors, was über ein intrazelluläres G-Protein die membranständige Phospholipase C aktiviert und in der Konsequenz zur Modulation zahlreicher intrazellulärer Proteine führt. Allerdings ist der FPRL1/LXA4R ein weit verbreiteter Membranrezeptor und hat sehr viele Liganden, was bedeuten könnte, dass die Aktivierung durch das uPAS sehr

unspezifisch ist. Weitere mögliche uPAS-G-Proteine finden sich bei Henic et al. (Henic et al. 2009).

III) Janus-Kinase (JAK); uPAR und der JAK-STAT-Signalweg:

Rezeptoren ohne eigene Enzymaktivität benötigen mitunter intrazelluläre Kinasen, um eine Signalübertragung zu generieren. Die meisten Zytokine wirken über diesen Mechanismus. Durch zytosolische Januskinasen werden sogenannte STAT-Proteine phosphoryliert und können dann im Sinne eines Transkriptionsfaktors im Zellkern wirken. Dysregulationen haben eine große Bedeutung für die Tumorbilogie (Thomas et al. 2015). In verschiedenen soliden Tumoren konnte gezeigt werden, dass der aktivierte uPAR die Aktivität der JAK1 erhöht und damit einen direkten Einstieg in den JAK-STAT-Signalweg liefert mit entsprechenden Folgen z. B. hinsichtlich vermehrter Proliferation (Koshelnick et al. 1997), (Dumler et al. 1999) oder Zellwachstum und Metastasierung (Bao et al. 2014).

IV) uPAR und Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK):

Rezeptor Tyrosinkinase sind klassische Membranrezeptoren insbesondere von Hormonen (z. B. Insulin) oder Wachstumsfaktoren (verschiedene growth factors, GF) mit Auswirkungen auf die Teilung, das Überleben und Differenzieren von Zellen. Das BCR-ABL-Fusionsgen bei der Chronisch-myeloischen Leukämie oder die *HER2/neu* Mutation beim Mammakarzinom sind Beispiele, die die Relevanz hochregulierter RTK bei malignen Erkrankungen unterstreichen. Auch RTK-Signalwege können durch den uPAR moduliert werden, wobei vor allem ein Einfluss auf den *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Chabot et al. 2015) und den *epidermal growth factor* (EGF) (Jo et al. 2007) beschrieben sind.

V) Vitronektin:

Vitronektin ist ein Bestandteil der EZM und direkter Ligand des uPARs. Vitronektin weist potentielle Bindungsstellen für das Gros der uPA-System-Proteine auf und beeinflusst die Signaltransduktion in einer Weise, die nun dazu geführt hat, dass Vitronektin zur anerkannten Kenngröße der verschiedenen uPAR-Pathways geworden ist (Madsen und Sidenius 2008). Neben der Signaltransduktion ist Vitronektin das Effektorprotein für die Bedeutung des uPARs als eigenständiger Vermittler der Zelladhäsion und Migration (Madsen et al. 2007) und somit insgesamt das wahrscheinlich bedeutsamste Protein für die nicht proteolytischen Funktionen des uPAS. Vitronektin als Targetprotein zu verwenden, könnte also therapeutischen Überlegungen neuen Schub geben, die meist von Antikörperdesigns geprägt sind, die gegen die „klassische“ uPA-uPAR-Bindung gerichtet sind (siehe hierzu z. B. Rea et al. 2013 und Xu et al. 2014). Der direkte Einfluss der uPAR-Vitronektin Interaktion auf das Tumorstadium konnte bereits in einem Xenograft Modell an Mäusen gezeigt werden (Pirazzoli et al. 2013).

1.1.4 Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel dargelegten Aspekte zum uPAR verdeutlichen die vielen Dimensionen der uPAR Funktion. Vor dem Hintergrund der bei vielen soliden Tumoren generierten Daten zu diesem Rezeptor ist zudem wesentlich, dass die Überexpression des Rezeptors im Tumorgewebe ein häufiges Ereignis ist. Die klassische Denkweise der Zweiteilung der funktionalen Dimensionen des uPAR in eine proteolytische und eine nicht-proteolytische Aktivität ist zu erweitern. Ferraris und Sidenius haben 2013 in Ihrem Review „Multiple Functions of Urokinase Receptor“ die Unterscheidung dreier Kernaspekte vorgeschlagen: Proteolyse, Adhäsion und Signaltransduktion (Siehe Abbildung 2).

Anhand des daraus übernommenen Schaubildes wird nochmal abschließend verbildlicht, wie naheliegend es scheint, den uPAR als Zellrezeptor klinisch-therapeutisch zu nutzen um diese drei Prozesse, die eben auch Charakteristika neoplastischer Veränderungen sind, zu beeinflussen.

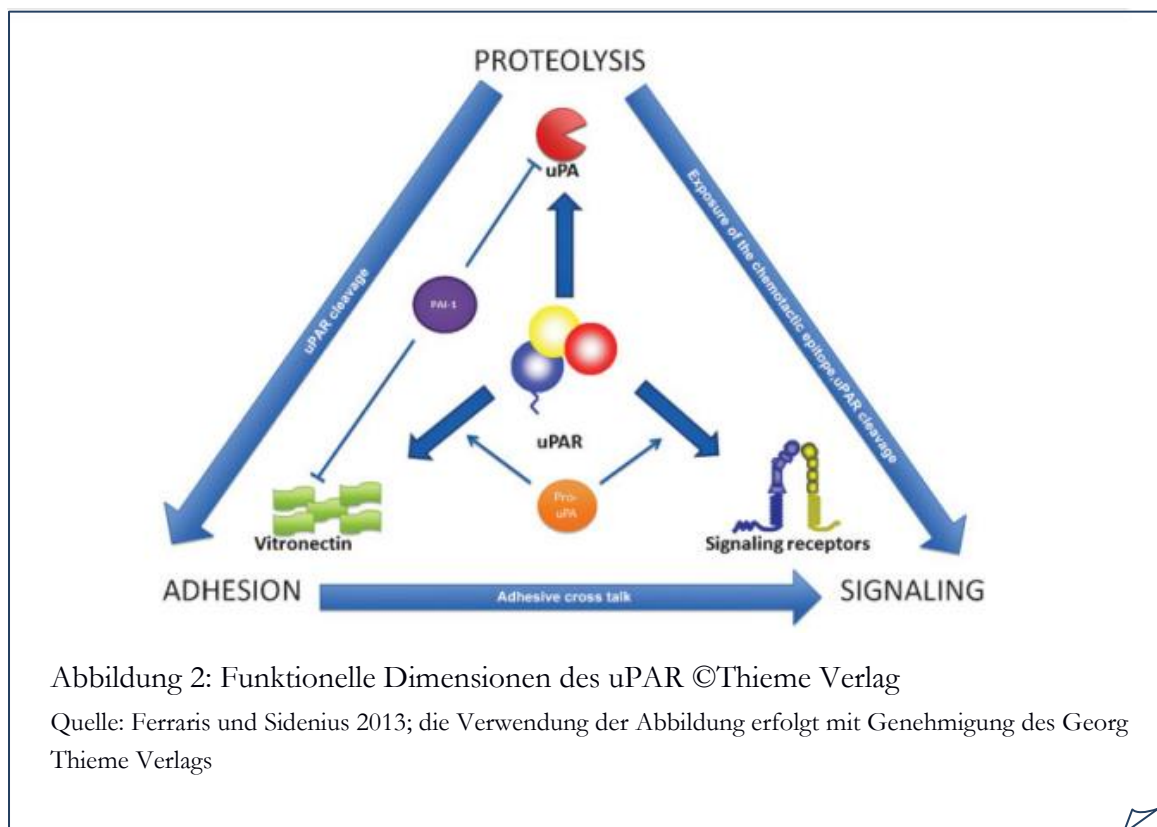
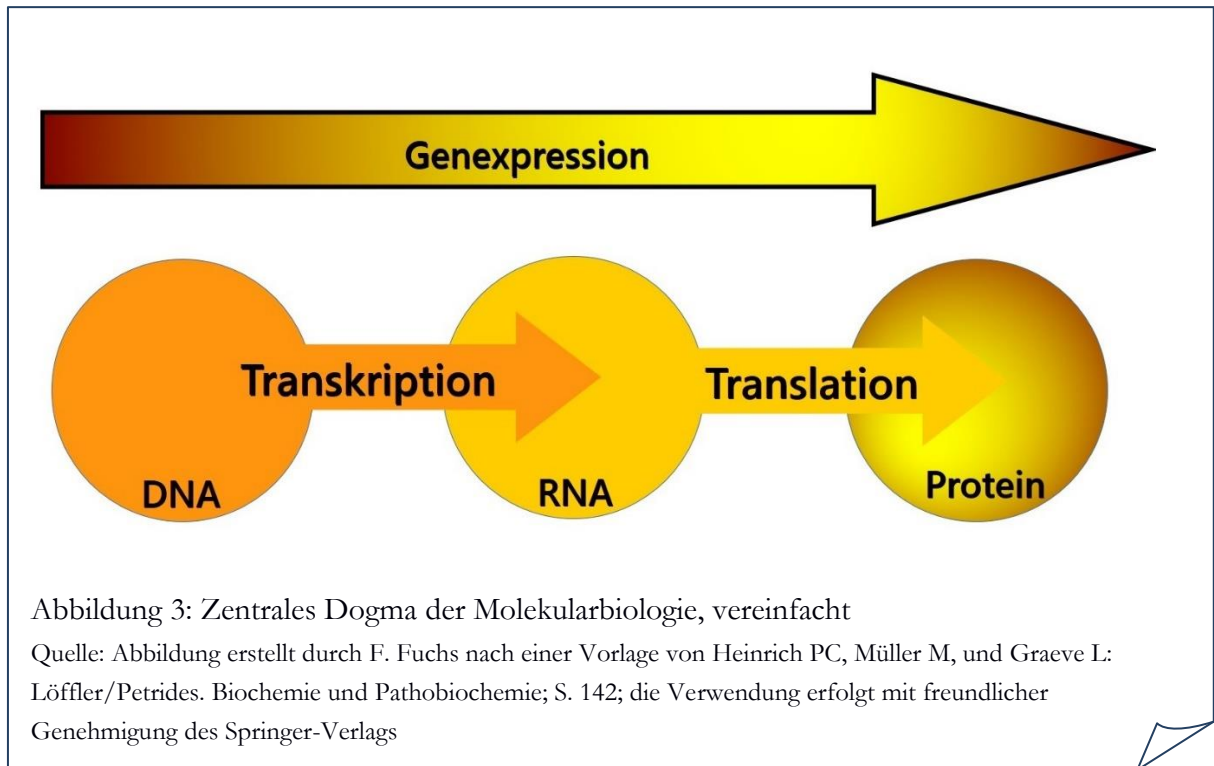


Abbildung 2: Funktionelle Dimensionen des uPAR ©Thieme Verlag

Quelle: Ferraris und Sidenius 2013; die Verwendung der Abbildung erfolgt mit Genehmigung des Georg Thieme Verlags

1.2 Das *c-MYC*-Onkogen

1.2.1 Grundlagen



Gemeinhin bekannt ist, dass nahezu jede Zellfunktion das Ergebnis der Produktion spezifischer Proteine ist, deren Herstellung einen regulierten Prozess darstellt. Kern dieses Prozesses ist die Überführung der genetischen Information in eine Folge von Aminosäuren, die dann in die Proteinausgestaltung definiert (siehe Abbildung 3).

Als Transkription fasst man in diesem Zusammenhang jene Vorgänge zusammen, die zunächst die Übertragung der Information von der Ebene der DNA auf die Ebene der Ribonukleinsäure ermöglichen und somit den Beginn der Genexpression markieren.

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die direkt oder mittelbar die DNA binden, so die Transkription regulieren und damit die Genexpression steuern. Eine Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren führt zu dysregulierter Genexpression und ist ein zentrales Merkmal transformierter Zellen (Wagener und Müller 2010). Im Besonderen wenn diese fehlregulierten Transkriptionsfaktoren konsekutiv auf die Genexpression der Zelle Einfluss nehmen, können sie die gesamte Homöostase der Zelle irreversibel schädigen. *c-MYC* ist ein Gen, das solche Transkriptionsfaktoren codiert (siehe Abbildung 4).

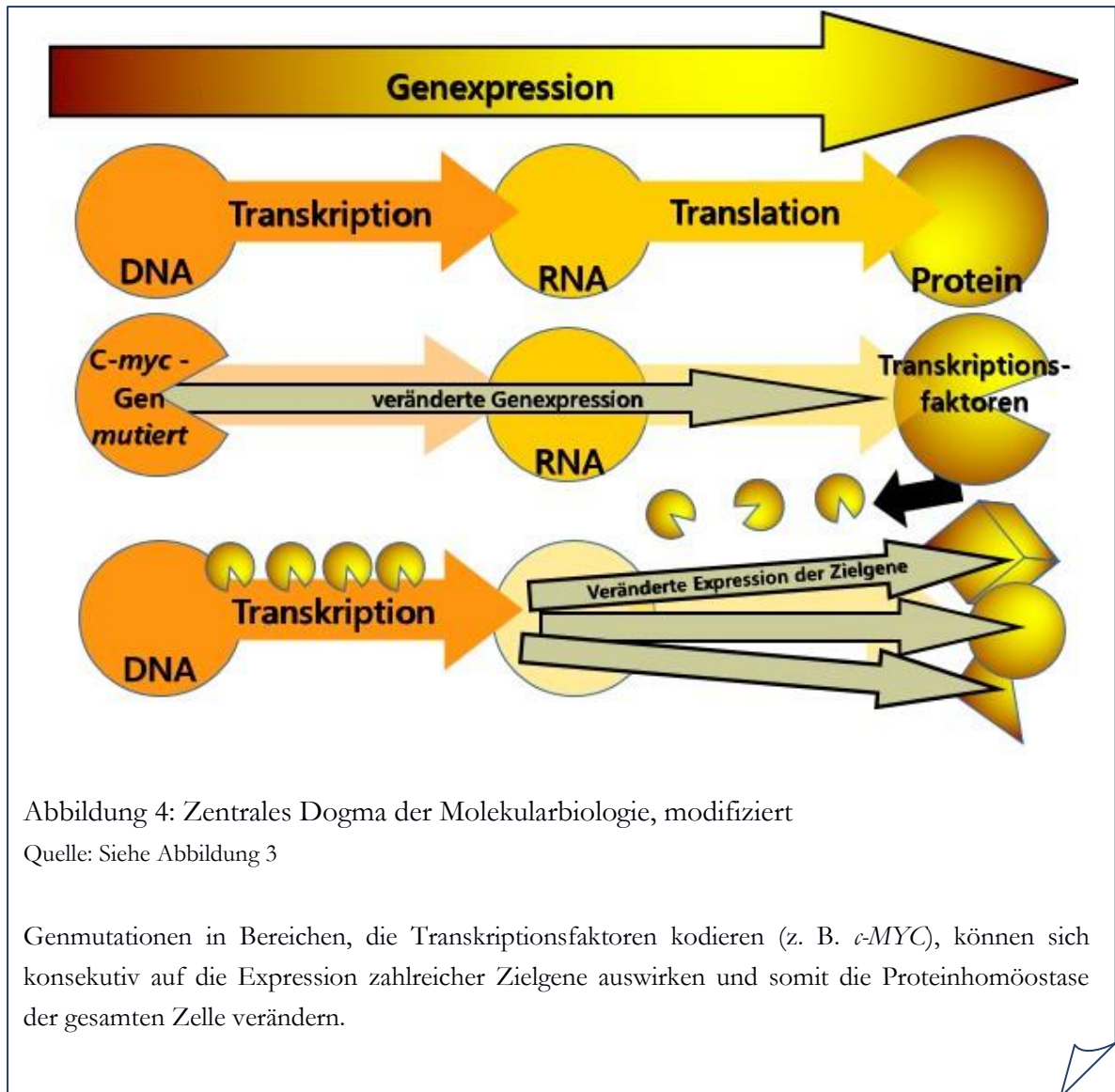


Abbildung 4: Zentrales Dogma der Molekularbiologie, modifiziert

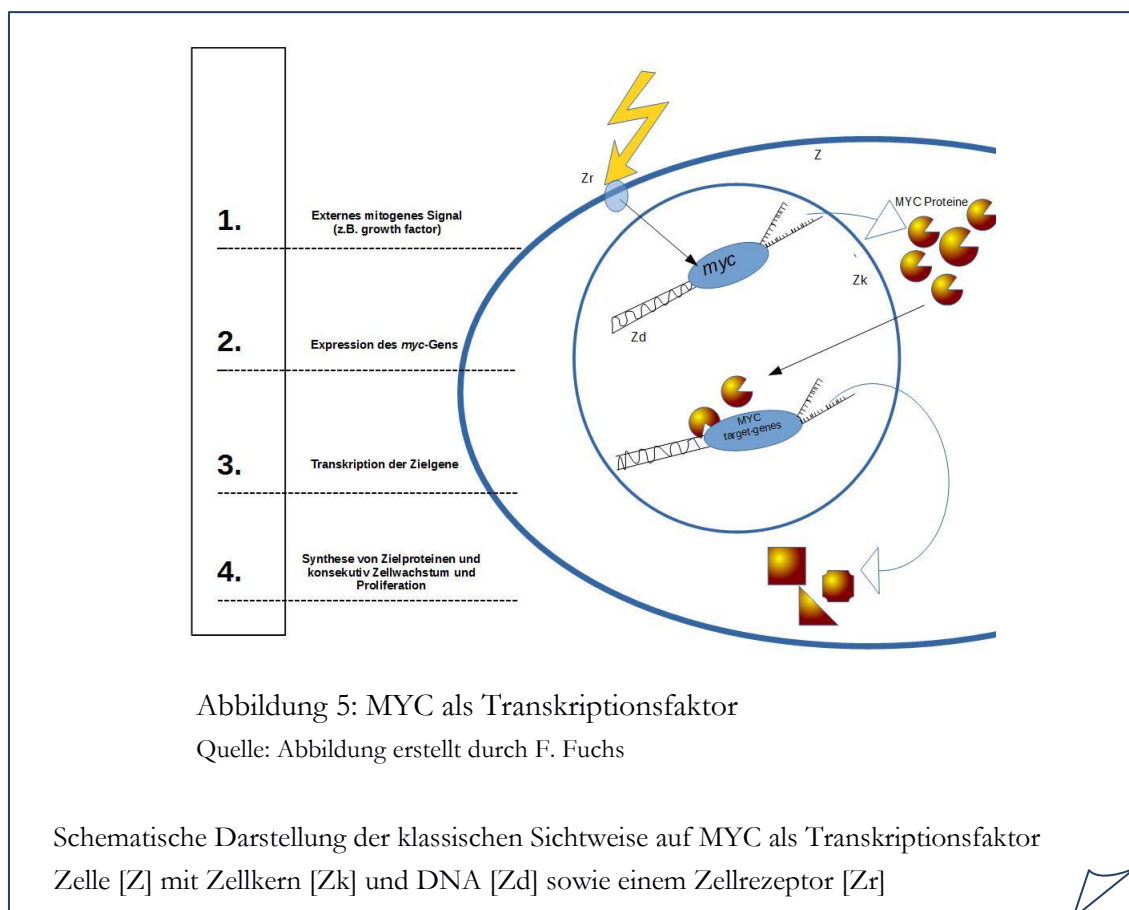
Quelle: Siehe Abbildung 3

Genmutationen in Bereichen, die Transkriptionsfaktoren kodieren (z. B. *c-MYC*), können sich konsekutiv auf die Expression zahlreicher Zielgene auswirken und somit die Proteinhomöostase der gesamten Zelle verändern.

Eine Fehlregulation von *c-MYC* (z. B. durch eine Mutation) kann zu einer Entartung der Zelle zur Tumorzelle führen, da die dort kodierten gleichnamigen Transkriptionsfaktoren basale Vorgänge des Zellstoffwechsels beeinflussen. Daher wird das *c-MYC*-Gen auch Protoonkogen genannt.

Onkogene Veränderungen der *MYC*-Genfamilie sind bei mehr als 70% der menschlichen Tumoren vorhanden (Weinberg 2014). Seit etwa 35 Jahren werden mit *c-myc*, *l-myc* und *n-myc* drei Vertreter dieser Genfamilie intensiv beforscht, und die Erkenntnisse hinsichtlich ihrer biologischen Funktionen in gesunden und entarteten Zellen zeichnen das bunte Bild einer basalen Schaltstelle verschiedener fundamentaler Zellfunktionen (Meyer 2008). Diese Vielgliedrigkeit ergibt sich zum einen aus der großen Menge an Zielgene deren Transkription durch *MYC*-Proteine induziert bzw. supprimiert wird (O'Connell et al. 2003). Zum anderen wird die Transkription der *MYC*-Gene in unterschiedlicher Weise von verschiedenen Signalen beeinflusst. Solche Signale können z. B. Wachstumsfaktoren sein,

die die Expression der MYC-Proteine fördern, ein Vorgang der für physiologisches Zellwachstum unerlässlich ist (Eilers und Eisenman 2008). Hieran wird nochmals der Begriff des Onkogens deutlich, wenn es nämlich durch genetische Veränderungen dazu kommt, dass *MYC*-Gene ohne kontrollierte Stimuli wie Wachstumsfaktoren transkribiert werden. In der Folge kann es zur autonomen Expression selektierter Proteine kommen und die Zelle entartet. Ein anschauliches Beispiel ergibt sich aus der Betrachtung des Zellzyklus, gemeint sind also die Mechanismen, die einen geregelten Ablauf des Zellstoffwechsels zwischen zwei Zellteilungen möglich machen. Die Konzentration bestimmter Proteine bestimmt hierbei, in welcher Phase des Zellzyklus sich eine Zelle befindet. Die Modulation von Wachstum und Proliferation durch das MYC-System findet hier seinen Dreh- und Angelpunkt, z. B. in der Regulation der Zykline, welche die zentralen Schaltproteine der Zellzyklus-Kontrolle sind (Obaya et al. 1999). Diese klassische Betrachtung von *MYC* als Protoonkogen ist in Abbildung 5 vereinfacht zusammengefasst.



Die bisher in den Vordergrund gestellten Dimensionen von Wachstum und Proliferation werden dem *MYC*-Gen freilich nicht gerecht. Ein anderer wichtiger Aspekt scheint zunächst mit dem Begriff Protoonkogen unvereinbar. Die Fähigkeit von Tumorzellen, aus fehlregulierten oder gar mutierten Genen einen Überlebensvorteil gegenüber gesunden

Zellen zu generieren, führt nur dann zu Tumorwachstum, wenn es gleichzeitig gelingt, die Mechanismen zu überwinden, mit denen das Leben dieser Zelle limitiert wird. Denn auch ohne externen Stimulus oder Ressourcenknappheit kann eine Zelle zu Grunde gehen, dies gar selbst „entscheiden“. Gemeint ist der programmierte Zelltod. Das Vermögen, den programmierten Zelltod zu überwinden, ist eines der wichtigsten Kennzeichen von Krebszellen (Hanahan und Weinberg 2011). Da wirkt es paradox, dass durch *c*-MYC insbesondere die Apoptose (Hoffman und Liebermann 1998), aber auch die Autophagozytose (Tsuneoka et al. 2003) hervorgerufen werden kann. Naheliegender Gedanke, dass es sich etwa um einen Sicherungsmechanismus handelt (Shortt und Johnstone 2012). Diese Sicherung funktioniert vor allem über den potenten und bekannten Apoptose-Induktor p53 (Dai et al. 2006). Durch die wechselseitige Beziehung von p53 und MYC kann also, vereinfacht gesagt, eine Apoptose induziert werden, wenn es zur Akkumulation von p53 kommt. In diesem Sicherungsmechanismus könnte auch der Grund liegen, warum in aggressiven Tumorphänotypen neben *c*-MYC in der Regel auch weitere genetische Alterationen, wie z. B. eben genau eine *p53*-Mutation, nachweisbar sind (Dang 2012).

Weitere MYC-Funktionen ergeben sich aus der Identifizierung der MYC-Zielgene. Konsequenterweise ist dies ein Schwerpunktaspekt der MYC-Forschung, insbesondere der letzten Jahrzehnte. 2006 haben Dang et al. in ihrer Arbeit „The c-Myc target-gene network“ den Zwischenstand aufgearbeitet. Hier wird beschrieben, dass allein *c*-MYC die Transkription von vermutlich etwa 15% aller menschlichen Gene beeinflusst. Die sich daraus ergebende Liste an beeinflussten Zellfunktionen, obschon bereits von Dang auf das Wesentliche reduziert, ist entsprechend umfassend und erweitert die bereits beschriebenen Funktionen im Zellzyklus und bei der Apoptose z. B. auch um mitochondriale Stoffwechselprozesse, die Proteinbiosynthese und die Ribosomgenese. Die klassische Vorstellung eines Transkriptionsfaktors, der spezifisch hoch selektierte DNA-Abschnitte bindet, wird dem nicht gerecht. Vielmehr scheint das MYC-System ein eher unspezifisches Regulationssystem der Transkription zu sein. Knoepfler spricht gar von einer ubiquitären Bindung der MYC-Proteine am Genom (Knoepfler 2007), zumal auch Abschnitte durch MYC gebunden sind, die fern einer eukaryotischen Promotorregion liegen (Bieda et al. 2006). Die biologische Funktion dieser Bindungsstellen ist unklar. Sie sind zumindest Ausdruck davon, dass die MYC-Protein-DNA-Bindung auf einer eher unspezifischen Wechselwirkung mit dem Chromatin, also der DNA und *insbesondere* ihrer Strukturproteine, beruht. Wiederum erweitert dies die klassische Hypothese des Transkriptionsfaktors, der anhand einer spezifischen Promotorregion Targetgene erkennt und deren Transkription induziert bzw. supprimiert. Wie genau es funktioniert, dass MYC offenbar sowohl diese spezifischen als auch unspezifischen Eigenschaften hat, ist Gegenstand der Forschung.

Auch dieser erweiterte Transkriptionsfaktorbegriff erfasst die MYC-Funktionen noch nicht ausreichend. So sind direkte Einflüsse auf mRNA beschrieben, die in der Folge eine vermehrte Translation bewirken (Cowling und Cole 2007). Auch ein direkter regulierender Einfluss auf die DNA-Replikation ist beschrieben (Dominguez-Sola et al. 2007). Besonders der letzte Punkt ist bemerkenswert, da er von dem bisherigen Fokus auf die Genexpression vollkommen unabhängig ist, was die Multidimensionalität des Systems MYC nochmal unterstreicht. Diese enorme Spannweite wird in der Folge, zur Annäherung an die Fragestellung dieser Arbeit, auf die speziellen Aspekte der Berührungspunkte von MYC zu uPAR und dem Pankreaskarzinom hin beleuchtet.

1.2.2 *c-MYC* beim Pankreaskarzinom

Der erste eindrucksvolle Nachweis, dass *c-MYC* von ganz grundsätzlicher Bedeutung bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms ist, gelang Sandgren et. al. 1991. Mithilfe eines bakteriellen Plasmidvektors wurde *c-MYC* mit Genen der bauchspeicheldrüsenspezifischen Elastase und einem Wachstumshormon gekoppelt und dann in Mauseizellen injiziert, sodass transgene Mäuse entstanden, deren Bauchspeicheldrüsenzellen vermehrt *c-MYC* transkribierten. Diese Mäuse wurden dann über mehrere Monate klinisch und histologisch beurteilt. Jede dieser Mäuse erkrankte binnen zwei bis sieben Monaten an schweren Verläufen von Bauchspeicheldrüsenkrebs und jede zehnte Maus wies Metastasen der Leber bzw. des Bauchfells auf (Sandgren et al. 1991).

Selbstverständlich ist die Übertragbarkeit dieses Modells auf die menschliche Karzinogenese des Pankreaskarzinoms äußerst kritisch zu bewerten. Das mittlere Erkrankungsalter beim Menschen (über 70 Lebensjahre) und die Existenz von Vorläuferläsionen (pankreatische intraepitheliale Neoplasien oder PanINs) zeigen, dass dem malignen menschlichen Phänotyp ein chronischer Prozess vorausgeht. Die genetischen Veränderungen werden also sporadisch auf der Grundlage eines gesunden Organs erworben, während in transgenen Mausmodellen schon die Organogenese gestört ist. An dieser Stelle sei an die obige Anmerkung erinnert, dass laut Dang der maligne Phänotyp neben *c-MYC* durch weitere zusammenhängende Genalterationen charakterisiert ist. Beim Pankreaskarzinom steht in diesem Zusammenhang das Kirsten-rat-Sarkom-Onkogen (KRAS) an erster Stelle. KRAS ist in über 90% aller Pankreaskarzinome mutiert und ist an verschiedenen Stellen der Genese des Pankreaskarzinoms von Bedeutung (Di Magliano und Logsdon 2013). Ischenko et al. halten *c-MYC* für einen Haupteinflussfaktor auf das maligne Potential von KRAS (Ischenko et al. 2014).

Zur Annäherung an diese speziellen Fragen der Karzinogenese lohnt sich zunächst der Blick in das gesunde Pankreas. Man nimmt an, dass *c-MYC* für die Proliferation und Differenzierung in der Organogenese von Bedeutung ist, insbesondere für die Spezifizierung in exokrine oder endokrine Zellfunktionen. Es zeigte sich, dass sich

insbesondere die exokrinen Organanteile nicht entwickeln, wenn *c-MYC* inhibiert ist (Nakhai et al. 2008). Umgekehrt mag eine *c-MYC* Überexpression zu vermehrtem bis krankhaftem Wachstum des exokrinen Gewebes führen. Für das dieser Arbeit zu Grunde liegende (exokrine) duktales Adenokarzinom finden sich dafür reichlich Belege. In einer Screening-Untersuchung in Tumorzellen aus Patienten und verschiedenen Zelllinien wurden *copy number variations* (CNV) im Sinne einer Erhöhung der Genkopienzahl von *c-MYC* in 28% der Fälle detektiert (Birnbaum et al. 2011). Bei einer anderen Untersuchung, wurden ähnliche Daten generiert, wobei die genetischen *c-MYC*-Alterationen auch vor dem Hintergrund des konkreten Tumorphänotyps betrachtet wurden. Es zeigte sich eine Proteinüberexpression von MYC in über 40% der Fälle und eine signifikante Korrelation zwischen überexprimiertem Proteinlevel und vermehrter Entdifferenzierung des Tumorgewebes (Schleger et al. 2002).

Erhöhte MYC-Proteinlevel können auch unabhängig von MYC-Genveränderungen auftreten, wie in der Einführung bereits angemerkt wurde, z. B. durch regulierende Proteine. Ein wichtiges Protein ist TGF-beta, sowohl für das System MYC (Orion und Eisenman 2001) als auch für das Pankreaskarzinom (z. B. Bellone et al. 1999). Die Mechanismen dieser Regulation des intakten *c-MYC*, das durch „Upstream“-Proteinveränderungen dann dennoch vermehrt transkribiert wird, sind komplex, umfassen viele Hypothesen und knüpfen an weitere Signalwege an. Unter anderem stellen sie auch eine mögliche Schnittmenge der zwei Protagonisten dieser Arbeit, *uPAR* und *c-MYC* dar.

Grundmuster des TGF-beta-Signals ist eine ligandenabhängige Aktivierung von Transmembranrezeptoren. Die Rezeptoren interagieren wiederum mit intrazellulären Proteinen, die sich zu Komplexen zusammenlagern können und als Transkriptionsfaktoren in den Zellkern wandern und dort die Genexpression regulieren. Die sogenannten SMAD-Proteine sind die klassischen intrazellulären Vertreter dieses Signalweges, es gibt aber auch SMAD-unabhängige TGF-beta-Signalkaskaden, wenn die Rezeptoren mit anderen intrazellulären Proteinen interagieren (Derynck und Zhang 2003). Bezogen auf *c-MYC* bedeutet TGF-beta-Aktivierung klassischerweise eine Repression der *c-MYC*-Expression (Seoane et al. 2001). Beim Pankreaskarzinom sind veränderte SMAD-Proteine sehr häufig (Jones S. et al. 2008), sodass deren Inaktivierung zum Wegfall der Repression führen und MYC-Proteinlevel steigen könnten. Im Wechselspiel von MYC und TGF-beta entscheidet sich hinsichtlich der Tumorentstehung zudem, ob Proliferation von Tumorzellen gedämpft oder gefördert wird (Singh et al. 2010). So lassen sich unterschiedliche Beobachtungen in Bezug auf MYC und das TGF-beta-System ableiten. Die Relevanz für das Pankreaskarzinom zeigt sich in Versuchen, in denen das TGF-beta-System gehemmt wird, mit positiven Auswirkungen auf das Überleben und die Freiheit von Metastasen im Mausmodell (Melisi et al. 2008).

Neben TGF-beta können in ähnlicher Weise andere Signalwege verstärkend auf MYC einwirken, z. B. die schon oben im uPAR-Kapitel angesprochene Januskinase oder der Wnt/beta-Catenin-Signalweg. Auch diese Signalwege zeigen sich beim Pankreaskarzinom häufig verändert, was die *MYC*-Überexpression begünstigt (Skoudy et al. 2011).

Im Hinblick auf einen klinischen Ausblick stellt sich die Frage, ob es lohnend ist, die *MYC*-überexprimierende Subgruppe der Pankreaskarzinompatienten zu identifizieren oder gar individuell zu therapieren. Das allgemeine *MYC*-Dilemma besteht aber darin, dass an der Bedeutung des dysregulierten *MYC*-Systems für die verschiedenen Schritte der Kanzerogenese und auch an der prognostischen Bedeutung letztlich kein Zweifel besteht. Trotz intensiver Forschung mangelt es bisher an Möglichkeiten, hieraus eine spezifische Tumorthherapie abzuleiten (Horiuchi et al. 2014). In Bezug auf das Pankreaskarzinom gibt es in diesem Bereich allerdings Fortschritte, z. B. hinsichtlich *MYC*-koexprimierter Kinasen, die als pharmakologische Zielstrukturen dienen könnten, um *MYC* selbst *druggable* zu machen (Hessmann et al. 2015).

1.3 Hypothesen eines Zusammenhangs von MYC und uPAR

Zunächst ist bis hierhin beschrieben, dass es sich bei *MYC* und uPAR um Kenngrößen zweier heterogener Systeme handelt, die jeweils an unterschiedlichen Stellen der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms Einfluss haben. Darüber hinaus sind Dysregulationen von *c-MYC* und *uPAR* in humanen Kollektiven mit Bauchspeicheldrüsenkrebs häufig und treten nebeneinander auf (z. B. Han et al. 2002).

Beide Systeme beeinflussen eine Vielzahl intrazellulärer Signalkaskaden, zudem stellt uPAR eine Verbindung zu extrazellulären Prozessen her und beeinflusst die Beschaffenheit der direkten Zellumgebung. Betrachtet man die pleiotropen Effekte dieser beiden Gene jeweils isoliert und vereinfacht, stellt man bezogen auf die Tumorbilogie die Möglichkeit eines Synergismus fest: *MYC* moduliert Proliferationsprozesse, die Differenzierung der Zellen und den Zellzyklus und wird gemeinhin eher als Schlüsselfigur der Krebsentstehung betrachtet (Skoudy et al. 2011). uPAR ist durch seine Rolle in der Interaktion von Zelle (Adhäsion und Migration) und Tumorumgebung (Matrixdegradation) Repräsentant eines invasiven und metastasierenden Tumorphänotyps (Dass et al. 2008). Dieser angenommene Synergismus ist der Unterbau der vorliegenden Arbeit. Bisher ist nicht ausreichend nachvollzogen, ob und wenn ja, wo diesem Synergismus ein struktureller Zusammenhang innewohnt, der sich konkret auf den Tumorpatienten auswirkt.

1.3.1 Aktueller Stand

Vereinzelt sind solche strukturellen Zusammenhänge beschrieben. 1997 konnten Rabbani et al. zumindest kurzzeitige Induktionen der Genexpression von *c-MYC* messen, indem sie Osteosarkomzellen mit einem Protein aus dem uPA-System stimulierten. Das Amino-terminale Fragment (ATF) der Urokinase führte kurzzeitig zur vermehrten *c-MYC*-Expression. Diese Beobachtung legte eine wachstumsfaktorähnliche Wirkung des ATF nahe, wobei das ATF die uPAR-bindende Domäne der Urokinase ist. Die Zugabe von *soluble* uPAR schwächte bei Rabbani die stimulierende Potenz des ATF ab. Neben *c-MYC* zeigten sich weitere Onkogene in ihrer Expression stimuliert. Diese Untersuchung könnte also eine mitogene Wirkung des uPA-Systems auf Onkogene wie *c-MYC* nahelegen (Rabbani et al. 1997), ein so direkter Zusammenhang wurde allerdings nicht mehr reproduziert, was die Übertragbarkeit in Frage stellt.

Die umgekehrte Betrachtung eines direkten Zusammenhangs zwischen *c-MYC* und *uPAR* lässt sich aus dem klassischen Blickwinkel auf MYC als Transkriptionsfaktor heraus entwickeln. Es gibt Hinweise, dass die Gene des uPA-Systems Zielgene von MYC-Proteinen sind. 2003 haben O'Connell et al. auf der Basis von Zelllinien der Ratte mit induzierbarer *c-MYC*-Expression eine tabellarische Übersicht erstellt, welche Proteinlevel der Zelle sich *c-MYC*-abhängig verändern. In der langen Liste taucht auch der „urinary plasminogen activator receptor“ unter „genes repressed by Myc“ auf (O'Connell et al. 2003). Dieser direkte Zusammenhang einer gebremsten uPAR-Expression durch aktiviertes MYC bestätigt sich auch in einer anderen Arbeit, wobei sogar postuliert wird, dass dieser Aspekt maßgeblich für die oben beschriebenen tumorprotektiven Eigenschaften von *c-MYC* verantwortlich ist (Alfano et al. 2010). Grob zusammengefasst führe also hochreguliertes MYC zur Repression des uPAS und damit zu weniger Migration und mehr Apoptose. In diesem Zusammenhang ist es spannend, dass auch der wichtige uPAS-Inhibitor PAI-1 bei breit angelegten Screening-Untersuchungen als MYC-Targetgen beschrieben wurde, was das Bild der uPAS-Repression durch aktiviertes MYC ergänzt (Dang 1999).

Solche direkten Zusammenhänge zwischen uPAS und MYC sind um mögliche indirekte Zusammenhänge der Systeme erweiterbar. Oben bereits kurz eingeführt ist die Schnittmenge beider Systeme mit TGF-beta, welches auf MYC inhibitorisch (Seoane et al. 2001) und auf uPAR verstärkend wirkt (Andreasen et al. 1997). Einen besonderen Stellenwert im Wechselspiel von *uPAR* und *c-MYC* scheint zudem Ras einzunehmen. Ras gehört in die Superfamilie der GTP-bindenden Proteine und ist in der Lage, uPAR zu regulieren (Muller et al. 2000). Alfano et al. schreiben diesem Protein eine Schlüsselrolle im MYC-uPAR-Wechselspiel zu. Ist dieses G-Protein dysreguliert, verringert sich der inhibitorische Einfluss von MYC auf uPAR bzw. wird egalisiert, weil Ras seinerseits uPAR hochreguliert und zu aggressiveren Tumorphänotypen führt (Alfano et al. 2010).

1.3.2 Zusammenfassung

Als Fazit lässt sich formulieren, dass diese Zusammenhänge es ermöglichen, eher von einem spezifischen als von einem unspezifischen Zusammenhang zwischen dem System MYC und dem uPAS auszugehen. Im methodischen Setting dieser Arbeit wird mithin weniger nach molekularen Mechanismen gefahndet, als vielmehr die Frage gestellt, ob sich ein uPAR-MYC-Zusammenhang auf das Überleben von Patienten mit Pankreaskarzinom auswirkt, bzw. ob eine reproduzierbare uPAR-MYC-Konstellation eine eigenständige Subgruppe von Patienten mit eigenständigem Risikoprofil darstellt.

Trotz belegbarer Relevanz von uPAR und MYC bei Malignomen bleibt es bisher schwierig, tatsächlich therapeutische Effekte durch das jeweilige „targeting“ dieser Systeme zu erzielen. Ein wechselseitiger Einfluss beider Systeme aufeinander könnte dafür von Belang sein, was als Gegenstand zusätzlicher Forschung in Betracht käme. Gerade bei Pankreaskarzinompatienten sind nach wie vor die Behandlungsoptionen stark limitiert und Ansätze zu einer individualisierteren Tumorthherapie mit der Hilfe molekularpathologischer Pattern werden nach wie vor benötigt.

1.4 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Eine grundsätzliche Systematisierung der Pankreastumoren, gelingt über die Einteilung in endokrine und exokrine Tumoren. Exokrine Tumoren imponieren solide oder zystisch. Das Adenokarzinom des Pankreas (auch PDAC für pancreatic ductal adenocarcinoma) repräsentiert in etwa 95% aller bösartigen Neoplasien der Bauchspeicheldrüse und ist im Rahmen der vorgestellten Systematik Repräsentant der soliden exokrinen Tumorentitäten der Bauchspeicheldrüse. Wegen der Häufigkeit dieser Entität ist es berechtigte Praxis, den Begriff „Pankreaskarzinom“, insbesondere im klinischen Alltag, mit dem PDAC gleichzusetzen.

Für das Epithel des Pankreasgangs wurde hinsichtlich der Genese dieses Karzinoms ein Progressionsmodell etabliert, da regelhaft prämaligne Vorstufen (v. a. PanIN-Läsionen, *pancreatic intraepithelial neoplasia*) des Karzinoms identifiziert werden konnten. Dies bedeutet letztlich, dass mikroskopisch sichtbare dysplastische Veränderungen als Ausdruck akkumulierender Gendefekte dem PDAC vorausgehen, auf deren Basis das invasive Karzinom sporadisch entsteht (Klein et al. 2002).

Abseits dieses besseren Verständnisses der Pathogenese bleiben die Erfolge der letzten Jahrzehnte, die Überlebensperspektiven der Patienten mit dieser Diagnose zu verbessern, sehr bescheiden und der Forschungsbedarf, insbesondere hinsichtlich früherer Diagnose und verbesserter Therapiemodalitäten, ist unverändert hoch.

1.4.1 Epidemiologische Fakten ^[1]

Trauriges Alleinstellungsmerkmal des Pankreaskarzinoms ist seine nach wie vor schlechte Prognose. So wird gerne von einer vergleichsweise eher seltenen Diagnose gesprochen (laut Statistik der Krebsneuerkrankungen in Deutschland Platz 10 bei Männern und auf Platz 6 bei Frauen im Jahr 2012). Allerdings versterben nach wie vor jährlich in etwa ebenso viele Menschen an dieser Erkrankung, wie es Neuerkrankungen gibt. In Niedersachsen erkrankten im Jahre 2012 829 Männer und 786 Frauen an einem PDAC. Im selben Jahr starben 838 Männer und 793 Frauen am Pankreaskarzinom. Epidemiologisch ausgedrückt entspricht also die Inzidenz der Mortalität: nahezu jeder Patient, bei dem diese Diagnose gestellt wird, verstirbt auch an seiner Tumorerkrankung.

Im Vergleich mit allen anderen soliden Tumoren des Menschen hat das PDAC die schlechteste Prognose. Das PDAC wird regional, wie international in der Regel auf Platz 4 aller Krebstodesursachen gelistet. Auch bei der Betrachtung aktuellerer Zahlen und Vorhersagen zeichnen sich keine positiveren Tendenzen ab. Auf Basis der Zahlen der American Cancer Society kommt Narayanan zu dem Ergebnis, dass das PDAC 2020 sogar auf Platz zwei der Krebstodesursachen stehen könnte (Narayanan 2015). Ursachen hierfür sind der lange symptomarme Verlauf, mit später Diagnosestellung bei gleichzeitig aggressivem Wachstum, woraus limitierte kurative Therapieoptionen folgen. Der Anteil jener Patienten, die bei Diagnosestellung, wegen des lokal fortgeschrittenen Stadiums oder der Existenz von Fernmetastasen, als nicht kurativ therapierbar gelten, wird in der Regel mit über 80% angegeben. Das mittlere Überleben dieser Patienten liegt zwischen 4 und 8 Monaten (Krska et al. 2015). Die vereinfachte Unterscheidung der PDAC Patienten in zwei Gruppen, also primär kurativ (ca. 15-20%) und primär palliativ (>80%) ist auch für diese Arbeit im Hinterkopf zu behalten, da die Patienten der vorliegenden Studie zu jenen Ausnahmefällen gehören, denen ein kuratives Therapiekonzept vorgeschlagen werden konnte. Statistisch verbessert dies deutlich die Prognose mit einem mittleren Überleben von 18-27 Monaten (Krska et al. 2015). Dennoch steht das schlechteste Fünf-Jahres-Überleben aller soliden Tumoren über allem. Je nach Autor und betrachtetem Zeitraum wird es mal mit mehr oder weniger als 5% angegeben (z. B. Le et al. 2016). Die GEKID-Zahlen für Niedersachsen jenes Zeitraumes, der näherungsweise das in dieser Studie einbezogene Kollektiv betrifft, beschreiben ein Fünf-Jahres-Überleben im Jahr 2011 von 6,4% bei den Männern und 9,3% bei den Frauen.

¹ Die in diesem Kapitel aufgeführten Zahlen stammen aus den online-Portalen der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID), <http://www.gekid.de/> und des Zentrums für Krebsregisterdaten am Robert Koch-Institut, Gesundheitsberichterstattung des Bundes www.krebsdaten.de/, Zugriffsdatum: 27.01.2016

1.4.2 Risikofaktoren

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms gilt gemeinhin als unklar. Das einleitend erwähnte Progressionsmodell des PDAC geht von Genveränderungen aus, die über die Zeit akkumulieren (Hidalgo 2010). Insofern ließen sich zum einen erworbene Risikofaktoren identifizieren, die im Wesentlichen den Lebensstil betreffen und zum sporadischen Pankreaskarzinom führen können. Zum anderen führen deutlich seltener hereditäre Konstellationen zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko.

1.4.2.1 Erworbene Risikofaktoren

Das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland liegt bei 71 Jahren bei den Männern und bei 75 Jahren bei den Frauen, zunehmendes Alter stellt also einen eigenständigen, nicht beeinflussbaren Risikofaktor dar (Kaatsch et al. 2015). Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren wird in erster Linie der Zigarettenkonsum gezählt. Beispielhaft erwähnt sei eine große prospektive Studie, die zu dem Schluss kommt, dass allein durch Beendigung des Tabakkonsums 25% der jährlichen PDAC-Todesfälle verhindert werden könnten (Fuchs et al. 1996). Auch Adipositas gilt als gesicherter beeinflussbarer Risikofaktor (Larsson et al. 2005), wobei insgesamt die Aspekte eines Metabolischen Syndroms eine Rolle zu spielen scheinen. Eindrückliche Ergebnisse hierzu ergaben sich auf Basis einer großen Kohortenstudie, die zusammenfassend formuliert, dass 1% aller Patienten, die älter als 50 Jahre alt sind und die Diagnose Typ 2 Diabetes gestellt bekommen, innerhalb von drei Jahren am PDAC erkranken werden (Chari et al. 2005).

Bei der chronischen Pankreatitis nimmt das Krebsrisiko mit der Erkrankungsdauer zu. In der aktuellen S3 Leitlinie des Exokrinen Pankreaskarzinoms (Deutsche Krebsgesellschaft und Deutsche Krebshilfe, AWMF 2013) wird auf Basis der Literaturrecherche eine kumulative Inzidenz von etwa 1% nach 5 Jahren und bis zu 4% nach 20 Jahren angenommen. Außerdem wurden Assoziationen mit Infektionserkrankungen festgestellt, insbesondere *Helicobacter Pylori* und Hepatitis B werden immer wieder diskutiert. Aktuell wurde vor allem der Einfluss von *Helicobacter Pylori* in einer großen Metaanalyse verschiedenster Studien bestätigt (Maisonneuve und Lowenfels 2015).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die wirklich evidenten Risikofaktoren dieses Kapitels einen unspezifischen Charakter in dem Sinne haben, dass sie als allgemeine Risikofaktoren für Krebserkrankungen gelten. Konstellationen des metabolischen Syndroms, Tabakkonsum und chronische Infektionen sind bei den meisten bösartigen Erkrankungen ein ätiologischer Faktor und führen beim Pankreaskarzinom insofern nur schwer zu einem besseren Verständnis der Pathogenese und noch weniger zu spezifischen Konzepten, wie Biomarkern oder Therapeutika. Dies spiegelt sich auch in den präventiven Empfehlungen der bereits zitierten S3-Leitlinie wider, die ebenfalls allgemeiner Natur sind (Bewegung, moderater Alkoholkonsum, obst- und gemüsereiche Ernährung).

1.4.2.2 Hereditäre Risikofaktoren

In etwa 5-10% der PDAC-Fälle liegt bei einem nahen Angehörigen ebenfalls ein Pankreaskarzinom vor (Shi et al. 2009). Zu unterscheiden sind hierbei im Wesentlichen zwei Konstellationen. Zum Ersten kann es zur familiären Häufung sporadischer Fälle kommen (*sporadic pancreatic cancer kindred*, SPC). Davon abzugrenzen ist das Familiäre Pankreaskarzinom, welches klar definiert ist als das Auftreten von Pankreaskarzinomen bei zwei oder mehr erstgradig Verwandten ohne Hinweise für eine syndromale Genese (*familial pancreatic cancer kindred*, FPC). Mit syndromaler Genese ist eine eigenständige Unterscheidung gemeint. Es sind nämlich eine Reihe von Gendefekten beschrieben, die als Tumorsyndrome imponieren und mit einem erhöhten Risiko einhergehen, auch ein Pankreaskarzinom zu entwickeln.

Hierzu gehört in erster Linie das autosomal-dominant vererbte Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS), das die Entwicklung zahlreicher Malignome im Gastrointestinaltrakt begünstigt. Das kumulative Risiko für einen 70-jährigen PJS-Patienten an einem Pankreaskarzinom zu erkranken liegt bei 26% (Korsse et al. 2013).

Ähnliche Zahlen finden sich beim familiären atypischen Muttermal Melanom Syndrom (FAMMM-Syndrom). Diese Erkrankung ist in der Regel mit einer Keimbahnmutation im *p16/CDKN2A*-Gen assoziiert und geht mit einem Lebenszeitrisiko für das PDAC von 17% einher (Vasen et al. 2000).

Bekanntere Keimbahnmutationen als diese Raritäten betreffen den familiären Brust- und Eierstockkrebs bzw. die *breast cancer genes* BRCA1 und BRCA2. Insbesondere für BRCA2-Mutationen wurde in einer großen Studie, die Tumorzinzidenzen bei Verwandten von BRCA-Gen-mutierten Indexpatienten in den USA untersuchte, ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms gefunden, während das Risiko für die Entwicklung anderer Malignome sogar verringert war (Streff et al. 2016).

Die zwei bekanntesten Tumorsyndrome, die für das kolorektale Karzinom prädisponieren, die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) sowie das hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) zeigen ebenfalls in verschiedenen Studien ein Risikoprofil für die Entwicklung eines PDAC. Beim FAP ist die Datenlage schwach und widersprüchlich, so fand sich z. B. in einer aktuellen Studie an 127 FAP-Patienten über einen Beobachtungszeitraum von 19 Jahren nicht ein einziger Fall eines exokrinen Pankreaskarzinoms (Moussata et al. 2015), was frühere Beobachtungen in Frage stellen dürfte. So beruft sich die aktuelle S3-Leitlinie zum Exokrinen Pankreaskarzinom auf eine Studie von Giardiello aus dem Jahr 1993, die ein erhöhtes Relatives Risiko von 4,5 für FAP-Patienten postuliert. Die Datenlage beim HNPCC ist eindeutiger und studienkonsistent. Kastrinos et. al. geben z. B. ein 8,6-fach erhöhtes Risiko im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung an (Kastrinos et al. 2009).

Weitere Erkrankungen, die als Erbkrankheiten durch Gendefekte für verschiedene Tumore prädisponieren und immer wieder auch als relevant für ein erhöhtes Pankreaskarzinomrisiko diskutiert werden, seien nur der Vollständigkeit halber erwähnt. So finden sich in der bereits mehrfach erwähnten Leitlinie zum Exokrinen Pankreaskarzinom, mit entsprechend weiterführenden Literaturangaben, Kommentare zum Li-Fraumeni-Syndrom, zum von-Hippel-Lindau-Syndrom, zur Fanconi-Anämie und auch zu der Neurofibromatose.

Eine Sonderform der chronischen Pankreatitis ist noch zu nennen. Bei der Hereditären Pankreatitis führen Gendefekte im Rahmen der exokrinen Funktionen meist bereits im Kindesalter zu entzündlichen Verläufen mit konsekutiver Neigung zur Pankreasinsuffizienz. Das Karzinomrisiko ist in diesem Fall deutlich erhöht, mit einem kumulativen Risiko von etwa 40% (Lowenfels et al. 1997).

Für alle bis hierhin genannten Erkrankungen sind die ursächlichen Gendefekte gut beschrieben. Es ist aber anzunehmen, dass der Großteil der hereditären Pankreaskarzinome auf andere Gendefekte zurückzuführen ist, deren Erforschung noch aussteht. Insbesondere durch verbesserte Methoden der DNA-Sequenzierung konnten einige verdächtige Gene in den letzten Jahren identifiziert werden, was zu einem besseren Verständnis des hereditären Pankreaskarzinoms geführt hat. Eine Übersicht über etablierte und verdächtige Gendefekte im Bereich des Hereditären Pankreaskarzinoms liefert z. B. eine Arbeit von Klein aus dem Jahr 2012 (Klein 2012).

Die Abgrenzung des Hereditären Pankreaskarzinoms als SPC oder FPC findet letztlich über den Stammbaum statt. Sobald zwei erstgradig Verwandte betroffen sind, handelt es sich um ein FPC. Wichtig ist die Unterscheidung dieser beiden Gruppen hinsichtlich ihres individuellen Risikoprofils. Beim Auftreten eines SPC erhöht sich das Risiko für ein Pankreaskarzinom aller erstgradig Verwandten abhängig vom Erkrankungsalter des Indexpatienten um das 2-fache oder 3-fache (McWilliams et al. 2005). Liegen die Kriterien für ein FPC vor, so liegt dieses Risiko je nach Anzahl der erkrankten Familienmitglieder zwischen einer Erhöhung um das 18-fache bis 57-fache (Tersmette et al. 2001). Das FPC ist keine Rarität. Beispielhaft sei eine Studie mit 766 Patienten erwähnt, denen die Diagnose Pankreaskarzinom gestellt wurde. Hier erfüllten 9% der Patienten die FPC-Kriterien (Humphris et al. 2014).

Abschließend sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Durchführung von Früherkennungsmaßnahmen weder im Bereich aller hier beschriebenen Risikoprofile noch im Bereich der Allgemeinbevölkerung routinemäßig empfohlen wird, da es an Studien mangelt, die erfolversprechende Ergebnisse zeigen konnten (Deutsche Krebsgesellschaft und Deutsche Krebshilfe, AWMF 2013).

1.4.3 Pathogenetische Aspekte

Mikroskopisch präsentiert sich das PDAC klassischerweise im Sinne von ungeordnet infiltrierenden Strukturen mit drüsigem bis gangartigem Aussehen, wobei die direkte Tumorumgebung zellarm und bindegewebig imponiert. Diese desmoplastische Reaktion ist auch für die makroskopisch derbe Konsistenz und gelb-gräuliche Erscheinung maßgeblich. Das Zytoplasma der Tumorzellen wirkt eosinophil, ggf. klar, die Zellkerne sind pleomorph und häufig deutlich vergrößert. Diese Pleomorphie nimmt in der Regel zu, je schlechter das Karzinom differenziert ist, die drüsigen Strukturen erscheinen bei schlechterer Differenzierung kleiner und irregulär (siehe Abbildung 6a).

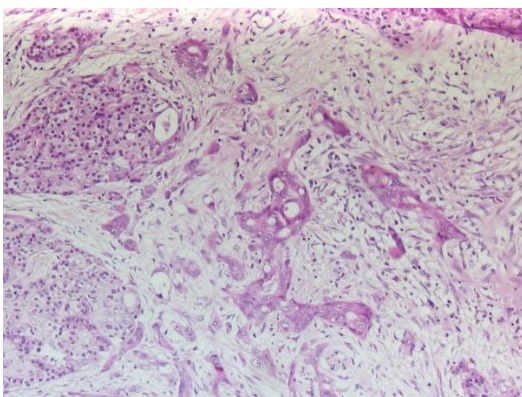


Abbildung 6a

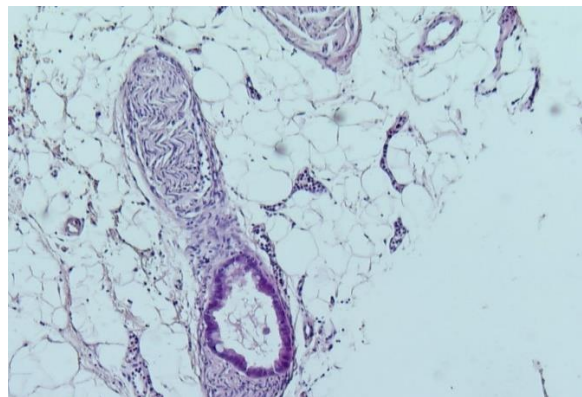


Abbildung 6b

Quelle: Fotografiert von F.Fuchs

6a: In der linken Bildhälfte vereinzelte Nester von endokrinen pankreatischen Inselzellen, Bildmitte von Invasiven Tumorzellen dominiert, besonders rechts charakteristische desmoplastische Reaktion mit amorphem Bindegewebe; **6b:** Im Verlauf eines peripheren Nervs zeigt sich in der unteren Bildmitte eine drüsige Struktur, die im Nervengewebe ein Lumen erzeugt im Sinne einer neuralen Invasion durch Tumorzellen.

Ein besonderes Merkmal der Invasivität ist die perineurale Invasion der Tumorzellen, die man regelmäßig sehen kann (siehe Abbildung 6b). Solche Zeichen der Invasivität sind wichtig für eine der wesentlichen Differentialdiagnosen, die Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie (PanIN).

PanIN-Läsionen sind morphologische Beschreibungen des Drüsenepithels, die mit zunehmender Dysplasie in verschiedene Grade eingeteilt werden. Da man in den letzten Jahrzehnten diesen Dysplasien charakteristische Genmutationen zuordnen konnte, ist die PanIN-Läsion eine mittlerweile gut beschriebene Vorläuferläsion des Pankreaskarzinoms. Die hochgradige Dysplasie ist demnach ein Übergangsstadium in das invasive Karzinom.

Analog zu dem Problem, dass das PDAC ein zunächst asymptomatisches Krankheitsbild ist, gelten auch die PanIN-Läsionen als asymptomatisch. Neben der PanIN gibt es noch weitere Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms (z. B. die Intraduktal Papillär Muzinöse Neoplasie und die Muzinös Zystische Neoplasie), die an dieser Stelle allerdings nicht näher erläutert werden.

PanIN entstehen in der Regel in den intralobulären Drüsengängen. Minimale dysplastische Veränderungen dieses Epithels werden als PanIN Grad 1 bezeichnet. Grad 1A für Zellen die isoprismatisch imponieren, einen basalen Zellkern haben und apikal des Nucleus reichlich Muzin aufweisen. Bei Grad 1B sind die Zellen nicht flach, sondern eher hochprismatisch, der Gang hat teilweise papillären Charakter. Moderate Dysplasien werden als PanIn Grad 2 bezeichnet. Der Gang imponiert regelhaft papillär und es treten Kernatypien hinzu, insbesondere die Vergrößerung, die Hyperchromasie und der Verlust der Polarität. Verstärken sich diese Kernatypien zusätzlich (z. B. Mitoseformationen, Kernunregelmäßigkeiten) oder kommt es zu Nekrosen und verstärkten Abschnürungen von Epithelzellen in das Lumen, so sollte man höhergradige Dysplasien diagnostizieren, die PanIN Grad 3. Insbesondere die Invasion ist dann die entscheidende histologische Unterscheidung zum Karzinom, was bedeutet, dass die Umgebung der Läsion genau betrachtet werden muss, insbesondere sollte die Basalmembran intakt sein. Damit ist in diesem Abschnitt das im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandte PanIN-Diagnosevorgehen beschrieben, welches an die gängige Klassifikation angelehnt ist, die 2001 erstmals von Hruban veröffentlicht wurde (Hruban et al. 2004). Abbildung 7a,b zeigen exemplarische Beispiele aus dem vorliegenden Kollektiv, jeweils von gesundem exokrinen Drüsengewebe umgeben.

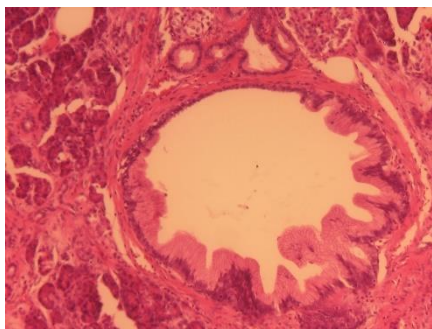


Abbildung 7a

Quelle: Fotografiert von F.Fuchs

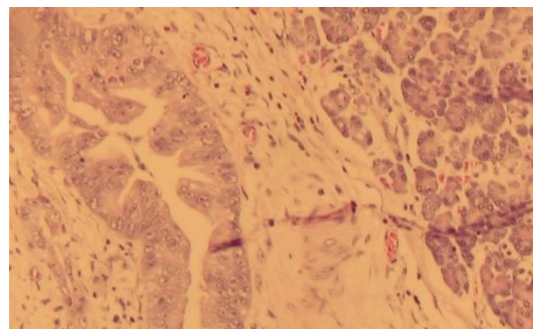


Abbildung 7b

7a: Man sieht basale Zellkerne, apikal reichlich aufgelagertes Muzin und den teilweise papillären Wuchs, insbesondere im rechten unteren Bildrand. Entspricht einer PanIN 1B **7b:** Die Zellkerne der dysplastischen Drüse im linken Bildrand schnüren sich vermehrt ins Lumen ab und zeigen teilweise Kernatypien. Entspricht einer PanIN Grad 2.

Von den genetischen Veränderungen, die mit dieser dysplastischen Progression einhergehen, gelten einige als charakteristisch. So gehen Frühdysplasien mit verkürzten Telomeren, als Zeichen der chromosomalen Instabilität (Matsuda et al. 2015) und insbesondere der Aktivierung des KRAS-Onkogens einher. Im weiteren Verlauf kommt es zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *CDKN2A* (p16). Als besonderer Ausdruck hochgradiger Dysplasien gilt die zusätzliche Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53. Eine gute Übersicht zu diesen und anderen Gendefekten im Rahmen der PanIN mit Erläuterungen und Bildern findet sich bei Distler et.al. (2014).

Im Rahmen dieses Progressionsmodells wird die Komplexität der Genveränderungen beim Pankreaskarzinom angedeutet. In einer 2008 veröffentlichten Studie wurde eine vergleichende Genomanalyse an 24 PDAC-Patienten durchgeführt. Die Genmutationen wurden quantifiziert und in einen funktionellen Zusammenhang gesetzt. Die Autoren dieser Studie postulieren, dass sich im Durchschnitt 63 relevante Mutationen pro Patient finden lassen, die sich ihrerseits einordnen lassen in ein System aus 12 Kernprozessen konsekutiv fehlregulierter Zellfunktionen. In dieser Studie wird also das PDAC als hochkomplexe genetische Erkrankung demaskiert, z. B. im Vergleich zu einigen Neoplasien des Blutes, die teilweise von sehr wenigen onkogenen Veränderungen angetrieben zu sein scheinen (Jones S. et al. 2008).

Im Hinblick auf *uPAR*-Amplifikationen wurden in der hier bereits zitierten Studie von Hildenbrand aus dem Jahr 2009 bei 50 PDAC-Patienten sowohl in PanIN-Läsionen als auch in invasiven Tumorzellen *uPAR*-Amplifikationen gefunden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher auch PanIN-Läsionen, neben der Betrachtung von invasiven Tumorzellen, auf *uPAR*-Amplifikationen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Das Patientenkollektiv

Bei Erstellung des Kollektivs wurde auf eine breit gefächerte Verteilung des krankheitsspezifischen Überlebens (*disease specific survival*, DSS) geachtet und es wurden bewusst Patienten mit besonders kurzem und besonders langem DSS integriert. Es wurden ausschließlich Patienten eingeschlossen, die auf Grund der vergleichbaren individuellen Gesamtkonstellation ein primär kuratives Therapiekonzept erfahren hatten.

So konnten insgesamt 60 Patienten aus dem Kollektiv der CONKO005/006-Studien ausgewählt werden, die zwischen den Jahren 2006 und 2012 an der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) wegen eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas in Behandlung waren. Bei allen diesen Patienten wurde in kurativer Intention die chirurgische Resektion in der Klinik für Viszeralchirurgie der UMG (Prof. M. Ghadimi) und die anschließende klinische Verlaufsbeobachtung (PD Dr. J. Gaedcke) durchgeführt. Alle eingeschlossenen Patienten hatten bei Studieneinschluss schriftlich ihr umfassendes Einverständnis in die Verwendung des Tumormaterials für begleitende wissenschaftliche Untersuchungen erteilt (Aktenzeichen 24/4/04).

Alle ausgewählten Tumoren waren im UICC-Stadium IIB (pT3 pN1 M0) und hinsichtlich des Differenzierungsgrades entweder als G2 oder G3 beurteilt, also mäßig oder schlecht differenziert. 33 Patienten waren männlich und 27 Patienten weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 69,3 Jahre wobei der jüngste Patient 50 Jahre alt war und der älteste Patient 86 Jahre.

Das mittlere Überleben betrug 21,5 Monate. Insgesamt bildeten Patienten mit einem DSS zwischen 12 und 30 Monaten die größte Gruppe (n=29). Aber auch Patienten mit einem DSS über 30 Monaten (n=11) und Patienten mit einem DSS unter 12 Monaten (n=20) konnten in das Kollektiv aufgenommen werden. In einer aktuellen Publikation werden die Daten von 5 europäischen Kollektiven verglichen. Hinsichtlich des mittleren Überlebens wird eine Spannweite zwischen 11 und 25,7 Monaten für diese vergleichbaren Patienten angegeben (Carrato et al. 2015).

Der Tag der Operation bezeichnet den Beginn, die letztmalige Dokumentation des Patientenkontaktes im Rahmen der Nachsorge bzw. das Versterben das Ende der Beobachtung. Für den Einschluss in das Kollektiv ist insofern der Umstand eines gut dokumentierten postoperativen Prozederes ebenfalls maßgeblich, sodass beispielsweise der Ausschluss eines Falls mit perioperativem Versterben gewährleistet ist. Alle ausgewählten

Patienten wurden auch in andere, multizentrische Studien (Conco-005 oder Conco-006) eingeschlossen und sind daher studienkonform geführt. Die engen Einschlusskriterien dienten nicht nur der Minimierung von Störvariablen, sondern vor allem sollte der Erkenntnisgewinn bei dem kleinen Anteil derjenigen Patienten mit Langzeitüberleben erzielt werden.

2.2 Untersuchungsmaterial

Im Archiv des pathologischen Institutes der Universitätsmedizin Göttingen liegen nach standardisierten Kriterien konservierte Gewebsresektate vor und können über die individuelle Fallnummer den Metadaten der ausgewählten Patienten zugeordnet werden.

Für Fragestellungen, die die jeweilige genetische Anlage betreffen, im Falle des hier beschriebenen Projektes vorrangig also die DNA-Abschnitte des Urokinase-Plasminogen-Aktivator Rezeptors und des Transkriptionsfaktors *c-MYC*, ist demzufolge auch Patienten-DNA umfanglich archiviert.

Für die Untersuchung dieser DNA-Abschnitte im Tumor selbst eignet sich in dieser Konstellation die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung an Formalin-fixiertem-Paraffin-eingebetteten Gewebeproben (oder FFPE-FISH).

2.2.1 Formalin-Fixed Paraffin-Embedded-Tissue (FFPE)

Die Fixierung und Einbettung von Gewebe mittels Formalin und Paraffin ist Standardmethode in der Pathologie und ermöglicht die zeitlich unbegrenzte Konservierung und histologische Aufarbeitung von Geweben.

Beim Pankreaskarzinom handelt es sich um große Resektate, die in der Regel mehrere Organe umfassen. In der Pathologie wird das Resektat dann makroskopisch beurteilt und nach onkologischen Kriterien zur Dokumentation und Ausbreitungsbestimmung des Tumors (Resektatränder, Lymphknoten etc.) zugeschnitten. Das zugeschnittene Gewebe wird entwässert und in Paraffin ausgehärtet. Von diesem Paraffinblock können dann mit einem Mikrotom schichtweise Schnitte angefertigt werden, die man auf einen Objektträger (OT) aufbringen und für histochemische und immunhistochemische Färbungen oder auch für In-situ-Hybridisierungen verwenden kann. Als Referenz diente die HE-Färbung, in der die Tumorzellen zweifelsfrei identifiziert werden konnten, nach Möglichkeit verbunden mit strukturellen Orientierungspunkten, die dann im Bereich der FISH-Analyse oder der immunhistochemischen Auswertung erneut als Erkennungszeichen dienten.

2.3 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Durch lichtmikroskopische Diagnostik wurden Zellen eines ausgewählten Gewebeabschnittes (zum Beispiel ein mit Tumorzellen infiltrierter Lymphknoten) identifiziert. Hinsichtlich der Untersuchung von bestimmten DNA-Sequenzen genau dieser Zellen bietet die FISH die Möglichkeit, diese mikroskopische Morphologie des Gewebes im Rahmen der weiteren Experimente zu erhalten und erneut zu identifizieren. Abwandlungen auf DNA-Ebene werden also in der intakten Architektur des Gewebes detektierbar.

2.3.1 Prinzip

Wesentlich für das FISH-Verfahren ist die Möglichkeit, die Bindungsqualität zweier komplementärer DNA-Stränge zueinander experimentell zu beeinflussen, also gezielt DNA in Einzelstränge aufzuspalten (Denaturierung) und wieder zur Bindung zu bringen (Hybridisierung). Dadurch lassen sich Versuchsanordnungen entwickeln, die letztlich die Bindung einer technisch synthetisierten Nukleinsäure-Sequenz an einen spezifischen Zielabschnitt der DNA eines Gewebes ermöglichen. Diese synthetisierten Nukleinsäure-Sequenzen werden im Zusammenhang mit der FISH als Sonden bezeichnet und sind so aufgebaut, dass ihre Basenfolge zu der Zielsequenz im Gewebe komplementär ist. Die Sonden werden in hoher Konzentration mit dem zu untersuchenden Gewebe zusammengebracht, dessen Doppelstrang-DNA dann experimentell denaturiert wird. Dann werden Bedingungen zur Hybridisierung geschaffen und die Sonden binden die Ziel-DNA.

An die Sonden gekoppelte Fluorchromfarbstoffe machen diese fluoreszenzmikroskopisch sichtbar. Durch eine erfolgreiche Hybridisierung wird schlussendlich der zur Sonde komplementäre DNA-Abschnitt des Gewebes markiert, wobei sich bestimmte genetische Aberrationen identifizieren lassen.

Die FISH ist mittlerweile ein Standardverfahren molekularpathologischer Diagnostik und bei vielen Fragestellungen des klinischen Alltags eine gut etablierte Methode. Klassische Beispiele sind numerische Chromosomenanomalien, z. B. in der Pränataldiagnostik (Hulten et al. 2003) und zytogenetische Aspekte hämatologischer Erkrankungen und solider Tumoren (Wan und Ma 2012). Diese zytogenetischen Aspekte umfassen u. a. die Sicherung einer Diagnose (z. B. erbliches Retinoblastom, chronisch myeloische Leukämie), die Prognose (z. B. bestimmte Trisomien bei verschiedenen Leukämien) bzw. die Therapie (*Her-2/neu* Amplifikation bei Brustkrebs) dieser Erkrankungen.

2.3.2 Sonden

Das in obiger Einführung angedeutete Spektrum der FISH-Diagnostik ergibt sich aus der Registrierbarkeit bestimmter chromosomaler Aberrationen durch den systematischen Einsatz und die farbliche Unterscheidung der verschiedenen Sondentypen. Sonden werden künstlich hergestellt. Der Produktionsprozess umfasst zum einen die Amplifikation einer Ausgangs-DNA, zum anderen die Markierung der beteiligten Nukleotide mit fluoreszenzmikroskopisch detektierbaren Molekülen. Man unterscheidet repetitive DNA-Sonden, lokusspezifische Sonden und Painting-Sonden (vgl. z. B. Moog und Rieß 2014). Die Auflösungsgrenze liegt in der Regel im zwei- bis dreistelligen Kilobasenbereich (Navin et al. 2006).

Lokusspezifische Sonden werden auch LSI (*locus specific identifiers*) genannt und sind für die vorliegende Arbeit verwendet worden. Damit lassen sich Aberrationen bis zur Ebene des einzelnen Gens darstellen, hier die Amplifikation von *uPAR* und *c-MYC*. In der Regel wird bei der LSI-Sonde ein Dual Color-System gewählt. Die Sonde bindet nicht nur die DNA-Zielregion, sondern auch eine weitere Region mit einer zweiten Farbe. Hierdurch wird die Interpretation der sichtbaren Fluoreszenzpunkte bestimmt. LSI-Sonden, die zur Amplifikationsdetektion benutzt werden, haben z. B. häufig ein Dual Color-System, das neben dem Target das Zentromer des gleichen Chromosoms abbildet. Hierdurch lassen sich Genamplifikationen von chromosomalen Polysomien unterscheiden.

2.3.2.1 *uPAR*-Sonde

Bei dieser Sonde der Firma Kreatech handelt es sich um eine Dual Color-Sonde, die zwei Bereiche des Chromosoms 19 abdeckt (genaue Bezeichnung: Poseidon Repeat Free uPAR (19q13.3)/19p13.2 Dual Color probe). Eine 400 kb umfassende Oligonukleidsequenz ist mit einem grünen Fluoreszenzmolekül gekoppelt, eine weitere 500 kb umfassende Oligonukleidsequenz ist mit einem roten Fluoreszenzmolekül gekoppelt. Die grün markierte Sonde ist komplementär zum Abschnitt 19q13.3 und beinhaltet das in diesem Abschnitt befindliche Gen *PLAUR*, hybridisiert also das Zielgen. Die rot markierte Sonde bindet spezifisch eine Sequenz auf dem p-Arm des Chromosoms 19 und dient als interne Kontrolle.

2.3.2.2 *c-MYC*-Sonde

Auch die *c-MYC*-Amplifikationssonde der Firma Cytovision ist eine direkt gelabelte Dual Color Sonde (genaue Bezeichnung: ZytoLight® SPEC CMYC/CEN 8 Dual Color Probe). Auch hier ist ein grün markierter Nukleidstrang komplementär zur Region mit dem Zielgen *c-MYC* (hier 8q24.21). Die rötlich fluoreszierende zweite Sequenz dient wiederum als Kontrolle und bindet in diesem Fall repetitive Sequenzen des Zentromers des 8. Chromosoms.

2.3.3 Durchführung

Verwendete Materialien	Hersteller, Firma, etc.
DAPI	Actinomycin D-Mannitol und DAPI der Firma Sigma-Aldrich, Vectashield Mounting Medium der Firma Vector
Destilliertes Wasser	Millipore milli-Q Direct 8, Firma Merck Millipore
Deckgläser	Firma Menzel, Größen in mm: 24x32, 15x15, 18x18, 24x24
Ethanol	96% vollvergällt und 99% vergällt mit MEK, Firma Chemsolute ThGeyer
FISH-Automat, Prozessor	Abbot VP 2000
Fixogum	Firma Marabu, Art. Nr. 290110000
Formalin	Büfa Chemikalien, fertig gepuffert
Hybridizer	Abbot Molecular ThermaBrite Stat Spin, Modell S500-24
Klingen	feather microtome blades a53 type
Kühlplatte	Medite COP 30
Kühlschrank	Liebherr Modell CUP 3513 Index 20B/001
Mikroskop	LEICA DM 5500B mit externer Fluoreszenzlichtquelle EL 6000
Mikrotom	Microm HM 400
NP-40	Fluka Biochemica, Nonidet P 40 Substitute
Objektträger	Süsse Labortechnik: 76 x 26 x 1,1mm, gebrauchsfertig
PC	HP Workstation Z400 und LCD Bildschirm NEC 2490 WUXI 24"
Pipette	Eppendorf Reference Pipetten, versch. Größen
Pipettenspitze	Biosphere Filter Tips Firma Sarstedt und Tip One, Repel-Polymer Technology
Posthybridisierungspuffer	SSC 20x Abbot plus destilliertes Wasser und ggf. NP-40
Pretreatmentlösung	Abbot VP 2000 Pretreatment Reagent
Proteaselösung	Abbot VP2000 Protease Buffer (0,01 N HCl)
Salzsäure	AppliChem Pancreac ITW Companies, Maßlösung
Software, Kamera	DiskusFire Wire, Firma Hilgers ver 4.81.1383 mit Kamera, Hitachi HV F202
SSC	20x SSC 500g Abbot
Tischzentrifuge	Starlab Minizentrifuge SN 13030737
Vortexmischer	Vortex Genie 2 Scientific Industries G560E
Wärmeschrank	Memmert WS Typ UNB 400
Wasserbad	Medax Warmwasserbad mit Streckplatte, Typ 22721 Nagel GmbH
Xylol	Chemsolute ThGeyer Xylol 0,86g/ml

Tabelle 1: benötigte Chemikalien und Geräte

Abseits der vielen individuellen Anforderungen an die Versuchsdurchführung, die sich aus den Eigenheiten des gewählten Gewebes und der gewählten Sonde ergeben, läuft jedes FISH-Protokoll in drei aufeinander aufbauenden Teilschritten ab, bevor es zur mikroskopischen Begutachtung kommt: Aufbereitung, Hybridisierung, Auswaschen.

Bei der Aufbereitung wird der FFPE-Gewebsschnitt chemisch entparaffiniert, alkoholisch entwässert und störende Proteine werden mittels Säure und Enzymen verdaut. Im Rahmen dieser Arbeitsschritte wird das Material wiederholt mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Waschpuffern neutralisiert. So wird die in den Zellkernen befindliche DNA für die Reaktion mit der FISH-Sonde demaskiert.

Die Sonde wird dann mit der DNA des so präparierten Untersuchungsmaterials unter wechselnden thermischen Bedingungen inkubiert. Die genaue Steuerung von Zeit und Temperatur ist je nach Protokoll unterschiedlich, dient aber immer der optimalen Denaturierung und Hybridisierung von Sonden- und Ziel-DNA.

Zuletzt kann nicht gebundenes Sondenmaterial ausgewaschen werden, sodass nur die tatsächlich hybridisierten Sonden unter dem Mikroskop sichtbar werden.

Die spezielle Ausgestaltung dieser Teilschritte im Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden beschrieben. Das Protokoll wurde teilautomatisiert mittels eines Hybridisierungs-Prozessors (Abbott VP 2000) durchgeführt.

Tag 1

1.

Für die Anfertigung der Schnitte vom Paraffinblock wurde eine Schnittdicke von 3 Mikrometern am Mikrotom angestrebt. Die dünnen Paraffinscheiben wurden mit Hilfe eines Wasserbades gestreckt, auf einen sauberen OT aufgebracht und makroskopisch auf Vollständigkeit überprüft. Das Präparat wurde über Nacht aufrecht in einen Wärmeschrank gestellt (56 °C), damit möglichst viel Paraffin schonend ablaufen konnte. Um später Sondenmaterial zu sparen, wurde nach Möglichkeit der relevante Bereich mit einem Diamantmesser auf der OT-Rückseite umrundet.

2.

Die chemische Entparaffinierung erfolgte durch das Lösungsmittel Xylol in drei verschiedenen Gefäßen für jeweils 10 Minuten. Darauf wurde das Präparat in zwei Gefäßen mit 100% Ethanol jeweils 5 Minuten lang von dem Lösungsmittel befreit und über eine absteigende Alkoholreihe (96%, 80%, 70% für jeweils 1 Minute) sukzessive rehydriert und im Anschluss an der Luft getrocknet (5 Minuten bei Raumtemperatur).

Die aufwändige Entparaffinierung ist eine Besonderheit der FFPE-FISH, weil das hydrophobe Paraffin die Sonde sonst verdrängen würde. Die nächsten Schritte dienen vorrangig der Erhöhung der Permeabilität durch Proteinverdau.

3.

Die entparaffinierten Schnitte wurden nun 20 Minuten in 0,2 molarer Salzsäure eingetaucht. Für die Salzsäure ist in diesem Zusammenhang insbesondere ein DNA demaskierender Effekt durch seine Wirkung auf Histonproteine beschrieben. Diese und andere gelöste Proteine würden die Hybridisierung stören und wurden anschließend mit destilliertem Wasser (3 Minuten) und Waschpuffer (zweifach konzentrierter SSC-Puffer für 3 Minuten) entfernt.

Darauf folgte das Eintauchen in die Pretreatment Solution für 30 Minuten bei 80 °C. Auch dieser Schritt ist insbesondere für Paraffingewebe etabliert, die Lösung enthält Natrium Thiocyanat und hat eine spaltende Wirkung auf die teils formalininduzierten Disulfidbrücken, was proteolytische Prozesse erleichtert und sich positiv auf die FISH auswirkt (Hopman et al. 1991). Hierauf erfolgte die erneute Waschung (1 Minute destilliertes Wasser und zweimal 5 Minuten SSC Waschpuffer zweifach konzentriert).

4.

Im Anschluss erfolgte der eigentliche Proteinverdau, der für jedes FISH Verfahren in der Prähybridisierung elementar ist. Hierzu wurde eine vorgefertigte Proteaselösung verwendet und die Präparate für 90 Minuten unter strikter Beachtung einer konstanten Temperatur von 37 °C inkubiert. Gelöste Proteine wurden im Anschluss wiederum ausgewaschen (zweimal 5 Minuten SSC Waschpuffer zweifach konzentriert)

5.

Das so vorbereitete Gewebe wurde darauf erneut fixiert und hierzu für 10 Minuten in Formalin (4% gepuffert) eingetaucht. Es erfolgte die erneute Waschung (zweimal 5 Minuten SSC Waschpuffer zweifach konzentriert und 1 Minute destilliertes Wasser) und anschließende Trocknung an der Luft. Das Pretreatment ist nun beendet.

6.

Unter abgedunkelten Bedingungen erfolgte die Zugabe des Sondenmaterials größenadaptiert auf das entsprechende Gewebe. Das Sondenmaterial wurde kurz jeweils mit dem Vortexmischer und dann der Zentrifuge präpariert und dann auf den OT pipettiert. Unter Vermeidung von Luftblasen wurde ein vorbereitetes Deckglas aufgelegt und die Ränder mit Fixogum versiegelt. Je nach Größe des Gewebsbereiches waren zwischen 3 und 15 Mikroliter Sonde pro Schnitt vonnöten.

7.

Die so bearbeiteten Schnitte wurden in den Hybridizer gelegt, zusammen mit einem Wasser getränkten Wattestab, sodass eine feuchte Kammer entstand. Dann wurden die Sonden-individuellen Zeit- und Temperaturbedingungen am Hybridizer eingestellt. Die Denaturierung erfolgte jeweils für 10 Minuten, wobei hier bei der *uPAR* Sonde 85 °C und bei der *c-MYC* Sonde 75 °C nötig waren. Die Hybridisierung erfolgte im direkten Anschluss über Nacht bei 37 °C.

Tag 2

Die nächsten Schritte zielen letztlich darauf, dass nur solches Sondenmaterial im Gewebe verbleiben soll, das homolog gebunden hat. Im Zusammenhang mit der FISH hat sich der Begriff des “stringenten Waschens” etabliert. So wird unspezifisch gebundenes Sondenmaterial entfernt und die Hintergrundfärbung wird reduziert. Im Zentrum steht hierbei der Posthybridisierungspuffer. Er enthält neben dem SSC auch ein Detergens (Hier: Nonoxinol 40 oder NP-40).

1.

Das Fixogum und die Deckgläschen wurden entfernt. Darauf wurde unter strikter Beachtung der Temperatur der OT für 2 Minuten bei 72 °C in den Posthybridisierungspuffer eingetaucht. Darauf erfolgte das Auswaschen in zweifach konzentriertem SSC-Waschpuffer und destilliertem Wasser jeweils kurz bei Raumtemperatur.

2.

Die Schnitte wurden luftgetrocknet, mit ca. 15 Mikrolitern des DAPI-Ansatzes eingedeckt und mit einem Deckgläschen versehen lichtisoliert und kühl gelagert. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der unspezifisch vor allem die DNA färbt und somit in der Fluoreszenzmikroskopie die Abgrenzung der Zellkerne möglich macht (Kapuscinski 1995). So kann man bei der Auswertung nur dann Fluoreszenzsignale werten, wenn sie sich in der Betrachtung der DAPI Färbung eindeutig über den Zellkern projiziert (siehe Abbildung 8). Weitere Aspekte der Auswertung sind zum besseren Verständnis dem Ergebniskapitel (siehe 3.1) zugeordnet.

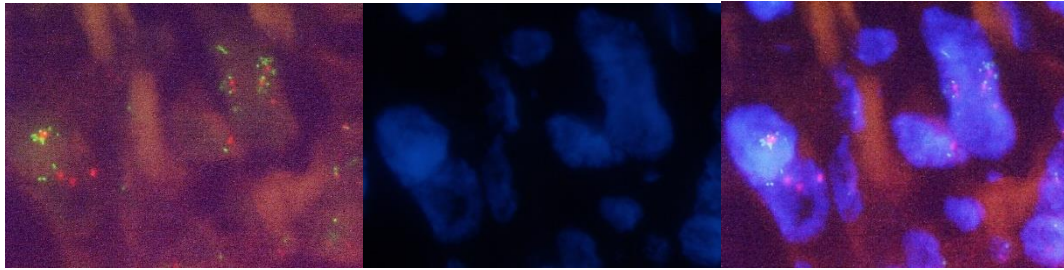


Abbildung 8a

8b

8c

Quelle: Fotografiert von F. Fuchs

Diagnoseschema am Beispiel der *MYC*-Sonde; Die Fluoreszenzmikroskopie links (8a) zeigt zunächst eine Signalverstärkung des Targetgens (grün) bezogen auf die Zentromersonde (rot). Die Bildmitte (8b) stellt dieselben Zellen im Filter für die DAPI-Fluoreszenz dar. Die Überlagerung der beiden Bilder (8c) zeigt, dass sich die Zielgenamplifikation auf den Zellkern projiziert.

2.4 Immunhistochemische Diagnostik

Verwendete Materialien	Hersteller, Firma, etc.
Detektionskit	DAKO Envision Flex+ K8002 mit: Puffer, Peroxidaseblock, Linkerlösung, Detektionenzym/Sekundärantikörper, Chromogen-Substrat-Gemisch
Eindeckung	tissue tek 4770 Coverslipping film
Eindeckungsautomat	Skura, tissue tek film
Ethanol	96% vollvergällt UN1170 und 99% vergällt mit MEK, Firma Chemsolute ThGeyer
Färbeautomat	DAKO Autostainer link 48
Hematoxylin	DAKU RTU K8008
Objektträger	thermo scientific superfrost plus 25x75x1mm
Primärantikörper	Dako, Monoclonal Mouse Anti Human p53 Protein Clone DO 7 und Santa Cruz Biotechnology monoclonal mouse Antibody sc-56330 p16 (JC8)
Software	DAKOLink
Vorbehandlungskit	DAKO target retrieval solution high ph
Vorbehandlungsautomat	DAKO Ptlink
Xylol	Chemsolute ThGeyer Xylol 0,86g/ml

Tabelle 2: benötigte Chemikalien und Geräte

2.4.1 Einführung

Abseits der individuellen Metadaten der Patienten sollten auch auf zellulärer Ebene Kriterien zur Charakterisierung des Patientenkollektivs geprüft werden. So sollten einerseits die Verbesserung der Standardisierung und Vergleichbarkeit des Kollektivs erreicht werden und andererseits mögliche Zusammenhänge typischer Proteinveränderungen des Pankreaskarzinoms mit dem DSS oder gar den ausgewählten Markern *pAR* und *c-MYC* als etwaige Störvariablen identifizierbar werden.

2.4.2 p53

Das *p53*-Gen befindet sich auf dem Chromosom 17p. Bei 70% aller Pankreaskarzinome ist *p53* mutiert, wodurch es zur Veränderung des p53-Proteins kommt (Redston et al. 1994). Intakte p53-Proteine induzieren die Expression von Genen, z. B. der DNA-Reparatur bzw. der Apoptoseinduktion, und sind so in der Lage, an verschiedenen Punkten des Zellzyklus einen Arrest zu induzieren. Ist *p53* mutiert, erhöht sich die Überlebenswahrscheinlichkeit einer Zelle mit schadhafter DNA und die *p53*-Mutation ist eine ausgesprochen häufige Mutation bei allen malignen Tumoren.

Die Nachweisbarkeit des p53 ist bei intakten Zellen durch die kurze Halbwertszeit des Proteins limitiert (Momand et al. 1992). Intaktes p53 wird abgebaut und ist somit einer antikörperbasierten Färbung nicht zugänglich. Durch Mutationen im *p53*-Gen verändert sich das p53-Protein und entzieht sich den Abbaumechanismen, sodass es in der Konzentration im Zellkern ansteigt und z. B. immunhistochemisch, also durch Antikörper, gebunden und angefärbt werden kann. Durch die immunhistochemische Färbung lassen sich also in einem Schnitt solche Zellkerne mit hohen p53-Proteinspiegeln von solchen mit weniger hohen bis negativen Spiegeln unterscheiden.

Das Prinzip beruht also auf der Affinität eines Antikörpers, mit einem bestimmten Epitop eine Antigen-Antikörperbindung einzugehen. Meist werden verschiedene Antikörper verwendet, wobei ein Primärantikörper das gesuchte Epitop bindet. Ein weiterer Antikörper dient der Verbindung mit den lichtmikroskopisch detektierbaren Reagenzien. Dieser zweite Antikörper hat dann eine Affinität zu Epitopen des Primärantikörpers. Diese sogenannte Zwei-Schritt-Methode erhöht die Signalintensität, weil mehrere Sekundärantikörper den Primärantikörper binden können und somit mittelbar das Targetprotein besser angefärbt werden kann, was sich positiv auf die Sensitivität des Verfahrens auswirkt.

Im klassischen IHC-Protokoll wird letztendlich immer eine am Sekundärantikörper sesshafte Enzym-Substrat-Reaktion durchgeführt. Im vorliegenden Fall ist das Enzym, welches spezifisch den Sekundärantikörper bindet, eine Peroxidase. Wenn Sekundärantikörper und Enzym am Primärantikörper gebunden sind, wird ein Substrat-

Chromogengemisch hinzugefügt. Es kommt zur Enzym-Substrat-Reaktion und das Chromogen wird detektierbar. Im vorliegenden Fall reagiert zugegebenes Diaminobenzidin (DAB) mit der sesshaften Peroxidase, sodass ein brauner amorpher Farbstoff entsteht, der sich lichtmikroskopisch auf den Zellkern begrenzt.

Durchführung:

Analog zu den bei den FISH-Experimenten ausgesuchten Gewebeproben der Patienten wurden weitere Schnitte identischer Lokalisation am Mikrotom angefertigt und dem immunhistochemischen Labor der UMG zugeleitet. Die Aufbereitung und Färbung erfolgte nach den standardisierten Protokollen der klinischen Routinediagnostik mit automatisierten Färbeautomaten, um die methodischen Schwankungen gering zu halten. Die Einzelheiten sind hier daher nur kurz beschrieben, ein Originalprotokoll ist exemplarisch als Anlage 1 unter Kapitel 6 dieser Arbeit beigelegt.

Es erfolgte die automatisierte Entparaffinierung und Rehydratisierung des FFPE-Gewebes als Vorbehandlung. Zur optimalen Vorbereitung der Antigen-Antikörperbindung erfolgte die Demaskierung durch eine Hitzevorbehandlung, sowie eine standardisierte alkalische Pufferlösung (*target retrieval solution*). Darauf folgte das antikörperspezifische Protokoll im Färbeautomat. Zunächst wurde mittels Peroxidaseblock die endogene Peroxidase beseitigt. Darauf erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers (Antihuman p53-Protein als monoklonaler Mausantikörper). Nach Zugabe einer Linkerlösung (Signalverstärkung und antimikrobielles Agens) folgte die Zugabe des Sekundärantikörpers (Peroxidasegekoppelter Ziegenantikörper gegen Maus-Immunglobulin). Nach Inkubation wurde das Chromogen-Substratgemisch hinzugefügt. Zum Abschluss folgte die Kerngegenfärbung mit HE. Selbstverständlich waren diese Schritte jeweils von Waschungen mit Waschpuffern eingerahmt. Zum Abschluss wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen und Luftgetrocknet.

2.4.3 p16

p16 ist ähnlich wie p53 ein Vermittler von Zellzyklusarresten, dessen Mutation also zu erleichterter Proliferation von Zellen mit schadhafter DNA führt. Dieser Effekt basiert auf dem Einfluss auf die Cyklin-abhängigen Kinasen, deren zentrale Rolle in der Zellzykluskontrolle in dieser Arbeit schon einmal angesprochen wurde. Insbesondere jene Kinasen, die das Retinoblastom Protein (Rb1) phosphorylieren werden vom p16 inhibiert. Dieser klassische Signalweg der Tumorsuppressorproteine p16 und Rb1 ist bei nahezu allen Pankreaskarzinomen (98%) mutiert (Schutte et al. 1997). Gemäß der WHO-Tumorklassifikation haben 40% aller Patienten mit Pankreaskarzinom eine p16-Mutation (Hamilton und Aaltonen 2000).

Die methodische Durchführung zur Vorbereitung des immunhistochemischen Nachweises erfolgte analog zum oben geschilderten Prozedere des p53-Assays. Auch der p16-Antikörper war ein monoklonaler Mausantikörper, der Peroxidase-gekoppelt war und im Verlauf mit einem DAB-Gemisch gesättigt wurde, was bei enzymatischer Reaktion zum Nachweis eines braunen Chromogens führte. Allerdings ist das p16 typischerweise nicht auf den Zellkern beschränkt. Ein exemplarisches Originalprotokoll ist dieser Arbeit ebenfalls als Anlage 2 unter Kapitel 6 beigelegt.

2.5 KRAS

2.5.1 Einführung

Proteine, die Zellwachstumssignale vermitteln, sind potentielle Onkoproteine und die Ras-Raf-MAP-Kinase-Signalkaskade ist ein klassisches Beispiel. Sie übersetzt externe Reize, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Hormone, die über Rezeptortyrosinkinasen die Zellmembran erreichen, in die entsprechenden zellulären Wachstums- und Differenzierungsprozesse. Mutiert ein vermittelndes Protein aus der Kaskade, werden diese mitogenen zellulären Prozesse vom externen Stimulus entkoppelt. Die Zelle entzieht sich somit einer übergeordneten Steuerung, wenn sie über die veränderte intrazelluläre Signalkaskade dauerhaft auf Wachstum programmiert ist, ohne dass der Rezeptor das entsprechende Signal evoziert.

Ras ist ein G-Protein. Es kommt in einem aktiven phosphorylierten Zustand vor (Ras-GTP) und in einem inaktiven Zustand, wenn es mit Guanosin Diphosphat beladen ist. Für die Überführung von aktiv auf inaktiv besitzt Ras eine GTPase-Aktivität. Mutiertes Ras ist konstitutiv aktiv. Typischerweise finden sich Punktmutationen in den Exons 2-4.

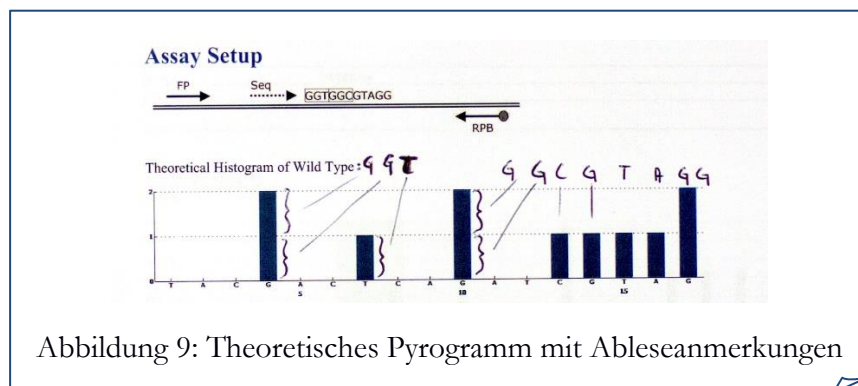
Die KRAS-Mutation gilt als die häufigste Mutation bei Pankreaskarzinomen und die WHO-Tumorklassifikation quantifiziert ihren Anteil auf über 90% aller Erkrankungen (Hamilton und Aaltonen 2000). Gemeinhin wird davon ausgegangen, dass KRAS ein integraler Bestandteil der Pathogenese pankreatischer Erkrankungen ist, etwa hinsichtlich des Zusammenspiels entzündlicher Veränderungen im Übergang in die maligne Entartung bzw. in intraepitheliale Neoplasien (Di Magliano und Logsdon 2013). Für die Krebsentstehung spielt neben der Ausprägung des KRAS-Mutationsstatus das zeitgleiche Vorhandensein anderer Mutationen eine Rolle, etwa die letztgenannten Marker p16 bzw. p53 (Yachida et al. 2010)

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung des KRAS-Mutationsstatus, wie auch schon bei p16 und p53 beschrieben, um einen möglichen Einfluss als Störvariable nicht zu übersehen bzw. um die Vergleichbarkeit des Kollektivs anhand üblicher Proteinpattern zu bewerten. Es wurde sich daher eines hoch standardisierten und teilautomatisierten

Protokolls bedient, das für die oben beschriebene Therapieentscheidung beim metastasierten Kolonkarzinom klinisch gut etabliert ist. Es handelt sich um ein Verfahren der DNA-Sequenzierung, genauer ein Pyrosequenzierungsverfahren. Jeder Fall wurde einzeln im Hinblick auf das Codon 12 und das Codon 13 des KRAS-Gens untersucht und entsprechend als KRAS-Wildtyp oder KRAS-Mutant klassifiziert.

Bei der Pyrosequenzierung macht man sich den konstanten Energieumsatz der chemischen Reaktion des angebotenen Nukleotids mit der DNA-Polymerase zu nutze. Es handelt sich um eine endotherme Reaktion. Die Nukleotide liegen als Nukleosidtriphosphate vor. Die Desoxyribose dieser Nukleotide ist also mit drei Phosphatgruppen verestert, was einem hohen Energiegehalt entspricht. Bei der Katalyse mit der DNA-Polymerase werden zwei davon abgespalten, es wird also Pyrophosphat frei und zwar immer ein Pyrophosphat pro Hybridisierung. Bei der Pyrosequenzierung wird dem Assay ein Enzymcocktail beigelegt, der das freiwerdende Pyrophosphat nutzt, um einen Lichtblitz zu erzeugen. Im Zentrum dieses Enzymcocktails steht das Enzym Luciferase, das diese detektierbare Biolumineszenz erzeugt. Die anderen Enzyme stellen nötige Energie bereit, indem sie das bei der Hybridisierung frei gewordene Pyrophosphat in ATP umwandeln. Wichtig für das Verständnis der Auswertung der Pyrosequenzierung ist, dass die messbare Stärke des Lichtblitzes von der Menge an frei gewordenem Pyrophosphat abhängt.

Das Licht wird durch eine Kamera detektiert und graphisch verarbeitet. Im Ergebnis entsteht am Computer ein Pyrogramm, dessen Ordinate die Lichtstärke widerspiegelt und den auf der Abszisse aufgetragenen zeitlich sortierten Basenzugaben zuordnet.



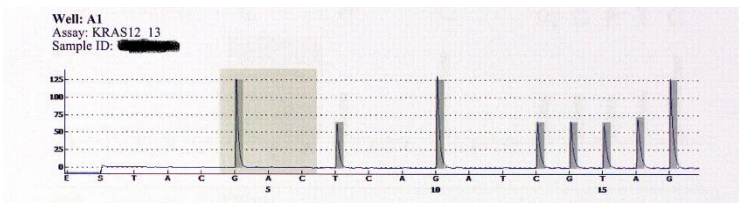
Weitere Enzyme, welche über das gesamte Protokoll hin vorliegen, dienen dem Abbau jener Nukleotide und Reagenzien, die nicht mit der DNA-Polymerase reagiert haben bzw. die Folgereaktionen verfälschen könnten.

2.5.2 Durchführung

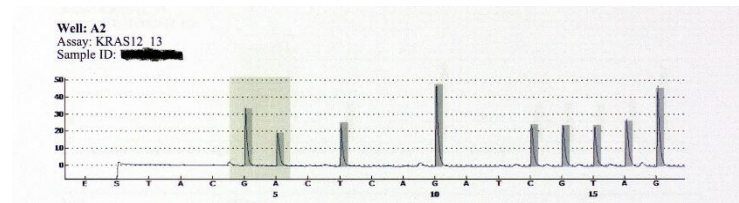
Verwendete Materialien	Hersteller, Firma, etc.
DNA-Extraktionslösung	innuPREP FFPE DNA Kit Firma: Analytik Jena
DNA-Extraktionsgerät	innupure c16, Firma Analytik Jena
Klingen	feather microtome blades a53 type
Mikrotom	Mikrom HM 400
PCR-Gerät	Peqlab, peqstar 96Q
Sequenzierungsgerät	QiagenPyromark q24
Sequenzierungskit	therascreen KRAS Pyro Kit mit: u. a. Sequenzierungsprimern, PCR-Primern, PCR Mastermix, Nukleotiden, Enzymen, Puffern, Kontroll-DNA
Software	Qiagen PyromarkQ 2.0 mit KRAS Plug-in Report

Tabelle 3: benötigte Chemikalien und Geräte

Analog zu den bei den FISH-Experimenten ausgesuchten Gewebeproben der Patienten wurden weitere Schnitte identischer Lokalisation am Mikrotom angefertigt, die relevanten Bereiche mittels HE-Mikroskopie makroskopisch markiert und dem molekularpathologischen Labor der UMG zugeleitet. Die Arbeitsschritte, die im Einzelnen dazu führten, dass aus der Fülle an DNA eines FFPE-Gewebeschnittes ein sequenzierbarer kurzer DNA-Abschnitt für die Pyrosequenzierung isoliert wurde, seien hier nur grob zusammengefasst. Nach mikroskopischer Identifikation wurde Tumorgewebe aus dem Schnitt mechanisch extrahiert und aufbereitet. Codon 12 und 13 liegen im Exon 2 des *KRAS* Gens. Es erfolgte die Amplifikation mittels PCR, wobei die Selektion der entsprechenden PCR-Primer die isolierte Amplifikation der gängigen Varianten von Codon 12 und 13 des *KRAS*-Gens ermöglichte. Für die Sequenzierung wird einzelsträngige DNA benötigt. Durch den Einsatz biotinylierter Primer im Rahmen der PCR-Amplifikation entstanden solche einzelsträngigen DNA-Templates und wurden aufgereinigt. Die eigentliche Pyrosequenzierung erfolgte mittels eines kommerziellen Kits. Der Abgleich des Pyrogramms mit dem zu erwartenden Wildtyp-Pyrogramm führte zur Entscheidung, ob ein Wildtyp oder ein Mutant vorlag. Abbildung 10 zeigt beispielhaft zwei Pyrogramme des vorliegenden Kollektivs im Vergleich.



Wildtyp; die Lichtintensitäten sind mit dem theoretischen Pyrogramm vergleichbar.



Mutation; Der erste Ausschlag ist kleiner und ein zusätzliches A (Adenin)-Nukleotid ist in Bindung gegangen.

Abbildung 10: Pyrogramme im Vergleich

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der FISH-Analyse

Nach oben beschriebener Versuchsanordnung erfolgte schrittweise zuerst die Auswertung des gesamten Kollektivs mit der *uPAR*-Sonde. Danach wurde in einem zweiten Schritt das gesamte Kollektiv mit der *c-MYC* Sonde hybridisiert und ebenso sukzessive ausgewertet. Die Auswertung der einzelnen Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte jeweils ohne zusätzliche Kenntnis anderer Befunde des betreffenden Patienten, wie etwa Überlebensdaten oder Amplifikationsstatus des anderen untersuchten Markers.

3.1.1 Auswertung

Folgende Gesichtspunkte waren für die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop der patientenbezogenen FISH-Schnitte von besonderer Bedeutung:

- Screening des gesamten Schnittes bei unterschiedlicher Vergrößerung (i.d.R. 63-fach) zur Beurteilung der Hybridisierungs- und Farbqualität, sowie Identifizierung der Tumorregion
- Begutachtung des gesamten Tumorgewebes (i.d.R. bei 100facher Vergrößerung)
- Identifizierung von Hotspots, also tumoröser Abschnitte, die in engem topologischen Zusammenhang stehen und *prima Vista* vermehrte Zielgenfluoreszenzen zeigen
- Auszählung der grünen und roten Fluoreszenzsignale von jeweils zwanzig Zellen in drei verschiedenen Tumorregionen bzw. Hotspots
- Screening einer Kontrollregion (z. B. gesundes Drüsengewebe, Lymphknoten, Bindegewebszellen) zum Ausschluss ubiquitär gebundener Sonden
- Zusätzlich nach Möglichkeit Auszählung einer Region mit 20 PanIN-Zellen
- Ausgewählte Fotodokumentation einzelner Diagnoseschritte
- Auswertung des Zählergebnisses der Tumorregion mit den meisten Fluoreszenzsignalen zur Klassifikation des Amplifikationsstatus

Die Kriterien zur Klassifizierung des Amplifikationsstatus des *uPAR* bzw. von *c-MYC* sind bis dato insbesondere beim Pankreaskarzinom nicht etabliert. Zur Auswertung der Zählergebnisse erfolgte die Orientierung an einem publizierten Auswerteschema (Schildhaus et al. 2015). Hierbei erfolgt die Einteilung in vier Gruppen (hier römisch I bis

IV) mit besonderem Augenmerk auf die Ratio und die Genkopienzahl. Die Ratio beschreibt das Verhältnis von Zielgenignal zu Kontrollsignal aller gezählten Zellen. Die Genkopienzahl als durchschnittliche Genkopienzahl (*average gene copy number* = AGN) ist die Summe aller Zielgensignale dividiert durch die Anzahl der gezählten Zellen. Darüber hinaus spielt auch der prozentuale Anteil solcher Zellen eine Rolle, die für sich genommen eine besonders hohe Genkopienzahl aufweisen. Hieraus ergibt sich folgende Einteilung:

I) High-Level Amplifikation:

- Zielgen/Kontrollgen Ratio $\geq 2,0$ oder
- AGN für Zielgen pro Zelle $\geq 6,0$ oder
- $\geq 10\%$ aller Tumorzellen mit ≥ 15 Zielgenkopien

II) Intermediäres Amplifikationslevel:

- $\geq 50\%$ der Zellen haben ≥ 5 Zielgenkopien
- keine High-Level Kriterien erfüllt

III) Low-Level Amplifikation:

- $\geq 40\%$ der Zellen haben ≥ 4 Zielgenkopien
- keine High-Level Kriterien erfüllt
- keine intermediären Kriterien erfüllt

IV) Negativ für Amplifikation:

- keines der oben genannten Kriterien trifft zu

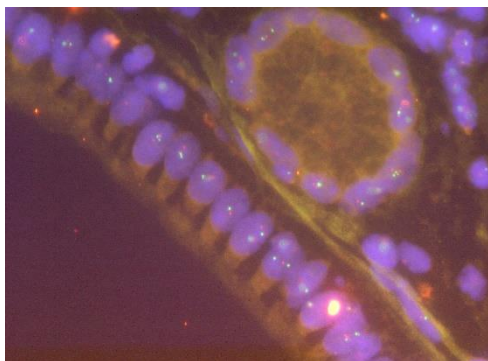


Abbildung 11: FISH einer PanIN mit *uPAR*-Sonde (grün); Beispiel für (IV); Zellen weisen regelhaft in dieser Ebene keine Signalverstärkung auf. Ebenfalls für die Auswertung wichtig ist, dass keine Überlagerungseffekte der Zellkerne vorkommen und die einzelnen roten und grünen Signale nicht miteinander verschmelzen.

Quelle: Fotografiert von F.Fuchs

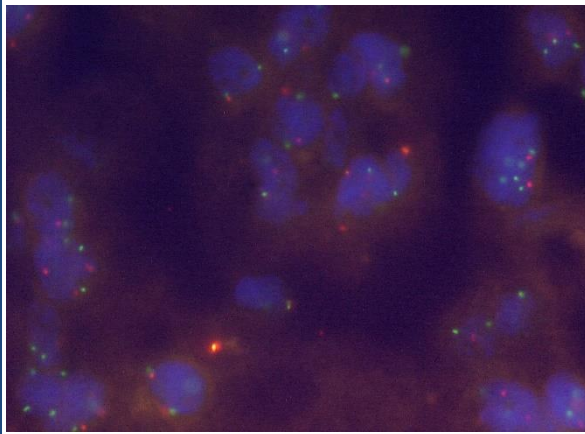


Abbildung 12: FISH mit Low-Level-Amplifikation der *c-MYC* Sonde (grün); Beispiel für (III); einige Zellen zeigen in dieser Ebene mehr als zwei grüne Signale. Eine Auszählung der hier exemplarisch eingefügten Bilder ist nicht möglich, da man die räumliche Tiefe des Zellkerns mitberücksichtigen muss.

Quelle: Fotografiert von F. Fuchs

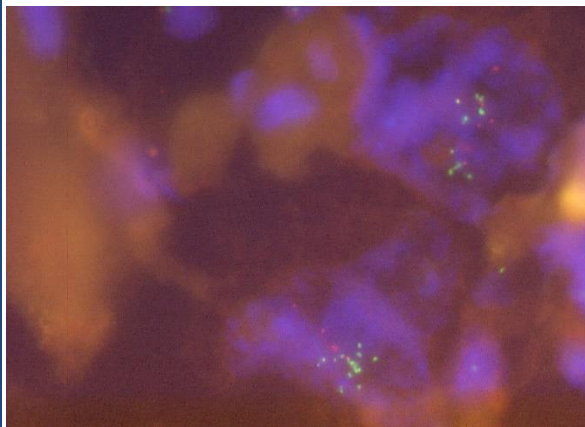


Abbildung 13a: FISH mit High-Level-Amplifikation der *uPAR*-Sonde (grün); Beispiel für (I); zwei Zellen mit deutlicher Zunahme der grünen Fluoreszenzsignale. Da dieser Tumor in einem zusammenhängenden Bereich viele solcher Zellen aufwies, wurde er als High-Level Amplifikation eingestuft.

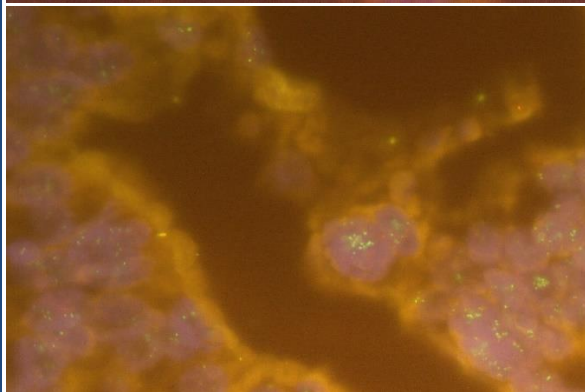


Abbildung 13b: FISH mit High Level Amplifikation der *uPAR*-Sonde (grün); Beispiel für (I); Hier ist einer der oben beschriebenen Hotspots dargestellt.

Quelle: Fotografiert von F. Fuchs

3.1.2 Ergebnis *uPAR*-Sonde

29 der 60 Patienten erfüllten die Kriterien einer Genamplifikation des uPAR-Rezeptors. Hinsichtlich der Zuordnung in die verschiedenen Amplifikationsqualitäten ergaben sich 16 Low-Level-Amplifikationen, zwei intermediäre und elf High-Level-Amplifikationen. Für die weitere statistische Auswertung wurden die intermediären Amplifikationslevel und die

High-Level-Amplifikationen in einer Gruppe zusammengefasst, sodass das Patientenkollektiv in drei Gruppen eingeteilt wurde. Eine zusammenfassende Darstellung zeigt Abbildung 14. Andere Gewebsabschnitte, wie Lymphknoten, gesundes Drüsengewebe und auch PanIN-Läsionen zeigten sich, anders als mitunter in anderen Studien vorbeschrieben, ohne Ausnahme negativ hinsichtlich obiger Kriterien der *uPAR*-Amplifikation.

3.1.3 Ergebnis *c-MYC*-Sonde

32 der 60 Patienten erfüllten die Kriterien einer Genamplifikation des *c-MYC*-Gens. Hinsichtlich der Zuordnung in die verschiedenen Amplifikationsqualitäten ergaben sich 12 Low-Level-Amplifikationen, 3 intermediäre und 17 High-Level-Amplifikationen. Wegen der ebenfalls geringen Zahl von Intermediaten wurde auch jetzt hinsichtlich der weiteren statistischen Auswertung die Zusammenfassung der intermediären Amplifikationen mit den High-Level-Amplifikationen vorgenommen. Auch *c-MYC* zeigte sich in anderen Gewebsabschnitten, wie Lymphknoten, gesundem Drüsengewebe und auch PanIN-Läsionen ohne Ausnahme negativ hinsichtlich obiger Kriterien. Abbildung 15 ergänzt zusammenfassend die prozentuale Verteilung.

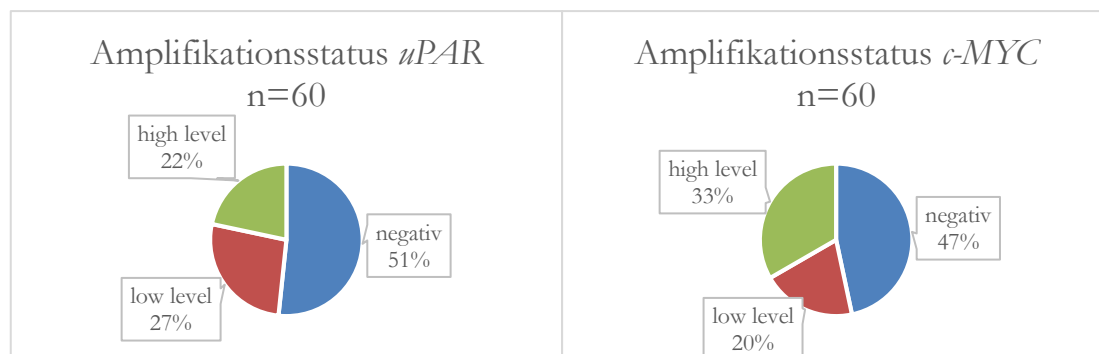


Abbildung 14

Abbildung 15

3.2 Ergebnisse der Immunhistochemie

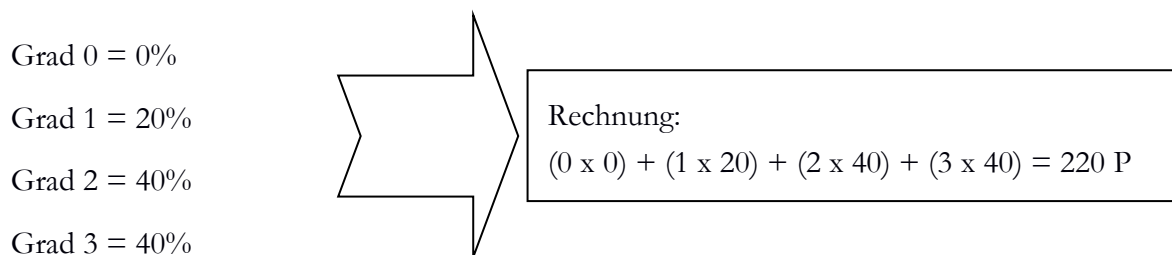
3.2.1 Auswertung

Wie unter 2.4 dargestellt, wurden die Gewebeschnitte automatisiert mit den antikörperbasierten Farbstoffen für p53 und p16 angefärbt und am Lichtmikroskop ausgewertet. Die für die Ergebnisfindung entscheidenden Aspekte im Rahmen der Auswertung werden im Folgenden in Kürze zusammengefasst:

Zunächst steht die sichere Identifizierung von Tumorgewebe ggf. unter Beachtung des äquivalenten HE-Schnittes im Vordergrund. Darauf folgt die qualitativ visuelle Bewertung

der Farbintensität aller Tumorzellen des Schnittes und die Zusammenfassung dieser Beurteilung als Punktwert auf einer Skala von 0-300, angelehnt an den H-Score (Goulding et al. 1995). Kurz zusammengefasst heißt das, dass die Farbintensität der Zellen zunächst auf einer Skala von 0-3 bewertet wird (0=keine, 1=schwache, 2=moderate, 3=starke Färbung). Außerdem wird der Prozentsatz der jeweils angefärbten Zellen semiquantitativ angegeben (z. B. 20% Grad 1, 40% Grad 2, 40% Grad 3 = 100%). Die Multiplikation der ermittelten Prozentzahl mit dem Zahlenwert des jeweiligen Intensitätsgrad ergibt einen Score von 0 bis 300.

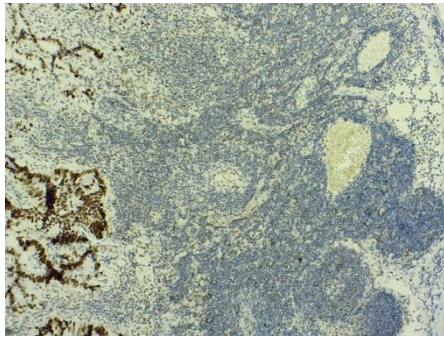
Berechnung des obigen Beispiels:



Dieses Zählergebnis ergäbe einen Score von 220 Punkten für den gesamten Schnitt. Zu beachten ist, dass nicht die Färbung der Zelle als Ganzes, sondern jeweils Kernfärbung, Membranfärbung und Färbung des Zytoplasmas berücksichtigt werden. Als Kontrollgewebe eignet sich bei pankreatischen Untersuchungen sehr gut das Inselzellgewebe. Ferner sind Störvariablen zu beachten, beispielsweise weisen Makrophagen häufig positive Färbungen auf. In der vorliegenden Arbeit wurde wiederum anschließend an die Beurteilung der Tumorzellen nach Möglichkeit eine Beurteilung von PanIN-Gewebe vorgenommen. Eine *p53*-Mutation wurde diagnostiziert, wenn der H-Score größer 50 war (vgl. Goulding et al. 1995). Eine *p16*-Mutation wurde diagnostiziert, wenn mehr als 5% der Zellen moderat oder stark angefärbt waren (Goitia-Durán et al. 2010).

3.2.2 Ergebnisse p53

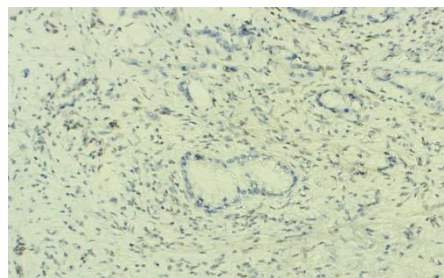
47 der 60 Patienten erfüllten die Kriterien einer *p53*-Mutation. Mit einem Anteil von 77% am Gesamtkollektiv liegt die Mutationsrate damit etwas oberhalb der 70%, die in der gängigen Literatur (vgl. Hamilton und Aaltonen 2000) für das PDAC beschrieben wird. Außerdem zeigten sich gleichgerichtete p-53 Expressionen zwischen Tumorzellen und den entsprechenden Vorläuferläsionen, die auch statistisch signifikant waren ($p < 0,05$; Spearman Korrelationskoeffizient $R = 0,417$). Zusammenhänge zur Amplifikation von *c-MYC* oder *uPAR*, bzw. zur p16-Expression ließen sich nicht darstellen. Auch für das Überleben der Patienten war die *p53*-Mutation statistisch nicht relevant.



Im linken Bildrand zeigen sich im Wesentlichen moderat bis stark angefärbte Tumorzellen, die sich in diesem Fall in einem Lymphknoten befinden entsprechend einer Lymphknotenmetastase.

Abbildung 16: p53-positive Tumorzellen

Quelle: Fotografiert von F. Fuchs



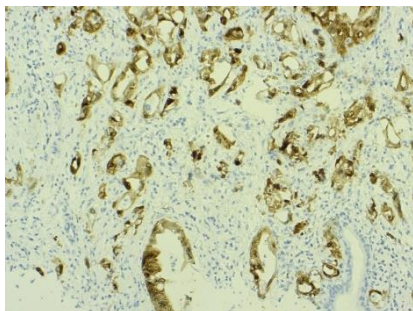
Insbesondere apikal der drüsigen Struktur im Zentrum des Bildes zeigt sich das Bild eines PDAC mit Desmoplasie und Tumorzellen, die sich in diesem Fall negativ für p53 zeigen.

Abbildung 17: p53-negative Tumorzellen

Quelle: Fotografiert von F. Fuchs

3.2.3 Ergebnisse p16

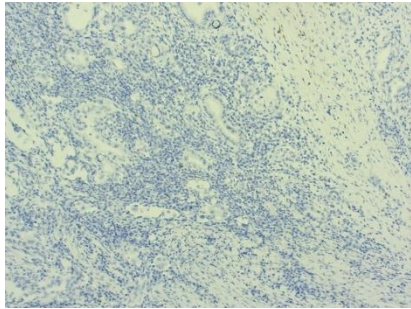
Hinsichtlich der *p16*-Mutation zeichnet sich ein ähnliches Bild wie bei der Mutation von *p53*. Mit 45% der Fälle (27 von 60 Patienten) liegt die Rate leicht oberhalb der in der Literatur beschriebenen Mutationsrate von 40% (vgl. Hamilton und Aaltonen 2000). Auch bei *p16* liegt eine statistisch signifikante Korrelation von Tumorzellen und den korrespondierenden Vorläuferläsionen vor ($p < 0,05$; Spearman Korrelationskoeffizient $R = 0,492$), wohingegen kein Zusammenhang zum Überleben, respektive zu *p53*, *mPAR* oder *c-MYC* dargestellt werden konnte.



Anders als bei *p53* färbt sich bei *p16* auch das Zytosol. Das Bild zeigt alle drei Farbintensitäten. Zusätzlich sieht man im unteren rechten Bildrand die typische Morphologie eines eher unauffälligen Pankreasgangs.

Abbildung 18: p16-positive Tumorzellen

Quelle: Fotografiert von F. Fuchs



Die zahlreichen lymphatischen Zellen repräsentieren einen Lymphknoten, der von drüsig organisierten Tumorzellen infiltriert ist. Hier also eine immunhistochemisch negative Lymphknotenmetastase.

Abbildung 19: p16-negative Tumorzellen

Quelle: Fotografiert von F. Fuchs

3.3 Ergebnisse der KRAS-Sequenzierung

In oben dargestellter Weise wurden durch das molekularpathologische Labor anhand des zur Verfügung gestellten Genmaterials die individuellen Pyrogramme erstellt. Bei einem Schnitt ergaben sich bei der mechanischen Aufbereitung wiederholt Probleme, sodass keine Pyrosequenzierung erfolgen konnte. Bei 58 der 59 restlichen Patienten wurden Graphen generiert, die eine eindeutige Zuordnung möglich machten, wobei ein Patient wiederholt uneindeutige Sequenzierungsergebnisse aufwies und aus der Auswertung ausgeschlossen wurde.

Unter den 58 verbliebenen Patienten waren 20 *KRAS*-Wildtypen und 38 *KRAS*-Mutanten (siehe Abbildung 20). Unter den Mutanten lassen sich fünf verschiedene Punktmutationen unterscheiden, deren Verteilung aus Abbildung 21 hervorgeht. Insgesamt überwiegen deutlich die Mutationen im Codon 12, bei nur zwei Mutationen im Codon 13.

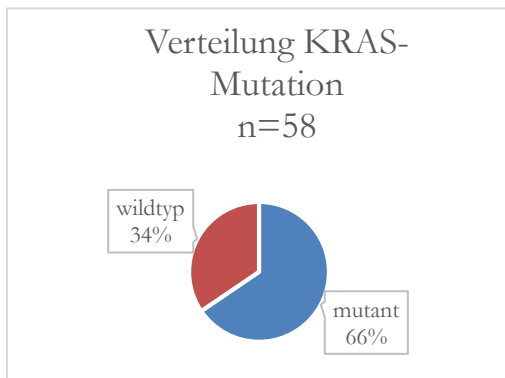


Abbildung 20

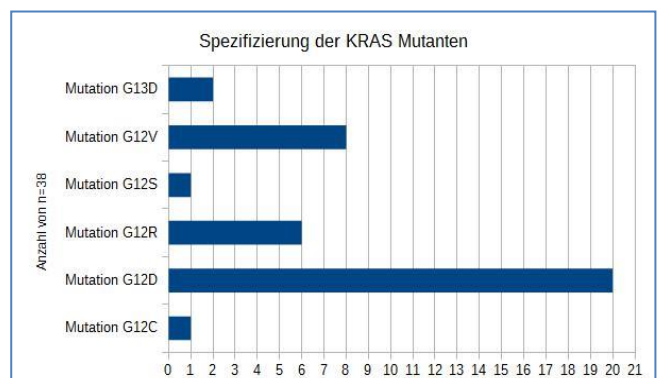


Abbildung 21

3.4 Auswertung und Korrelation

Über die patientenindividuelle Fallnummer wurden nun die generierten Daten in Beziehung gesetzt und nach Zusammenhängen gesucht. Im Anschluss erfolgte die Korrelation mit der Überlebenszeit der Patienten. Relevante Zusammenhänge sind nachfolgend dargestellt.

3.4.1 *uPAR* und *c-MYC* im Zusammenhang

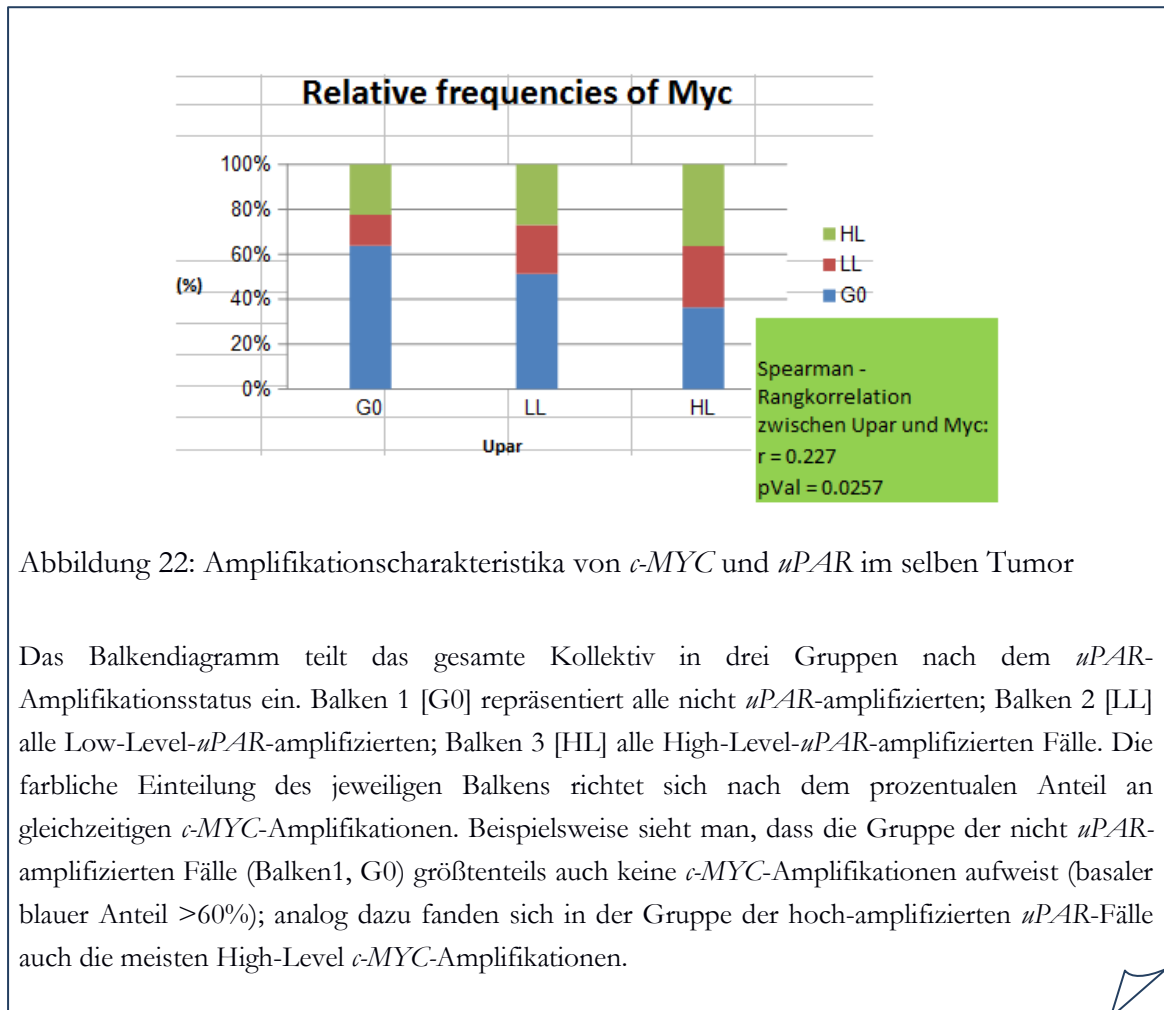


Abbildung 22: Amplifikationscharakteristika von *c-MYC* und *uPAR* im selben Tumor

Das Balkendiagramm teilt das gesamte Kollektiv in drei Gruppen nach dem *uPAR*-Amplifikationsstatus ein. Balken 1 [G0] repräsentiert alle nicht *uPAR*-amplifizierten; Balken 2 [LL] alle Low-Level-*uPAR*-amplifizierten; Balken 3 [HL] alle High-Level-*uPAR*-amplifizierten Fälle. Die farbliche Einteilung des jeweiligen Balkens richtet sich nach dem prozentualen Anteil an gleichzeitigen *c-MYC*-Amplifikationen. Beispielsweise sieht man, dass die Gruppe der nicht *uPAR*-amplifizierten Fälle (Balken1, G0) größtenteils auch keine *c-MYC*-Amplifikationen aufweist (basaler blauer Anteil >60%); analog dazu fanden sich in der Gruppe der hoch-amplifizierten *uPAR*-Fälle auch die meisten High-Level *c-MYC*-Amplifikationen.

Der ermittelte *uPAR* und der *c-MYC*-Amplifikationsstatus wurden als zwei Variablen ein und desselben Patienten betrachtet und in einer Spearman-Korrelation auf einen Zusammenhang hin untersucht. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Trend einer Koamplifikation der beiden Marker ($r=0.227$, $p=0.026$). Dieser Trend umfasste nicht nur die Qualitäten, ob eine Amplifikation jeweils vorlag oder nicht, sondern auch die Subspezifizierung des Amplifikationsgrades in Low-Level und High-Level korrelierte

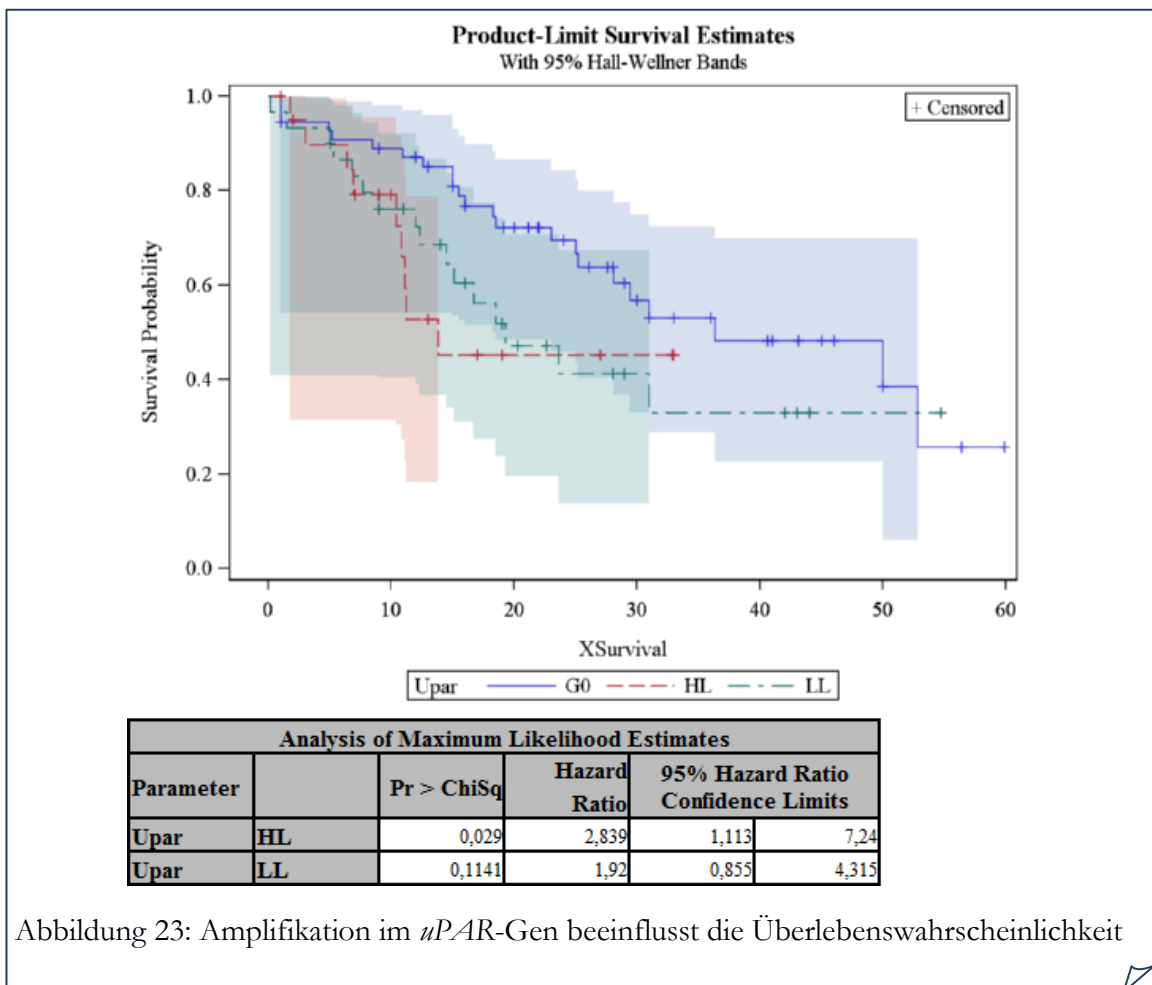
signifikant. *uPAR*- und *c-MYC*-Amplifikationen neigen also überzufällig häufig dazu, in ähnlicher Weise im selben Tumor aufzutreten.

3.4.2 Genamplifikation in Korrelation mit dem krankheitsspezifischen Überleben

Ferner wurde der Zusammenhang untersucht, inwiefern der jeweilige Amplifikationsstatus von *uPAR* und *c-MYC* als eigenständiges Kriterium für das Überleben des Patienten betrachtet werden konnte. In dieser univariaten Analyse des Kollektivs ergaben sich jeweils statistisch signifikante Zusammenhänge, die nachfolgend dargestellt werden.

3.4.2.1 *uPAR*-Amplifikation

Das mittlere Überleben der Patienten ohne *uPAR*-Amplifikation war 28,4 Monate. Bei den amplifizierten Tumoren zeigte sich ein reduziertes Überleben, nämlich 15,5 Monate bei Patienten mit Low-Level-Amplifikation und 12,4 Monate bei Patienten mit High-Level-Amplifikationen (Cox-Mantel-Test, $p=0,027$). Abbildung 23 fasst diese Ergebnisse in einer Kaplan-Meier-Kurve zusammen. Die X-Achse ist in Monatsschritten beschriftet.



3.4.2.2 *c-MYC* Amplifikation

Bei *c-MYC*-Amplifikationen zeigte sich ein ähnliches Bild. Ohne Amplifikation betrug das mittlere Überleben 27,5 Monate, verglichen mit 11,1 Monaten bei erfüllten Low-Level-Kriterien bzw. 19,3 Monaten bei High-Level-Amplifikationen (Cox-Mantel-Test, $p=0,048$). Auch hier liefert Abbildung 24 eine Übersicht als Kaplan-Meier-Schätzung. Die x-Achse ist mit Tagen bezeichnet.

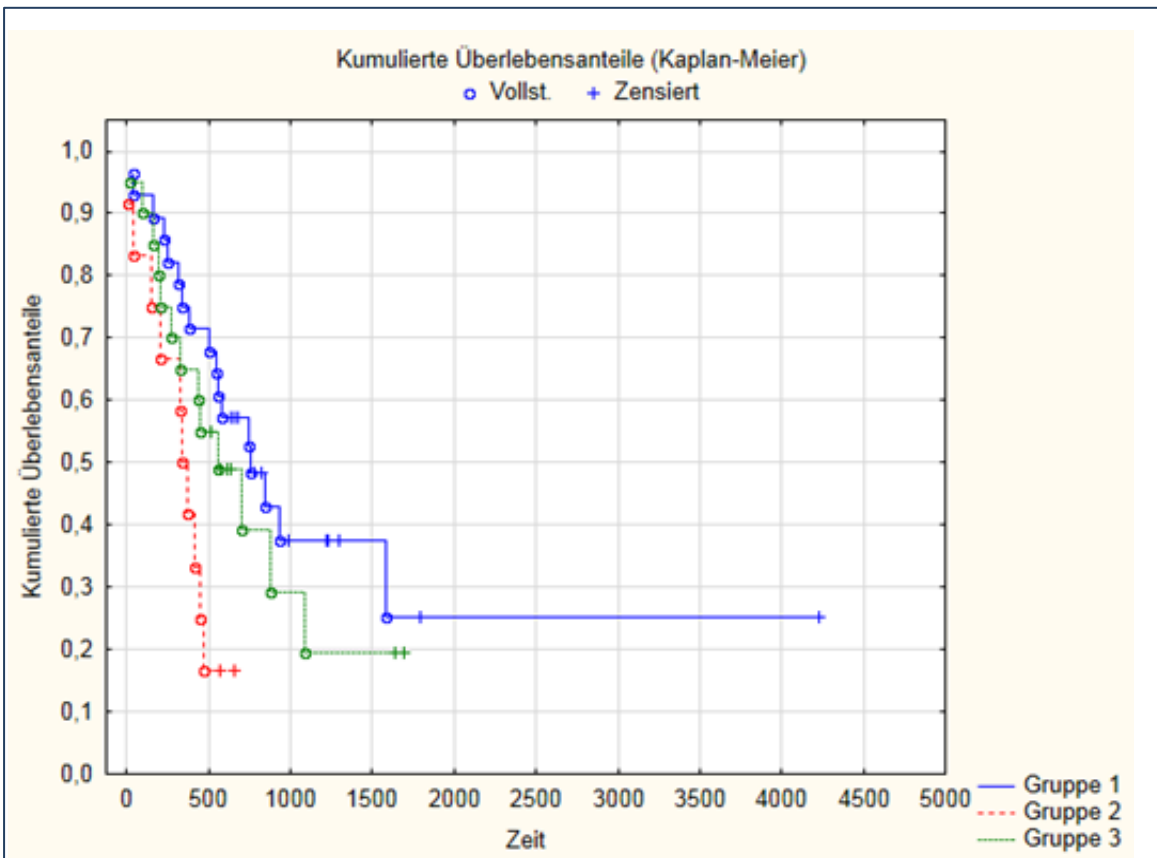


Abbildung 24: *c-MYC*-Amplifikationen im Zusammenhang mit Überleben;

Gruppe 1 nicht amplifiziert, Gruppe 2 Low-Level- und Gruppe 3 High-Level-Amplifikationen.

3.4.3 Multivariate Auswertung und Zusammenfassung

Im Anschluss wurden diese Ergebnisse einer multivariaten statistischen Auswertung unterzogen, die zusätzliche Merkmale der Patienten berücksichtigte. Die oben bereits beschriebenen Marker p16 und p53 gehörten dazu, aber auch Alter, Geschlecht und Grading wurden berücksichtigt. Hierbei lagen sowohl *c-MYC* als auch *p16* außerhalb des

statistisch signifikanten Bereiches. Allerdings ist hinsichtlich des High-Level *uPAR*-Amplifikation mit einem p-Wert von 0,071 immer noch ein Trend hin zur Relevanz erkennbar. Nur das Grading der Patienten war in dieser Analyse relevanter ($p=0,0218$) und

Step	Effect Removed	Pr > ChiSq
1	XNStage	0,9902
2	Xp16	0,6197
3	Xmyc	0,4012
4	Xsex	0,1741
5	Xp53	0,1883
6	Xage	0,1062

Abbildung 25

als einziges Merkmal im statistisch signifikanten Bereich. Abbildung 25 zeigt eine Zusammenfassung der berücksichtigten Merkmale, die allesamt nicht signifikant waren. Für sich genommen hatten also *uPAR* und *c-MYC* einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten, der in der multivariaten Analyse allerdings nicht stabil war. Ferner ergab sich für die Koexpression von *uPAR* und *c-MYC* im selben Tumor hinsichtlich des spezifischen Krankheitsüberlebens der Patienten ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang.

4 Diskussion

4.1 Übersicht

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Betrachtung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem uPAS und dem Transkriptionsregulationssystem c-MYC beim Pankreaskarzinom. Die selektive Standardisierung der eingeschlossenen Studienpatienten und die Referenz zum krankheitsfreien Überleben kennzeichnen das Patientenkollektiv, in dem diese Marker untersucht wurden. Ziel war die Fokussierung auf jene Subgruppe von Patienten, die ein primär kuratives Therapiekonzept erfahren haben.

Hypothetischer Leitgedanke ist die Vorstellung, dass *MYC* und *uPAR* bei der Krebsentstehung und im Bereich der Krankheitsprogression aggressiver Phänotypen synergistisch wirken können.

Potentieller Ausblick ist die Vorstellung, Schritte in die personalisierte Therapie des Pankreaskarzinoms voranzutreiben, z. B. indem spezifische Proteinpattern die Möglichkeit der Identifikation klinischer Subgruppen mit gesonderten Risikoprofilen bzw. Therapiekonzepten ermöglichen.

4.2 Methodische Aspekte

Die Amplifikation zweier Gene ist in dieser Arbeit das Kernkriterium. Zum einen gilt es zu hinterfragen, inwieweit die Methode der FISH geeignet ist, diese Genveränderungen valide abzubilden. Zum anderen gilt es zu hinterfragen, inwiefern dieses reine Abbild einer genetischen Mutation sinnvoll mit veränderter Proteinexpression bzw. im Effekt mit tatsächlich klinischen Daten in Relation gesetzt werden darf.

4.2.1 FISH

Grundsätzliche Überlegungen vor der Durchführung von FISH-Experimenten umfassen zeitliche, personelle und finanzielle Aspekte. Das jeweilige Hybridisierungsexperiment ist vergleichsweise langwierig, es dauert in jedem Fall zwei Tage. Die verwendeten Sonden sind kostspielig. Es bedarf der Einarbeitung des Untersuchers, die zeitintensiv ist und personelle Ressourcen erfordert. In diesem Zusammenhang ist auch eine regelmäßige Validierung der erzielten Untersuchungsergebnisse durch erfahrene FISH-Diagnostiker erforderlich.

Diese Aspekte spielten selbstverständlich für die vorliegende Arbeit eine Rolle, insbesondere da hinsichtlich der verwendeten *uPAR*-Sonde keine standardisierte Erprobung in Forschung oder in klinischer Routine etabliert waren.

Als Orientierung diene zunächst das Setting der FISH-Diagnostik des *human epidermal growth factor*-Rezeptors 2 (HER2). Die Detektion einer Genamplifikation dieses Rezeptors wird im Rahmen der Mammakarzinomdiagnostik routinemäßig durchgeführt. Somit eigneten sich die damit verbundenen Arbeitsschritte, um die notwendigen Verfahren um die Hybridisierung und die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop zu erlernen. Die FISH-Diagnostik beim Mammakarzinom wird von vielen Autoren wegen der hohen Sensitivität und Spezifität als Goldstandard für die Ermittlung der Rezeptorüberexpression beschrieben (Sarode et al. 2015). So wurden auch für die ersten *uPAR*-Hybridisierungsversuche und das Pretreatment zunächst die Protokolle der HER2-Sonden verwendet, allerdings zeigten sich hinsichtlich störender Hintergrundfluoreszenzen deutliche Schwächen. Erst die geschilderte Automatisierung des Pretreatments und damit verbunden die Umstellung des Protokolls, ermöglichte reproduzierbare und auswertbare FISH-Versuche mit der *uPAR* Sonde im Pankreasgewebe, mit vergleichbaren Ergebnissen in der Validierung durch einen unabhängigen Beobachter (Prof. Schildhaus, Institut für Pathologie der UMG).

Auch die Auswertekriterien - insbesondere hinsichtlich des Cut-Off-Wertes - orientierten sich zunächst am HER2-Schema, wobei auch diese Kriterien Gegenstand anhaltender Diskussionen waren und sind (siehe z. B. Rakha et al. 2015). Sie erwiesen sich als nicht praktikabel, weil die Ratio von Zielsignal und Kontrollsignal das Hauptkriterium war. Hier erfolgte unter anderem die Definition eines Borderline-Typus, wenn man nach Auszählung von zwanzig Zellen mit der Ratio im Bereich zwischen 1,8 und 2,0 lag. Dieser Grenzbereich erforderte die Auszählung weiterer (mind. 60) Tumorzellen, was sich als schwierig und zeitintensiv erwies, insbesondere, weil dieser Grenzbereich häufig vorlag. Durch das im Ergebnisteil vorgestellte und letztendlich angewandte Schema wurden neben der Ratio zusätzliche Kriterien in die Auswertung mit einbezogen und außerdem wurde sichergestellt, dass in jedem Schnitt gleich viele Zellen gezählt wurden. Ferner erwies sich die vielschichtigere Einteilbarkeit in unterschiedliche Amplifikationstypen als vorteilhaft für die weitere Vergleichbarkeit und die statistische Auswertung. Auch die Hybridisierung und Auswertung der *c-MYC*-Sonde funktionierte mit denselben Konzepten zufriedenstellend und erleichterte so die statistische Vergleichbarkeit der beiden Variablen. Die Zahl der grenzwertigen Fälle (hier intermediäre Amplifikation genannt) verschwand allerdings nicht gänzlich. Zwei Fälle bei der *uPAR*-Testung und drei Fälle bei der *c-MYC* Testung bildeten diese Gruppe, die zu klein für eine eigenständige statistische Aussagekraft war und daher mit einer anderen Gruppe zusammengefasst werden musste. Da in der Mehrheit der Fälle eine deutliche Nähe zu den High-Level-Kriterien bestand (z. B. AGN 5,9; 5,85; 5,6), wurde

die Zuteilung in die High-Level-Klassifikation vorgenommen, was eine punktuelle Aufweichung der beschriebenen High-Level Kriterien zu Gunsten der Verwertbarkeit der Ergebnisse darstellt. Borderline-Fälle, die eine statistische Auswertung erschweren, sind allerdings auch bei anderen Tumorentitäten keine Seltenheit. Die ALK-FISH des Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinoms ist beispielsweise ein deutlich besser etabliertes Verfahren und weist in einer aktuellen Studie in ca. 6% der Fälle solche Problemfälle auf (Laffert et al. 2015).

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die FISH-Diagnostik zu Forschungszwecken inklusive der Etablierung statistisch verwertbarer Diagnoseverfahren für zwei bisher nicht etablierte Sonden am Pankreaskarzinom im Rahmen dieser Arbeit zufriedenstellend bewerkstelligt werden konnte. Allerdings war die methodische Nähe zu einem Standardverfahren der Routinediagnostik (hier HER2-Neu beim Mammakarzinom) zu Ausbildungszwecken erforderlich, weil so auch die nötigen Validierungsprozesse durch erfahrene FISH-Diagnostiker gewährleistet werden konnten.

Kritisch diskutiert wurde im nächsten Schritt die Frage, ob zusätzlich zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis einer Genamplifikation eine konkrete Suche nach Zielproteinen im untersuchten Gewebe erfolgen müsste, z. B. im Sinne immunhistochemischer Nachweise des uPARs oder der Quantifizierung von MYC-Protein-mRNA. Weiter oben im Text ist die Diskussion angedeutet. Die FISH als Goldstandard für die HER2-Rezeptor-Diagnostik zu bezeichnen, ist nicht unumstritten, sondern erfordert die Beachtung der Wertigkeit des zusätzlich immunhistochemischen Nachweises desselben Rezeptors. Vergleichbare Nachweismethoden existieren auch für *c-MYC* und uPAR, wurden aber für die vorliegende Fragestellung nicht eingesetzt.

Meng et al. haben 2006 in einer Arbeit an unterschiedlichen Zelltypen des Mammakarzinoms Amplifikationen des *uPARs* und des *HER2*-Rezeptors untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mittels FISH nachgewiesene Genamplifikation des *uPAR* mit einer vermehrten uPAR-Proteinexpression korreliert (Meng et al. 2006). Auch am Pankreaskarzinom konnte dieser Zusammenhang mittels ELISA bereits gezeigt werden (50 Fälle, $r = 0.042$, $P = 0.002$; (Hildenbrand et al. 2009)). Diese Arbeiten, sowie die relativ alte Erkenntnis, dass der uPAR beim Pankreaskarzinom (Cantero et al. 1997), wie aber auch bei der chronischen Pankreatitis (Friess et al. 1997) regelhaft immunhistochemisch vermehrt nachgewiesen werden kann, erleichterten die Entscheidung, auf solche zusätzlichen Experimente zu verzichten. Darüber hinaus spielte inhaltlich der Gedanke eine Rolle, dass, wie ausführlich in der Einleitung beschrieben, die beiden ausgewählten Gene nicht nur als Repräsentanten eines Zielproteins mit einem bestimmten Effekt verstanden werden dürfen. *uPAR* und *c-MYC* sind vielmehr Knotenpunkte komplexer zellulärer Aktivitäten, die sich auf eine Vielzahl von Proteinen auswirken. Es ist also fraglich, ob insbesondere am Beispiel von *c-MYC*, der Nachweis

einer positiven Korrelation hoher MYC-Proteinlevel bei *c-MYC* amplifizierten FISH-Zellen eine notwendige Konstellation für die vorliegende Fragestellung darstellt. Schließlich sollte hier der mögliche Zusammenhang zwischen *uPAR* und *c-MYC* ganz grundsätzlich untersucht werden. Die Quantifizierung der Genveränderung stellt dafür ein gutes Kriterium dar. Was die Betrachtung der Korrelation von *c-MYC* Amplifikation und *c-MYC*-Proteinexpression angeht, liegt hinsichtlich der Literaturrecherche eine vielseitige und unklare Datenlage vor (beispielsweise Schleger et al. 2002 versus Blancato et al. 2004). Bei Schleger wird die gemessene niedrige Konkordanz mit verschiedenen Regulationsmechanismen erklärt und auch auf mögliche epigenetische Faktoren hingewiesen. Bei Blancato geht dem experimentellen Nachweis, dass beim Mamma-Karzinom eine hohe Konkordanz von MYC-Protein-Expression und Genamplifikation bestehen, eine gute Darstellung der Daten zu dieser Frage bei verschiedenen soliden wie hämatologischen Tumorerkrankungen voraus. Letztlich kommt man hier zu dem Schluss, dass selbst bei ein und derselben Entität unterschiedliche Daten und Konkordanzen generiert wurden und unterschiedliche Rollen von *c-MYC* angenommen werden sollten. Das Bild ist also insbesondere hinsichtlich der Proteinexpression uneinheitlich, aber das Konzept einer prognostischen Bedeutung hoher *c-MYC* Aktivität existiert zweifellos. Aus unserer Sicht konnte mit der vorliegenden Arbeit durch die Verknüpfung der genetischen *MYC*-Diagnostik mit den Überlebensdaten auch für das Pankreaskarzinom eine solche Annahme bestätigt werden.

4.3 Kritik der Ergebnisse und Abgleich mit anderen Studien

Die *uPAR*-Amplifikation in einem Pankreaskarzinomkollektiv ist in ähnlicher Weise 2009 an Mannheimer Patienten gezeigt worden (Hildenbrand et al. 2009). Auch hier war das Überleben von Patienten mit *uPAR*-Amplifikation signifikant verkürzt ($p=0,0009$). Die vorliegende Arbeit ist insofern eine Fortführung dieser hier bereits häufig zitierten Arbeit und verifiziert die Erkenntnis, dass *uPAR*-Amplifikationen eine eigenständige Subgruppe von Patienten mit einer Hochrisiko-Prognose kennzeichnen. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit anderen Methoden und höher standardisierten Patienten wird ferner validiert, dass *uPAR*-Amplifikationen häufig und unabhängig von Ort und Untersucher nachweisbar sind (siehe Abbildung 26).

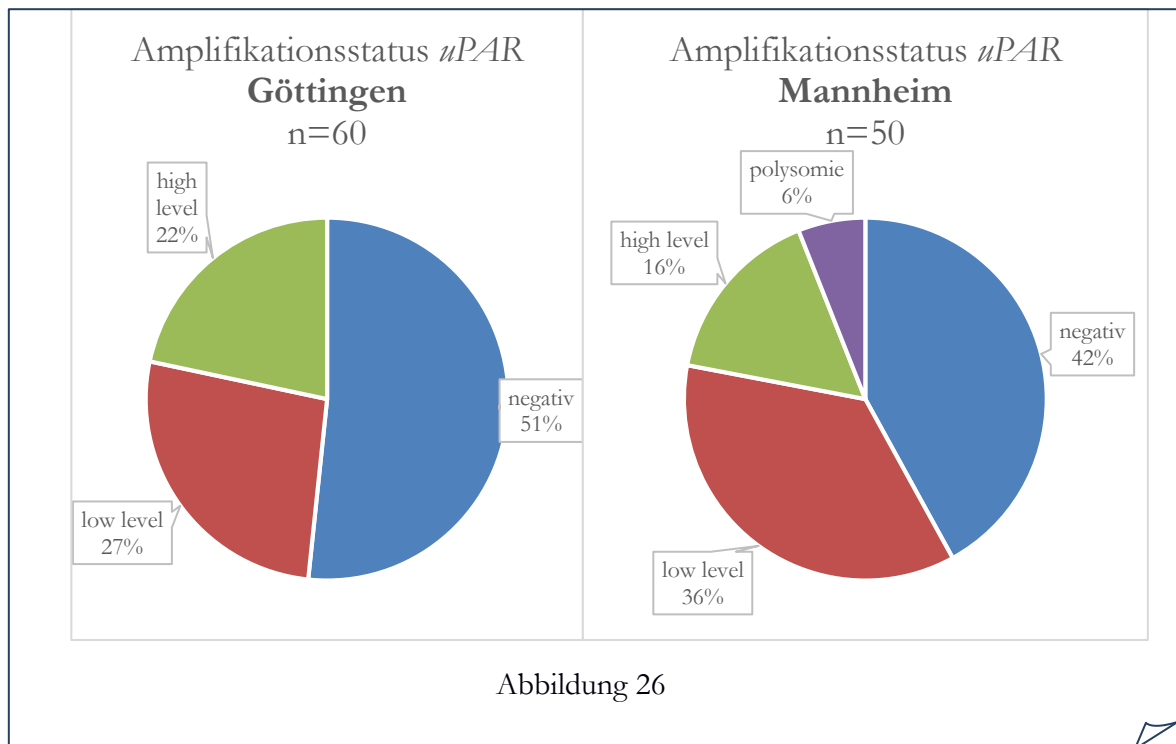


Abbildung 26

Ein genauerer Abgleich der Daten des Mannheimer und des Göttinger Kollektivs wurde allerdings vermieden, da in vielerlei Hinsicht große methodische Differenzen bestehen. Dies betrifft die Standardisierung der eingeschlossenen Patienten ebenso, wie die Durchführungsmodalitäten der FISH-Experimente. Anschaulich wird dies z. B. bei den Zahlen zum krankheitsfreien Überleben, das bei den Mannheimer Patienten von vornherein deutlich niedriger ist. Im Abgleich mit dem Göttinger Kollektiv stellt die Variable „Patient aus Mannheim“ eine statistisch signifikante Einflussgröße für kürzeres Überleben dar ($P=0,0021$).

Deutliche Unterschiede fanden sich aber auch auf molekularpathologischer Ebene, nämlich was die Vorläuferläsionen angeht. Im Göttinger Kollektiv zeigte sich hinsichtlich von Genamplifikationen ein ohne Ausnahme bei allen untersuchten Fällen unauffälliger Befund, was die PanIN-Läsionen betrifft. In Mannheim wurde dagegen eine Konkordanz von ca. 50% zwischen PanIN-Läsion und Karzinom festgestellt. Es wurden also in der Hälfte der Fälle genau jene Amplifikationscharakteristika in den Vorläuferläsionen des Tumors entdeckt, die sich im Tumor selber darstellen ließen. Die Ursachen für diese Diskrepanz sind nicht klar und nur schwer durch die beschriebenen unterschiedlichen methodisch unterschiedlichen Herangehensweisen erklärbar.

Auch für *c-MYC*-Amplifikationen existiert eine hier bereits mehrfach zitierte Mannheimer Studie, die bereits 2002 erstmals an einer größeren Gruppe von Pankreaskarzinompatienten mittels FISH *c-MYC*-Amplifikationen quantifiziert hat (Schleger et al. 2002). Diese Studie untersuchte neben dem Primarius u. a. auch korrespondierende Lymphknotenmetastasen,

wobei keine prognostischen Überlebensdaten in die Studie mit eingeflossen sind. Auch hier kommt ein detaillierterer Abgleich der Ergebnisse wegen der großen Unterschiede zur vorliegenden Arbeit letztlich nicht in Betracht. Es zeigt sich allerdings deutlich, dass auch die *c-MYC*-Amplifikation ein reproduzierbares und untersucherunabhängiges Ereignis beim Pankreaskarzinom darstellt (siehe Abbildung 27).

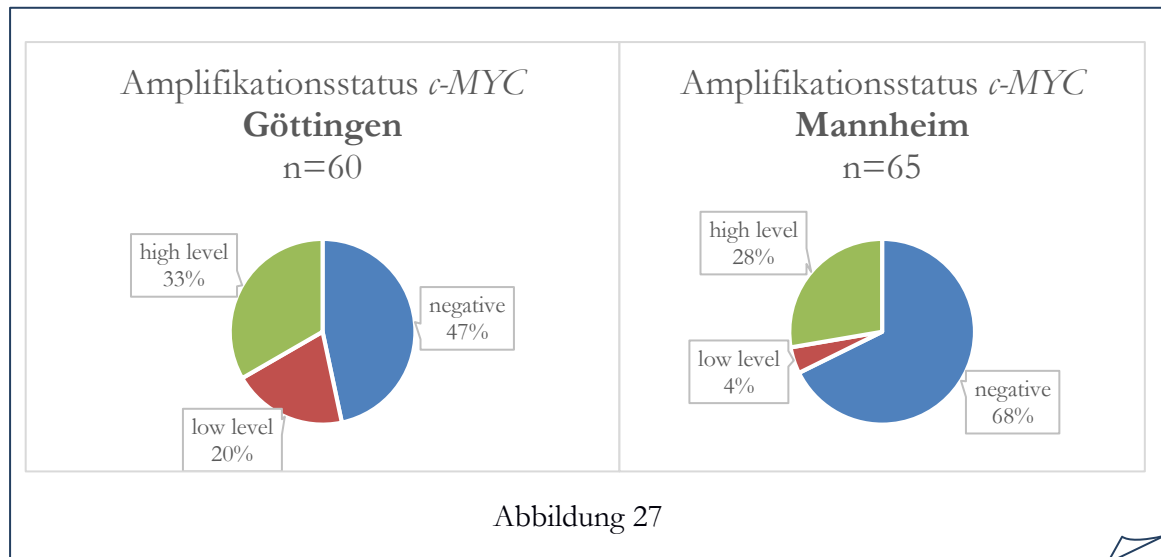


Abbildung 27

In dieser Studie wurde ferner darauf hingewiesen, dass der Amplifikationsgrad des *c-MYC* Gens keine signifikanten Korrelationen zu Tumorgröße oder Tumorstadium aufwies, woraus sich u. a. die Vermutung ableitet, die Rolle von *c-MYC* eher nicht im Bereich der lokalen Tumorausbreitung zu sehen. Daran lässt sich der hypothetische Unterbau der vorliegenden Arbeit anknüpfen, die ja, wie besprochen, die Rolle von *c-MYC* eher im Frühstadium der Erkrankung vermutet. *c-MYC*-Amplifikationen in Vorläuferläsionen sind bei Schleger zwar gefunden worden, aber die Fallzahl ($n=5$) ist zu klein, um daraus weitergehende Aussagen abzuleiten. In unserer Arbeit finden sich wiederum ausnahmslos keine *c-MYC* Amplifikationen in PanIN-Läsionen.

Darüber hinaus weist unser hochstandardisiertes Kollektiv eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$) der *c-MYC* Amplifikation mit kürzerem Überleben auf. Hieraus lässt sich ableiten, dass auch *c-MYC* in dieser Form ein eigenständiger Indikator für eine schlechtere Prognose beim Pankreaskarzinom ist. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Studien (vgl. z. B. He et al. 2014).

Anders als bei *pPAR* war dieses Ergebnis in einer multivariaten Analyse allerdings nicht mehr signifikant ($p= 0,4012$). Unserer Ansicht nach liegt der Schlüssel zum Verständnis dieser Beobachtung in einem Zusammenhang der beiden hier untersuchten Proteinsysteme. Schon die Literaturrecherche (siehe z. B. Kapitel 1.3.) hat Hinweise

aufgezeigt, dass die prognostischen Eigenschaften von *c-MYC* in einer Beziehung zum *uPAR* stehen könnten. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass ein *c-MYC*-amplifizierter Tumor überzufällig häufig *uPAR*-Amplifikationen ähnlicher Qualität aufweist. In einer multivariaten survival-Analyse blieb allerdings nur *uPAR* zumindest im Trend signifikant ($p=0,07$), während sich für *c-MYC* kein statistisch signifikanter Einfluss auf das Überleben nachweisen ließ.

In Anbetracht der enormen Bedeutung von *c-MYC* für die Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms (vgl. Hessmann et al. 2015) stellen aber beide Moleküle aussichtsreiche Kandidaten für eine molekular-zielgerichtete Therapie dar.

4.4 uPAR als therapeutisches Target

In der Summe konnte belegt werden, dass der uPA-Rezeptor in funktioneller, wie struktureller Hinsicht viele Eigenschaften auf sich vereint, die ihn zu einem aussichtsreichen Kandidaten einer gezielten Krebstherapie machen. Zusätzlich gibt es Hinweise, insbesondere aus Versuchsanordnungen, die solche gezielten Therapien erforschen, dass die Expression dieses Rezeptors einen selektiven Charakter hat, gesundes Gewebe also in der Regel kein oder zumindest weniger uPAR exprimiert als die Tumorzellen (Li und Cozzi 2007). Die in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse legen nahe, dass diese Konstellation auch auf eine definierbare Subgruppe von Pankreaskarzinompatienten zutrifft, nämlich zumindest auf jene, die *uPAR*-Genamplifikationen aufweisen.

Trotz Forschungsanstrengungen sind die Erfolge der letzten Jahrzehnte, diese Erkenntnisse in ein brauchbares Format der Bildgebung oder gar Pharmakotherapie zu übertragen, bislang kaum in der klinischen Anwendung angekommen. Zwar finden sich immer wieder Berichte über Studienanwendungen (z. B. auch beim Pankreaskarzinom, vgl. Heinemann et al. 2013), aber es fällt Stand heute schwer, etablierte Beispiele aus Diagnostik und Therapie zu zitieren, in deren Zentrum der uPAR steht.

Wichtig erscheint an dieser Stelle zu erwähnen, dass die vieldimensionale Betrachtung des uPAR als Repräsentant eines Systems hier allerdings eine Wiederbelebung der uPAR-Forschung darstellt. Historisch betrachtet ist nämlich ersichtlich, dass in den meisten Fällen plasminassoziierte uPAR-Mechanismen im Fokus standen, also vor allem die Interaktion von uPAR mit dem Liganden uPA. Vereinfacht gesprochen kann man ex post davon ausgehen, dass dadurch vor allem die proteolytischen Teilaspekte des uPAS beeinflusst wurden. Schlagworte sind hier u. a.: Fibrinolyse, Matrixdegradation, Metalloproteasen. Die oben herausgestellten Interaktionen mit Korezeptoren und auch die adhäsiven Eigenschaften, also insbesondere die Mechanismen der Signaltransduktion, blieben von diesen Pharmakodesigns möglicherweise unbeeinflusst, da sie eben uPA-unabhängig sind

und durch andere Proteine, bzw. Epitope gesteuert werden. Mäßige tumorregressive Effekte klassischer Pharmokodesigns ließen sich so erklären, z. B. wenn man davon ausgeht, dass Vitronektin, nicht aber Plasmin, der entscheidende Faktor bei der Signaltransduktion ist. Abbildung 28a und 28b sind stark modifizierte Darstellungen, angelehnt an eine Arbeit von Gonias aus *Frontiers in Pharmacology* von 2015 (Gonias und Hu 2015) und sollen die Trennung der funktionellen Dimensionen des uPARs im Zusammenhang mit der Pharmakotherapie veranschaulichen.

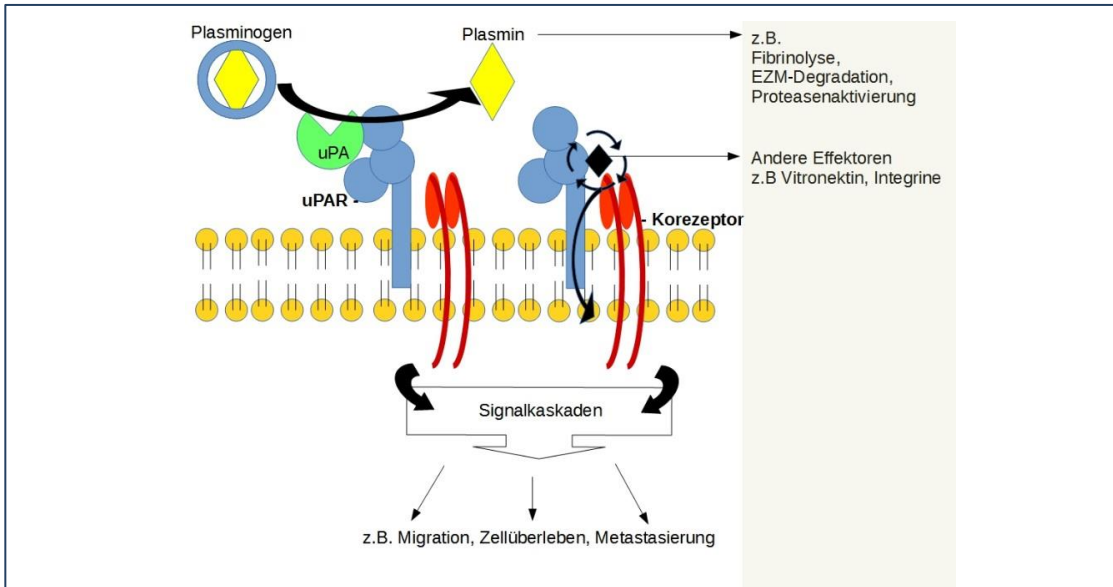


Abbildung 28a: uPAS ohne pharmakologischen Einfluss

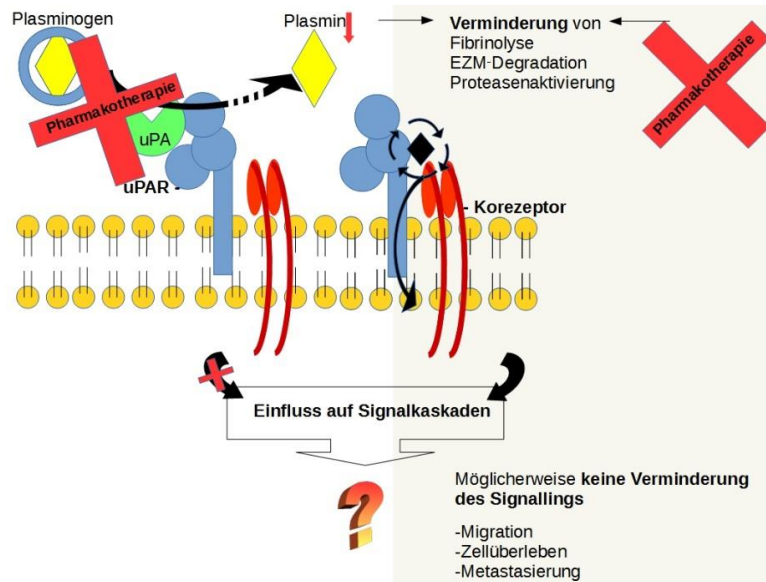


Abbildung 28b: uPAS mit intaktem *signalling* unter selektiver Pharmakotherapie

Quelle: Bilder erstellt durch F. Fuchs (modifiziert nach Gonias und Hu 2015, Creative Commons- Lizenz)

Konsekutiv erscheint es sinnvoll, einen kurzen Blick auf eine Auswahl neuerer Ideen hinsichtlich der gezielten uPAR-Therapie zu richten.

Zunächst gibt es viele Konzepte, die Überexpression des uPAR im pathologischen Gewebe als Zielstruktur zu nutzen, um zytotoxische Stoffe gezielt in dieses Gewebe einzuschleusen. Zum Teil bedient man sich des in der Einleitung beschriebenen physiologischen Abbaumechanismus via Endozytose. Aber auch die stabile Bindungsaffinität bekannter Moleküle wie des ATF zum uPAR werden genutzt, um Konjugate mit klinisch nutzbaren Molekülen zu designen. Beispielhaft erwähnt seien Studien mit lokal destruierenden Radionukliden, deren diagnostisches und therapeutisches Potential gut belegt ist (z. B. Allen et al. 2014 oder Persson et al. 2014). Auch die photodynamische Therapie kann auf Basis des uPAR selektiv eingesetzt werden (Zhou et al. 2015).

Besondere Aufmerksamkeit gilt insbesondere jenen Antikörpern, die nicht die uPA-uPAR-Interaktion betreffen. Ein herausragender Kandidat ist der neuere uPAR-Antikörper ATN-658, da er eine Bindungsstelle betrifft, die als Funktionseinheit der Integrin-uPAR-Interaktion identifiziert werden konnte (Xu et al. 2014). Insofern knüpft er an die obigen Bild Darstellungen an, und seine Antitumoreffekte sind vielversprechend, auch hinsichtlich des Pankreaskarzinoms, zumindest im Mausmodell (Bauer et al. 2005). Einen detaillierteren Überblick zu uPAR-Therapieoptionen geben Mazar et. al. (2011). Grundsätzlich gibt es vielfältige, aussichtsreiche Konzepte der therapeutischen und diagnostischen Nutzung des uPAR im Bereich der Krebsmedizin. Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung dieses Systems für die Progression des Pankreaskarzinoms und präsentiert daran anknüpfend eine reproduzierbare molekularpathologische Methode zur Identifikation einer klinischen Hochrisiko-Gruppe.

Dies lässt sich am Beispiel der oben zitierten Phase-II-Studie von Heinemann et. al. (2013) verdeutlichen. Hier wurde randomisiert bei einigen Patienten mit nicht-resektablem Pankreaskarzinomen eine pharmakologische Inhibition des uPAS mit upamostat (WX-671) zusätzlich zur Chemotherapie durchgeführt. Im Vergleich zeigte diese Gruppe keine signifikanten Effekte hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens. Aus unserer Sicht wäre ein Setting zu bevorzugen, das zunächst, wie hier erarbeitet, jene Patienten identifiziert, die eine Genamplifikation des uPAR aufweisen, ähnlich dem HER2-Neu-Konzept beim Mammakarzinom. Ergänzend zu den oben herausgehobenen pharmakologischen Ansätzen mit möglicherweise direkten prognoserelevanten Antitumoreffekten durch Alpha-Strahlung oder Antikörper via uPAR, könnten sich auch weitere Erkenntnisse ergeben. In der oben bereits aufgeführten Arbeit von Gonias und Hu aus dem Jahr 2015 wird uPAR z. B. auch als starke Einflussgröße auf die Toxizität einiger Krebsmedikamente beschrieben, im Sinne einer Minderung der Toxizität durch uPAR-*signalling*.

4.5 p16, p53 und KRAS

Neben *uPAR* und *c-MYC* wurden in dieser Studie drei weitere Marker untersucht, die als Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene Einfluss auf die Prognose und Therapierbarkeit des Pankreaskarzinoms haben. In der statistischen Analyse ergaben sich keine signifikanten Korrelationen von genetischen Veränderungen bei KRAS, p16 oder p53 in Verbindung mit den FISH-Ergebnissen von *uPAR* und *c-MYC*. Auch zeigte die multivariate Statistik keine signifikanten Einflüsse von p16, KRAS oder p53 auf das Überleben.

Die Ausprägungen der quantifizierbaren Mutationen im Patientenkollektiv lassen ferner den Schluss zu, dass ein hoher Deckungsgrad mit der gängigen Literatur zum Pankreaskarzinom besteht (siehe Tabelle 4).

Mutationsraten:	KRAS	p16	p53
PDAC allgemein	>90%	40%	50-70%
Studienkollektiv	66%	45%	77%

Tabelle 4: Mutationsraten beim Pankreaskarzinom (vgl. Hamilton und Aaltonen 2000)

Zwar liegt insbesondere hinsichtlich des KRAS-Gens eine deutlich niedrigere Quote an Mutationen vor, aber durch die erfolgte Subspezifizierung der KRAS-Mutationen zeigt sich, dass das Spektrum des untersuchten Kollektivs dem allgemeinen Spektrum des Pankreaskarzinoms entspricht. An dieser Stelle sei auch erwähnt, dass ein primär kurativer Therapieplan bei allen Patienten des Kollektivs Einschlusskriterium war und somit eine hohe Selektion hinsichtlich potenziell negativer Merkmalsausprägungen stattgefunden hat.

Zudem lassen sich niedrigere Mutationsraten möglicherweise in das Bild einfügen, dass individualisierte pharmakotherapeutische Konzepte in diesem hochselektierten Kollektiv lohnend erscheinen, denn Mutationen aller drei untersuchten Marker wirken sich in unterschiedlicher Weise negativ auf die Pharmakosensibilität aus (Giovannetti et al. 2006).

5 Zusammenfassung


Mit dem Gen des Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptors und dem *c-MYC*-Gen wurde in dieser Arbeit der prognostische Einfluss dieser zwei wichtigen Onkogene beim Pankreaskarzinom in einem hoch standardisierten und histopathologisch gut charakterisierten Patientenkollektiv mit bekanntem klinischen Follow-up untersucht.

Außerdem sollte ein standardisiertes Verfahren für die pathologische Diagnostik etabliert werden, das eine zukünftige Identifikation dieser Subgruppe erleichtert und somit z. B. ein individualisiertes Therapiekonzept möglich macht.


Im Ergebnis und im Abgleich mit anderen Studien konnten wir zeigen, dass die Amplifikation des *uPAR* ein häufiges, untersucherunabhängiges Ereignis bei Pankreaskarzinompatienten darstellt und signifikant das Überleben verschlechtert. Auch die *c-MYC*-Amplifikation stellt einen eigenständigen Indikator für eine schlechte Prognose beim PDAC dar. Ein weiteres wichtiges Ergebnis war die Beobachtung, dass beide Gene häufig koamplifiziert sind und auch der Amplifikationsgrad beider Gene eng korreliert. Ob sich hieraus ein funktioneller Zusammenhang ableiten lässt, der es in der Folge auch ermöglichen könnte, das System MYC über den uPAR zu beeinflussen, bedarf weiterer Forschungsanstrengungen. In einer multivariaten Survival-Analyse ergab sich nur für uPAR ein statistisch signifikanter Trend.

uPAR integriert zahlreiche Zellfunktionen, die sich maligne Zellen zu eigen machen können und ist als ortsständiger Rezeptor ein spezifischer und vielversprechender Anknüpfungspunkt für Therapie und Diagnostik im Tumor und der direkten Tumorumgebung. Das in dieser Arbeit vorgeschlagene und etablierte molekularpathologische Diagnoseprotokoll, das dem HER2/neu-Setting des Mammakarzinoms ähnelt, ermöglicht in der Zukunft eine Identifikation dieser häufigen Subgruppe von Patienten, insbesondere des PDAC. Dieses Protokoll eröffnet daher neue Perspektiven hinsichtlich der laufenden Anstrengungen um eine therapeutische und diagnostische Nutzung des *uPARs* bei verschiedenen Tumorerkrankungen.

6 Anhang



Zentrum Pathologie
Georg-August-Universitätsmedizin
Göttingen



Report OT-Details

Fallnummer KITZ	Pathologe	MTA
Name		

OT-Nummer	Externe OT-Nummer	Block	Typ	Präparat	Entparaffinierung	Demaskierung	Protokoll	Kontrolle	OT-Notizen
2437		30354/09N		FFPE	<input checked="" type="checkbox"/>	FLEX TRS High	p53 (IR616)	<input type="checkbox"/>	
Auftröpfzonen		Stainer - Gestell - Position	Programmiert	Fertig	Nutzer				
		AS1 - 4 - 2	31.05.2013 11:21:01	03.06.2013 20:26:21	xx, xx				
		Objektträger-Troc							

Citrat Puffer

Dako

(come D0-7)

Code-Nr.	Name Reagenz	Volumen (µl)	Inkubation	OT-Protokoll
	Buffer		0	03.06.2013 17:28:55 Färbung beginnt
SM801	FLEX Peroxidase Block	100 <i>RTU</i>	5	03.06.2013 17:31:39 Mit Puffer gespült
	Buffer		0	03.06.2013 17:45:18 Blasen Sie und tragen Sie 100 µl EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (00091289 2014-04-30) [2,3] auf
IR616	p53 (IR616)	100	20	03.06.2013 17:50:17 Mit Puffer gespült
	Buffer		0	03.06.2013 18:00:03 Blasen Sie und tragen Sie 100 µl FLEX p53 Protein, MxH (DO-7) (00088154 2014-10-31) [2,3] auf
SM804	FLEX+ Mouse (LINKER)	100 <i>RTU</i>	15	03.06.2013 18:20:05 Mit Puffer gespült
	Buffer		0	03.06.2013 18:29:52 Blasen Sie und tragen Sie 100 µl EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) (00091307 2014-02-28) [2,3] auf
SM802	FLEX /HRP	100 <i>RTU</i>	20	03.06.2013 18:44:54 Mit Puffer gespült
	Buffer		5	03.06.2013 18:54:39 Blasen Sie und tragen Sie 100 µl EnVision FLEX /HRP (00092543 2014-04-30) [2,3] auf
SM803	FLEX DAB+ Sub-Chromo	200	10	03.06.2013 19:14:40 Mit Puffer gespült
	Buffer		0	03.06.2013 19:21:02 Mit Puffer gespült
SM806	FLEX Hematoxylin	200	8	03.06.2013 19:37:43 Blasen Sie und tragen Sie 200 µl Substrate Working Solution (mix) (00091308 2014-03-31) [2,3] auf
	Buffer		0	03.06.2013 19:47:51 Mit Puffer gespült
	DI Water		0	03.06.2013 20:08:57 Blasen Sie und tragen Sie 200 µl EnVision FLEX Hematoxylin (00091207 2014-03-31) [2,3] auf
			0	03.06.2013 20:17:05 Mit Puffer gespült
			0	03.06.2013 20:26:17 Mit Wasser gespült
			0	03.06.2013 20:26:17 Färbung abgeschlossen
			0	03.06.2013 20:29:28 Lufttrocknen


x Dako = Detektionszeit = Envision Flex + K8002

2. Schritt beendet


Gedruckt von: xx, xx
Gedruckt am: 29.08.2014 11:07:25

Version: 3.0.34.987
Seite 1

Anlage 1: p53-Protokoll UMG



Zentrum Pathologie
Georg-August-Universitätsmedizin
Göttingen



Report OT-Details

Fallnummer KITZ	Pathologe	MTA
Name		

OT-Nummer	Externe OT-Nummer	Block	Typ	Präparat	Entparaffinierung	Demaskierung	Protokoll	Kontrolle	OT-Notizen
2515		6810/11H2		FFPE	<input checked="" type="checkbox"/>	FLEX TRS High	p16 1:100	<input type="checkbox"/>	
Auftröpfzonen		Stainer - Gestell - Position	Programmiert	Fertig	Nutzer				
		AS2 - 2 - 6	31.05.2013 12:20:23	05.06.2013 19:25:50	xx, xx				
		Objektträger-Troc							

S630

SC JCP

monoclonal

Code-Nr.	Name Reagenz	Volumen (µl)	Inkubation	OT-Protokoll
	Buffer		0	05.06.2013 16:59:05 Färbung beginnt
SM801	FLEX Peroxidase Block	100	5	05.06.2013 17:06:21 Mit Puffer gespült
	Buffer		0	05.06.2013 17:09:35 Blasen Sie und tragen Sie 100 µl EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (00094490 2014-05-31) [2,3] auf
	p16 1:100	100	20	05.06.2013 17:11:39 Mit Puffer gespült
	Buffer		0	05.06.2013 17:25:28 Blasen Sie und tragen Sie 100 µl p16 1:100 (10074538 2014-06-21) [2,3] auf
SM802	FLEX /HRP	100	20	05.06.2013 17:45:18 Mit Puffer gespült
	Buffer		0	05.06.2013 17:53:53 Blasen Sie und tragen Sie 100 µl EnVision FLEX /HRP (00094492 2014-05-31) [2,3] auf
SM803	FLEX DAB+ Sub-Chromo	200	10	05.06.2013 18:13:58 Mit Puffer gespült
	Buffer		0	05.06.2013 18:21:34 Blasen Sie und tragen Sie 200 µl Substrate Working Solution (mix) (00091308 2014-03-31) [2,3] auf
SM806	FLEX Hematoxylin	200	8	05.06.2013 18:42:57 Mit Puffer gespült
	Buffer		0	05.06.2013 19:01:44 Blasen Sie und tragen Sie 200 µl EnVision FLEX Hematoxylin (00091207 2014-03-31) [2,3] auf
	DI Water		0	05.06.2013 19:09:49 Mit Puffer gespült
			0	05.06.2013 19:25:46 Mit Wasser gespült
			0	05.06.2013 19:25:46 Färbung abgeschlossen
			0	05.06.2013 19:30:04 Lufttrocknen

x K8002 Dako

Gedruckt von: xx, xx
Gedruckt am: 29.08.2014 11:06:58

Version: 3.0.34.987
Seite 1

Anlage 2: p16-Protokoll UMG

7 Literaturverzeichnis

- Aguirre-Ghiso JA (2002): Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo. *Oncogene* 21, 2513–2524
- Aguirre-Ghiso JA, Liu D, Mignatti A, Kovalski K, Ossowski L (2001): Urokinase Receptor and Fibronectin Regulate the ERK/MAPK to p38/MAPK Activity Ratios That Determine Carcinoma Cell Proliferation or Dormancy In Vivo. *Mol Biol Cell* 12, 863–879
- Alfano D, Votta G, Schulze A, Downward J, Caputi M, Stoppelli MP, Iaccarino I (2010): Modulation of cellular migration and survival by c-Myc through the downregulation of urokinase (uPA) and uPA receptor. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1838–1851
- Alfano D, Ragno P, Stoppelli MP, Ridley AJ (2012): RhoB regulates uPAR signalling. *J Cell Sci* 125, 2369–2380
- Allen BJ, Huang CY, Clarke RA (2014): Targeted alpha anticancer therapies: update and future prospects. *Biologics* 8, 255–267
- Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ (1997): The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72, 1–22
- Ashour AA, Gurbuz N, Alpay SN, Abdel-Aziz A-AH, Mansour AM, Huo L, Ozpolat B (2014): Elongation factor-2 kinase regulates TG2/ β 1 integrin/Src/uPAR pathway and epithelial–mesenchymal transition mediating pancreatic cancer cells invasion. *J Cell Mol Med* 18, 2235–2251
- Baek MK, Kim MH, Jang HJ, Park JS, Chung IJ, Shin BA, Ahn BW, Jung YD (2008): EGF stimulates uPAR expression and cell invasiveness through ERK, AP-1, and NF-kappaB signaling in human gastric carcinoma cells. *Oncol Rep* 20, 1569–1575
- Bao Y-N, Cao X, Luo D-H, Sun R, Peng L-X, Wang L, Yan Y-P, Zheng L-S, Xie P, Cao Y et al. (2014): Urokinase-type plasminogen activator receptor signaling is critical in nasopharyngeal carcinoma cell growth and metastasis. *Cell Cycle* 13, 1958–1969
- Baricos WH, Cortez SL, el-Dahr SS, Schnaper HW (1995): ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade. *Kidney Int* 47, 1039–1047
- Bass R, Werner F, Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F, Ellis V (2005): Regulation of urokinase receptor proteolytic function by the tetraspanin CD82. *J Biol Chem* 280, 14811–14818
- Bauer TW, Liu W, Fan F, Camp ER, Yang A, Somcio RJ, Bucana CD, Callahan J, Parry GC, Evans DB et al. (2005): Targeting of Urokinase Plasminogen Activator Receptor in Human Pancreatic Carcinoma Cells Inhibits c-Met- and Insulin-like Growth Factor-I Receptor-Mediated Migration and Invasion and Orthotopic Tumor Growth in Mice. *Cancer Res* 65, 7775–7781
- Behrendt N (2004): The urokinase receptor (uPAR) and the aPAR-associated protein (uPARAP/Endo180) Membrane proteins engaged in matrix turnover during tissue remodeling. *Biol Chem* 385, 103–136

-
- Behrendt N, List K, Andreasen PA, Dan K (2003): The pro-urokinase plasminogen-activation system in the presence of serpin-type inhibitors and the urokinase receptor: rescue of activity through reciprocal pro-enzyme activation. *Biochem J* 371, 277–287
- Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D, Robecchi A, Emanuelli G, Rodeck U (1999): Tumor-Associated Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10 Contribute to a Systemic Th2 Immune Phenotype in Pancreatic Carcinoma Patients. *Am J Pathol* 155, 537–547
- Bieda M, Xu X, Singer MA, Green R, Farnham PJ (2006): Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome. *Genome Res* 16, 595–605
- Birnbaum DJ, Adélaïde J, Mamessier E, Finetti P, Lagarde A, Monges G, Viret F, Gonçalves A, Turrini O, Delperio J et al. (2011): Genome profiling of pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 50, 456–465
- Blancato J, Singh B, Liu A, Liao DJ, Dickson RB (2004): Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer* 90, 1612–1619
- Blasi F, Sidenius N (2010): The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett* 584, 1923–1930
- Bohuslav J, Horejsi V, Hansmann C, Stockl J, Weidle UH, Majdic O, Bartke I, Knapp W, Stockinger H (1995): Urokinase plasminogen activator receptor, beta 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J Exp Med* 181, 1381–1390
- Børglum A.D., Byskov A., Ragno P. (1992): Assignment of the Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Gene (PLAUR) to Chromosome 1 9q 13.1 -q 13.2. *Am J Hum Genet*, 50, 492–497
- Cantero D, Friess H, Deflorin J, Zimmermann A, Brundler MA, Riesle E, Korc M, Buchler MW (1997): Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 75, 388–395
- Carrato A, Falcone A, Ducreux M, Valle JW, Parnaby A, Djazouli K, Alnwick-Allu K, Hutchings A, Palaska C, Parthenaki I (2015): A Systematic Review of the Burden of Pancreatic Cancer in Europe: Real-World Impact on Survival, Quality of Life and Costs. *J Gastrointest Cancer* 46, 201–211
- Chabot V, Dromard C, Rico A, Langonne A, Gaillard J, Guilloton F, Casteilla L, Sensebe L (2015): Urokinase-type plasminogen activator receptor interaction with beta1 integrin is required for platelet-derived growth factor-AB-induced human mesenchymal stem/stromal cell migration. *Stem Cell Res Ther* 6, 188
- Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Ransom J, Andrade M de, Petersen GM (2005): Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology* 129, 504–511
- Chaurasia P, Aguirre-Ghiso JA, Liang OD, Gardsvoll H, Ploug M, Ossowski L (2006): A region in urokinase plasminogen receptor domain III controlling a functional association with alpha5beta1 integrin and tumor growth. *J Biol Chem* 281, 14852–14863
- Collen D, Lijnen HR (1995): Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb Haemost* 74, 167–171

-
- Conese M, Olson D, Blasi F (1994): Protease nexin-1-urokinase complexes are internalized and degraded through a mechanism that requires both urokinase receptor and alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 269, 17886–17892
- Cowling VH, Cole MD (2007): The Myc Transactivation Domain Promotes Global Phosphorylation of the RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain Independently of Direct DNA Binding. *Mol Cell Biol* 27, 2059–2073
- Cubellis MV, Nolli ML, Cassani G, Blasi F (1986): Binding of single-chain prourokinase to the urokinase receptor of human U937 cells. *J Biol Chem* 261, 15819–15822
- Dai M-S, Jin Y, Gallegos JR, Lu H (2006): Balance of Yin and Yang: ubiquitylation-mediated regulation of p53 and c-Myc. *Neoplasia* 8, 630–644
- Dang CV (2012): MYC on the Path to Cancer. *Cell* 149, 22–35
- Dang CV (1999): c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Mol Cell Biol* 1, 1-11
- Danø K., Rømer J., Nielsen BS, Bjørn S, Pyke C, Rygaard J, Lund LR. (1999): Cancer invasion and tissue remodeling-cooperation of protease systems and cell types. *APMIS* 107, 120–127
- Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH (2008): Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev* 34, 122–136
- Degryse B, Resnati M, Czekay R-P, Loskutoff DJ, Blasi F (2005): Domain 2 of the urokinase receptor contains an integrin-interacting epitope with intrinsic signaling activity: generation of a new integrin inhibitor. *J Biol Chem* 280, 24792–24803
- Del Prete A, Allavena P, Santoro G, Fumarulo R, Corsi MM, Mantovani A (2011): Molecular pathways in cancer-related inflammation. *Biochem Med (Zagreb)* 21, 264–275
- Derynck R, Zhang YE (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577–584
- Deryugina EI, Quigley JP (2012): Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme. *J Biomed Biotechnol* 2012,
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF: Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. AWMF-Registernummer: 032/010OL (2013)
- Di Magliano MP, Logsdon CD (2013): Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. *Gastroenterology* 144, 1220–1229
- Di Simon, Rao NK, Xu H, Wei Y, Majdic O, Ronne E, Kobzik L, Chapman HA (1996): Mac-1 (CD11b/CD18) and the urokinase receptor (CD87) form a functional unit on monocytic cells. *Blood* 88, 3185–3194
- Diaz VM (2004): Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t-PA) with annexin II on the membrane of pancreatic cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro. *Gut* 53, 993–1000
- Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grutzmann R (2014): Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res Int* 2014, 474905
- Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, Galloway DA, Gu W, Gautier J, Dalla-Favera R (2007): Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 448, 445–451

-
- Dumler I, Kopmann A, Weis A, Mayboroda OA, Wagner K, Gulba DC, Haller H (1999): Urokinase activates the Jak/Stat signal transduction pathway in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 290–297
- Eaton DL, Scott RW, Baker JB (1984): Purification of human fibroblast urokinase proenzyme and analysis of its regulation by proteases and protease nexin. *J Biol Chem* 259, 6241–6247
- Eilers M, Eisenman RN (2008): Myc's broad reach. *Genes Dev* 22, 2755–2766
- Ellis V (1996): Functional analysis of the cellular receptor for urokinase in plasminogen activation. Receptor binding has no influence on the zymogenic nature of pro-urokinase. *J Biol Chem* 271, 14779–14784
- Ellis V, Behrendt N, Dano K (1991): Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol Chem* 266, 12752–12758
- Ferraris GMS, Schulte C, Buttiglione V, Lorenzi V de, Piontini A, Galluzzi M, Podestà A, Madsen CD, Sidenius N (2014): The interaction between uPAR and vitronectin triggers ligand-independent adhesion signalling by integrins. *EMBO J* 33, 2458–72
- Ferraris GMS, Sidenius N (2013): Urokinase plasminogen activator receptor: a functional integrator of extracellular proteolysis, cell adhesion, and signal transduction. *Semin. Thromb. Hemost.* 39, 347–355
- Friess H, Cantero D, Graber H, Tang WH, Guo X, Kashiwagi M, Zimmermann A, Gold L, Korc M, Buchler MW (1997): Enhanced urokinase plasminogen activation in chronic pancreatitis suggests a role in its pathogenesis. *Gastroenterology* 113, 904–913
- Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Hunter DJ, Rimm EB, Willett WC, Speizer FE (1996): A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch Intern Med* 156, 2255–2260
- Galat A, Gross G, Drevet P, Sato A, Ménez A (2008): Conserved structural determinants in three-fingered protein domains. *FEBS J* 275, 3207–3225
- Gao W, Wang Z, Bai X, Xi X, Ruan C (2001): Detection of Soluble Urokinase Receptor by Immunoradiometric Assay and Its Application in Tumor Patients. *Thrombosis Research* 102, 25–31
- Giovannetti E, Mey V, Nannizzi S, Pasqualetti G, Tacca MD, Danesi R (2006): Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 5, 1387–1395
- Goitia-Durán MB, Linhares MM, Artigiani Neto R, Apodaca-Torrez FR, Lobo EJ, Goldenberg A (2010): Expression of p53, p16 and Ki67 proteins in ductal adenocarcinoma of the pancreatic head and their relation with survival and cell differentiation. *Einstein (São Paulo)* 8, 444–448
- Gonias SL, Hu J (2015): Urokinase receptor and resistance to targeted anticancer agents. *Front Pharmacol* 6, 154
- Goulding H, Pinder S, Cannon P, Pearson D, Nicholson R, Snead D, Bell J, Elston CW, Robertson JF, Blamey RW (1995): A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin-fixed tissue samples. *Hum Pathol* 26, 291–294

-
- Hamilton SR, Aaltonen L.A. (Eds.): Pathology and genetics of tumours of the digestive system: World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon 2000
- Han H, Bearss DJ, Browne LW, Calaluce R, Nagle RB, Hoff DD von (2002): Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res* 62, 2890–2896
- Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674
- He C, Jiang H, Geng S, Sheng H, Shen X, Zhang X, Zhu S, Chen X, Yang C, Gao H (2014): Expression and prognostic value of c-Myc and Fas (CD95/APO1) in patients with pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 742–750
- He X, Zheng Z, Li J, Ben Q, Liu J, Zhang J, Ji J, Yu B, Chen X, Su L et al. (2012): DJ-1 promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer cells by activating SRC/ERK/uPA. *Carcinogenesis* 33, 555–562
- Heinemann V, Ebert MP, Laubender RP, Bevan P, Mala C, Boeck S (2013): Phase II randomised proof-of-concept study of the urokinase inhibitor upamostat (WX-671) in combination with gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with non-resectable, locally advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 108, 766–770
- Heinrich PC, Müller M, Graeve L: Löffler/Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie*; 9. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2014
- Henic E, Noskova V, Hoyer-Hansen G, Hansson S, Casslen B (2009): Estradiol attenuates EGF-induced rapid uPAR mobilization and cell migration via the G-protein-coupled receptor 30 in ovarian cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 19, 214–222
- Hessmann E, Schneider G, Ellenrieder V, Siveke JT (2015): MYC in pancreatic cancer: novel mechanistic insights and their translation into therapeutic strategies. *Oncogene* 35, 1609–18
- Hidalgo M (2010): Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 362, 1605–1617
- Hildenbrand R, Niedergethmann M, Marx A, Belharazem D, Allgayer H, Schleger C, Ströbel P (2009): Amplification of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene in ductal pancreatic carcinomas identifies a clinically high-risk group. *Am J Pathol* 174, 2246–2253
- Hoffman B, Liebermann DA (1998): The proto-oncogene c-myc and apoptosis. *Oncogene* 17, 3351–3357
- Hopman AH, van Hooren E, van de Kaa, C A, Vooijs PG, Ramaekers FC (1991): Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in paraffin sections of routinely processed bladder cancers. *Mod Pathol* 4, 503–513
- Horiuchi D, Anderton B, Goga A (2014): Taking on challenging targets: making MYC druggable. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 502, e497-502
- Hoyer-Hansen G, Ronne E, Solberg H, Behrendt N, Ploug M, Lund LR, Ellis V, Dano K (1992): Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. *J Biol Chem* 267, 18224–18229
- Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T et al. (2004): An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 28, 977–987

-
- Huang C, Xie D, Cui J, Li Q, Gao Y, Xie K (2014): FOXM1c promotes pancreatic cancer epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis via upregulation of expression of the urokinase plasminogen activator system. *Clin Cancer Res* 20, 1477–1488
- Huai, Andrew P. Mazar, Alice Kuo, Graham C. Parry (2006): Structure of Human Urokinase Plasminogen Activator in Complex with Its Receptor. *Science* 311, 656–659
- Hulten M, Dhanjal S, Pertl B (2003): Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: Advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* 126, 279–297
- Humphris JL, Johns AL, Simpson SH, Cowley MJ, Pajic M, Chang DK, Nagrial AM, Chin VT, Chantrill LA, Pinese M et al. (2014): Clinical and pathologic features of familial pancreatic cancer. *Cancer* 120, 3669–3675
- Ischenko I, Petrenko O, Hayman MJ (2014): Analysis of the tumor-initiating and metastatic capacity of PDX1-positive cells from the adult pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 3466–3471
- Jo M, Thomas KS, Takimoto S, Gaultier A, Hsieh EH, Lester RD, Gonias SL (2007): Urokinase receptor primes cells to proliferate in response to epidermal growth factor. *Oncogene* 26, 2585–2594
- Jones S., Zhang X., Parsons D.W. (2008): Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* 2008, 1801–1806
- Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, et.al., Kaatsch P, Spix C, Katalinic A et al.: Krebs in Deutschland 2011/2012 // Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 10. Ausgabe; Robert Koch-Institut, Berlin 2015
- Kapuscinski J (1995): DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 70, 220–233
- Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, Wang F, Sparr J, Raymond VM, Bandipalliam P, Stoffel EM, Gruber SB, Syngal S (2009): Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA* 302, 1790–1795
- Khoi PN, Park JS, Kim NH, Jung YD (2012): Nicotine stimulates urokinase-type plasminogen activator receptor expression and cell invasiveness through mitogen-activated protein kinase and reactive oxygen species signaling in ECV304 endothelial cells. *Toxicol. Appl Pharmacol* 259, 248–256
- Khoi PN, Xia Y, Lian S, Kim HD, Kim DH, Joo YE, Chay K-O, Kim KK, Jung YD (2014): Cadmium induces urokinase-type plasminogen activator receptor expression and the cell invasiveness of human gastric cancer cells via the ERK-1/2, NF- κ B, and AP-1 signaling pathways. *Int. J. Oncol.* 45, 1760–1768
- Kjaergaard M.L., Hansen LV, Gardsvoll H., Ploug M. (2008): Structure and ligand interactions of the urokinase receptor (uPAR). *Front Biosci* 13, 5441–5461
- Klein AP (2012): Genetic Susceptibility to Pancreatic Cancer. *Mol Carcinog* 51, 14–24
- Klein WM, Hruban RH, Klein-Szanto AJ, Wilentz RE (2002): Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): additional evidence for a recently proposed model of progression. *Mod Pathol* 15, 441–447
- Knoepfler PS (2007): Myc goes global: new tricks for an old oncogene. *Cancer Res* 67, 5061–5063

-
- Korsse SE, Harinck F, van Lier MG, Biermann K, Offerhaus GJ, Krak N, Looman CW, van Veelen W, Kuipers EJ, Wagner A et al. (2013): Pancreatic cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome patients: a large cohort study and implications for surveillance. *J Med Genet* 50, 59–64
- Koshelnick Y, Ehart M, Hufnagl P, Heinrich PC, Binder BR (1997): Urokinase Receptor Is Associated with the Components of the JAK1/STAT1 Signaling Pathway and Leads to Activation of This Pathway upon Receptor Clustering in the Human Kidney Epithelial Tumor Cell Line TCL-598. *J Biol Chem* 272, 28563–28567
- Krska Z, Svab J, Hoskovec D, Ulrych J (2015): Pancreatic Cancer Diagnostics and Treatment--Current State. *Prague Med Rep* 116, 253–267
- Krüger A, Soeltl R, Lutz V, Wilhelm OG, Magdolen V, Rojo EE, Hantzopoulos PA, Graeff H, Gänsbacher B, Schmitt M (2000): Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer Gene Ther* 7, 292–299
- Kruithof E, Dunoyer-Geindre S (2014): Human tissue-type plasminogen activator. *Thromb Haemost* 112, 243–254
- Laffert M von, Stenzinger A, Hummel M, Weichert W, Lenze D, Warth A, Penzel R, Herbst H, Kellner U, Jurmeister P et al. (2015): ALK-FISH borderline cases in non-small cell lung cancer: Implications for diagnostics and clinical decision making. *Lung Cancer* 90, 465–471
- Larsson SC, Permert J, Hakansson N, Naslund I, Bergkvist L, Wolk A (2005): Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *Br J Cancer* 93, 1310–1315
- Le N, Sund M, Vinci A, Beyer G, Javed MA, Krug S, Neessee A, Schober M (2016): Prognostic and predictive markers in pancreatic adenocarcinoma. *Digestive and Liver Disease* 48, 223–230
- Li Y, Cozzi PJ (2007): Targeting uPA/uPAR in prostate cancer. *Cancer Treatment Reviews* 33, 521–527
- Liu D, Aguirre Ghiso J, Estrada Y, Ossowski L (2002): EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer Cell* 1, 445–457
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagna EP, Elitsur Y, Gates LK, JR, Perrault J, Whitcomb DC (1997): Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst* 89, 442–446
- Lüllmann-Rauch R: Histologie; 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012
- Ma J, Zhang B, Liu S, Xie S, Yang Y, Ma J, Deng Y, Wang W, Xu L, Li R et al. (2013): 1,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits podocyte uPAR expression and reduces proteinuria. *PLoS ONE* 8, e64912
- Madsen CD, Ferraris, Gian Maria Sarra, Andolfo A, Cunningham O, Sidenius N (2007): uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key. *J Cell Biol* 177, 927–939
- Madsen CD, Sidenius N (2008): The interaction between urokinase receptor and vitronectin in cell adhesion and signalling. *Eur J Cell Biol* 87, 617–629

-
- Maisonneuve P, Lowenfels AB (2015): Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int J Epidemiol* 44, 186–198
- Margheri F, Luciani C, Taddei ML, Giannoni E, Laurenzana A, Biagioni A, Chillà A, Chiarugi P, Fibbi G, Rosso MD (2014): The receptor for urokinase-plasminogen activator (uPAR) controls plasticity of cancer cell movement in mesenchymal and amoeboid migration style. *Oncotarget* 5, 1538–1553
- Matsuda Y, Ishiwata T, Izumiyama-Shimomura N, Hamayasu H, Fujiwara M, Tomita K, Hiraishi N, Nakamura K, Ishikawa N, Aida J et al. (2015): Gradual telomere shortening and increasing chromosomal instability among PanIN grades and normal ductal epithelia with and without cancer in the pancreas. *PLoS One* 10, e0117575
- May AE, Kanse SM, Lund LR, Gisler RH, Imhof BA, Preissner KT (1998): Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo. *J Exp Med* 188, 1029–1037
- Mazar AP, Ahn RW, O'Halloran TV (2011): Development of novel therapeutics targeting the urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) and their translation toward the clinic. *Curr Pharm Des* 17, 1970–1978
- McWilliams RR, Rabe KG, Olswold C, Andrade M de, Petersen GM (2005): Risk of malignancy in first-degree relatives of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 104, 388–394
- Melisi D, Ishiyama S, Scwabas GM, Fleming JB, Xia Q, Tortora G, Abbruzzese JL, Chiao PJ (2008): LY2109761, a novel transforming growth factor beta receptor type I and type II dual inhibitor, as a therapeutic approach to suppressing pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer Ther* 7, 829–840
- Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Saboorian H, Haley B, Frenkel E, Euhus D, Leitch M, Osborne C et al. (2006): uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 17361–17365
- Meyer N., Penn L.Z. (2008): 25 years on MYC. *Nat Rev Cancer* 8, 976–990
- Min HY, Semnani R, Mizukami IF, Watt K, Todd, R F 3rd, Liu DY (1992): cDNA for Mo3, a monocyte activation antigen, encodes the human receptor for urokinase plasminogen activator. *J Immunol* 148, 3636–3642
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992): The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237–1245
- Monaghan E, Gueorguiev V, Wilkins-Port C, McKeown-Longo PJ (2004): The receptor for urokinase-type plasminogen activator regulates fibronectin matrix assembly in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 279, 1400–1407
- Moog U, Rieß O: *Medizinische Genetik für die Praxis: Diagnostik, Beratung, Fallbeispiele*; Thieme, Stuttgart 2014
- Moussata D, Senouci L, Berger F, Scoazec JY, Pinson S, Walter T, Lombard-Bohas C, Saurin JC (2015): Familial adenomatous polyposis and pancreatic cancer. *Pancreas* 44, 512–513
- Muller SM, Okan E, Jones P (2000): Regulation of urokinase receptor transcription by Ras- and Rho-family GTPases. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 892–898

-
- Myohanen HT, Stephens RW, Hedman K, Tapiovaara H, Ronne E, Hoyer-Hansen G, Dano K, Vaheri A (1993): Distribution and lateral mobility of the urokinase-receptor complex at the cell surface. *J Histochem Cytochem* 41, 1291–1301
- Nakhai H, Siveke JT, Mendoza-Torres L, Schmid RM (2008): Conditional inactivation of Myc impairs development of the exocrine pancreas. *Development* 135, 3191–3196
- Narayanan R (2015): Phenome-Genome Association Studies of Pancreatic Cancer: New Targets for Therapy and Diagnosis. *Cancer Genomics Proteomics* 12, 9–19
- Navin N, Grubor V, Hicks J, Leibu E, Thomas E, Troge J, Riggs M, Lundin P, Månér S, Sebat J et al. (2006): PROBER: oligonucleotide FISH probe design software. *Bioinformatics* 22, 2437–2438
- Nielsen LS, Kellermann GM, Behrendt N (1988): A 55,000-60,000 M, Receptor Protein for Urokinase-type Plasminogen Activator. *J Biol Chem* 263, 2358-2363
- Obaya AJ, Mateyak MK, Sedivy JM (1999): Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* 18, 2934–2941
- O'Connell BC, Cheung AF, Simkevich CP, Tam W, Ren X, Mateyak MK, Sedivy JM (2003): A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J Biol Chem* 278, 12563–12573
- Orian A, Eisenman RN (2001): TGF-beta flips the Myc switch. *Sci STKE* 2001, pe1
- Pepper MS (2001): Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1104–1117
- Persson M, Juhl K, Rasmussen P, Brandt-Larsen M, Madsen J, Ploug M, Kjaer A (2014): uPAR targeted radionuclide therapy with (177)Lu-DOTA-AE105 inhibits dissemination of metastatic prostate cancer. *Mol Pharm* 11, 2796–2806
- Petersen LC, Lund LR, Nielsen LS, Dano K, Skriver L (1988): One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. *J Biol Chem* 263, 11189–11195
- Pirazzoli V, Ferraris, Gian Maria Sarra, Sidenius N (2013): Direct evidence of the importance of vitronectin and its interaction with the urokinase receptor in tumor growth. *Blood* 121, 2316–2323
- Ploug M, E. Rømne, N. Behrendt, A.L. Jensen, F. Blasi, K. Danø (1991): Cellular Receptor for Urokinase Plasminogen Activator; Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 266, 1926-1933
- Rabbani SA, Gladu J, Mazar AP, Henkin J, Goltzman D (1997): Induction in human osteoblastic cells (SaOS2) of the early response genes fos, jun, and myc by the amino terminal fragment (ATF) of urokinase. *J Cell Physiol* 172, 137–145
- Rakha EA, Pinder SE, Bartlett JMS, Ibrahim M, Starczynski J, Carder PJ, Provenzano E, Hanby A, Hales S, Lee AHS et al. (2015): Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer. *J Clin Pathol* 68, 93–99
- Rassow J: *Biochemie: (Duale Reihe)*, 3. Auflage; Thieme, Stuttgart 2012
- Rea VEA, Lavecchia A, Di Giovanni C, Rossi FW, Gorrasi A, Pesapane A, Paulis A de, Ragno P, Montuori N (2013): Discovery of new small molecules targeting the vitronectin-binding site of the urokinase receptor that block cancer cell invasion. *Mol Cancer Ther* 12, 1402–1416

-
- Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ, Kern SE (1994): p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 54, 3025–3033
- Resnati M, Pallavicini I, Wang JM, Oppenheim J, Serhan CN, Romano M, Blasi F (2002): The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/LXA4R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1359–1364
- Rheem DM, Thompson EB (2000): Hormonal regulation of physiological cell turnover and apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000, 101–124
- Robbie LA, Dummer S, Booth NA, Adey GD, Bennett B (2000): Plasminogen activator inhibitor 2 and urokinase-type plasminogen activator in plasma and leucocytes in patients with severe sepsis. *Br J Haematol* 109, 342–348
- Sandgren EP, Quaife CJ, Paulovich AG, Palmiter RD, Brinster RL (1991): Pancreatic tumor pathogenesis reflects the causative genetic lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 93–97
- Sarode VR, Xiang QD, Christie A, Collins R, Rao R, Leitch AM, Euhus D, Haley B (2015): Evaluation of HER2/neu Status by Immunohistochemistry Using Computer-Based Image Analysis and Correlation With Gene Amplification by Fluorescence In Situ Hybridization Assay: A 10-Year Experience and Impact of Test Standardization on Concordance Rate. *Arch Pathol Lab Med* 139, 922–928
- Schildhaus H-U, Schultheis AM, Rüschoff J, Binot E, Merkelbach-Bruse S, Fassunke J, Schulte W, Ko Y-D, Schlesinger A, Bos M et al. (2015): MET Amplification Status in Therapy-Naïve Adeno- and Squamous Cell Carcinomas of the Lung. *Clin Cancer Res* 21, 907–915
- Schleger C, Verbeke C, Hildenbrand R, Zentgraf H, Bleyl U (2002): c-MYC Activation in Primary and Metastatic Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas: Incidence, Mechanisms, and Clinical Significance. *Mod Pathol* 15, 462–469
- Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W et al. (1997): Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 57, 3126–3130
- Scicolone G, Sanchez V, Vauthay L, Fuentes F, Scicolone A, Scicolone L, Rapacioli M, Flores V (2006): Tissue-type plasminogen activator activity in morphologically normal tissues adjacent to gastrointestinal carcinomas is associated with the degree of tumor progression. *J Cancer Res Clin Oncol* 132, 309–319
- Seoane J, Poupponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M, Massague J (2001): TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol* 3, 400–408
- Shi C, Hruban RH, Klein AP (2009): Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 133, 365–374
- Shortt J, Johnstone RW (2012): Oncogenes in Cell Survival and Cell Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, pii: a009829
- Sidenius N, Sier CF, Blasi F (2000): Shedding and cleavage of the urokinase receptor (uPAR): identification and characterisation of uPAR fragments in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 475, 52–56

-
- Singh G, Singh SK, König A, Reutlinger K, Nye MD, Adhikary T, Eilers M, Gress TM, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V (2010): Sequential Activation of NFAT and c-Myc Transcription Factors Mediates the TGF- β Switch from a Suppressor to a Promoter of Cancer Cell Proliferation*. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 27241–27250
- Skoudy A, Hernández-Muñoz I, Navarro P (2011): Pancreatic ductal adenocarcinoma and transcription factors: role of c-Myc. *J Gastrointest Cancer* 42, 76–84
- Smith HW, Marshall CJ (2010): Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 23–36
- Smith HW, Marra P, Marshall CJ (2008): uPAR promotes formation of the p130Cas–Crk complex to activate Rac through DOCK180. *J Cell Biol* 182, 777–790
- Solberg H, Ploug M, Hoyer-Hansen G, Nielsen BS, Lund LR (2001): The Murine Receptor for Urokinase-Type Plasminogen Activator Is Primarily Expressed in Tissues Actively Undergoing Remodeling. *J Histochem Cytochem* 49, 237–246
- Sorio C, Mafficini A, Furlan F, Barbi S, Bonora A, Brocco G, Blasi F, Talamini G, Bassi C, Scarpa A (2011): Elevated urinary levels of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in pancreatic ductal adenocarcinoma identify a clinically high-risk group. *BMC Cancer* 11, 448
- Stein PE, Carrell RW (1995): What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nat Struct Mol Biol* 2, 96–113
- Streff H, Profato J, Ye Y, Nebgen D, Peterson SK, Singletary C, Arun BK, Litton JK (2016): Cancer Incidence in First- and Second-Degree Relatives of BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Oncologist* 21, 869-74
- Stupack DG (2007): The biology of integrins. *Oncology (Williston Park)* 21, 6–12
- Syrovets T, Simmet T (2004): Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cell Mol Life Sci* 61, 873–885
- Takami M, Herrera R, Petruzzelli L (2001): Mac-1-dependent tyrosine phosphorylation during neutrophil adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, 56
- Tarui T, Mazar AP, Cines DB, Takada Y (2001): Urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87) is a ligand for integrins and mediates cell-cell interaction. *J Biol Chem* 276, 3983–3990
- Tersmette AC, Petersen GM, Offerhaus GJA, Falatko FC, Brune KA, Goggins M, Rozenblum E, Wilentz RE, Yeo CJ, Cameron JL et al. (2001): Increased Risk of Incident Pancreatic Cancer Among First-degree Relatives of Patients with Familial Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 7, 738–744
- Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ (2015): The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer* 113, 365-71
- Thunø M, Macho B, Eugen-Olsen J (2009): suPAR: the molecular crystal ball. *Dis. Markers* 27, 157–172
- Tsuneoka M, Umata T, Kimura H, Koda Y, Nakajima M, Kosai K, Takahashi T, Takahashi Y, Yamamoto A (2003): c-myc induces autophagy in rat 3Y1 fibroblast cells. *Cell Struct Funct* 28, 195–204
- Vasalli D., Baccino D., Belin D. (1985): A Cellular Binding Site for the Mr 55,000 Form of the Human Plasminogen Activator, Urokinase. *J Cell Biol* 1985, 86–92

-
- Vasen HF, Gruis NA, Frants RR, van der Velden PA, Hille ET, Bergman W (2000): Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer* 87, 809–811
- Vassalli JD, Sappino AP, Belin D (1991): The plasminogen activator/plasmin system. *J. Clin. Invest.* 88, 1067–1072
- Wagener C, Müller O: *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3. Aufl; Thieme, Stuttgart 2010
- Wan TS, Ma ES (2012): Molecular cytogenetics: an indispensable tool for cancer diagnosis. *Chang Gung Med J* 35, 96–110
- Wang Y, Jones CJ, Dang J, Liang X, Olsen JE, Doe WF (1994): Human urokinase receptor expression is inhibited by amiloride and induced by tumor necrosis factor and phorbol ester in colon cancer cells. *FEBS Letters* 353, 138–142
- Webb DJ, Nguyen DH, Sankovic M, Gonias SL (1999): The very low density lipoprotein receptor regulates urokinase receptor catabolism and breast cancer cell motility in vitro. *J Biol Chem* 274, 7412–7420
- Wei Y, Yang X, Liu Q, Wilkins JA, Chapman HA (1999): A Role for Caveolin and the Urokinase Receptor in Integrin-mediated Adhesion and Signaling. *J Cell Biol* 144, 1285–1294
- Weinberg RA: *The biology of Cancer*. 2. Auflage; Garland Science, New York 2014
- Whelan D, Caplice NM, Clover, AJ (2014): Fibrin as a delivery system in wound healing tissue engineering applications. *J Control Release* 196C, 1–8
- Wilhelm O, Weidle U, Hohl S, Rettenberger P, Schmitt M, Graeff H (1994): Recombinant soluble urokinase receptor as a scavenger for urokinase-type plasminogen activator (uPA). Inhibition of proliferation and invasion of human ovarian cancer cells. *FEBS Lett* 337, 131–134
- Xia W, Bock C de, Murrell, George A C, Wang Y (2003): Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor is up-regulated during tendon healing. *J Orthop Res* 21, 819–825
- Xu X, Cai Y, Wei Y, Donate F, Juarez J, Parry G, Chen L, Meehan EJ, Ahn RW, Ugolkov A et al. (2014): Identification of a new epitope in uPAR as a target for the cancer therapeutic monoclonal antibody ATN-658, a structural homolog of the uPAR binding integrin CD11b (α M). *PLoS ONE* 9, e85349
- Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA et al. (2010): Distant Metastasis Occurs Late during the Genetic Evolution of Pancreatic Cancer. *Nature* 467, 1114–1117
- Zhou X, Zheng K, Li R, Chen Z, Yuan C, Hu P, Chen J, Xue J, Huang M (2015): A drug carrier targeting murine uPAR for photodynamic therapy and tumor imaging. *Acta Biomater* 23, 116–126

Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf der 99. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie als Vortrag und Poster veröffentlicht:

***uPAR* and *c-myc* amplifications indicate a high risk group among pancreatic cancer patients**

F. Fuchs¹, K. Schmitz¹, S. Hakrroush¹, J. Gaedcke², D. Ellenberger³, H.U. Schildhaus¹, P. Ströbel¹, J. Kitz¹

¹University Medical Center Göttingen, Department of Pathology, Göttingen, Germany, ²University Medical Center Göttingen, Department of General and Visceral Surgery, Göttingen, Germany, ³University Medical Center Göttingen, Department of Medical Statistics, Göttingen, Germany

Background

The dismal prognosis of pancreatic cancer is closely related to aggressive tumor development that leads to diagnosis in advanced stages and limited curative concepts. Urokinase-type plasminogen activator receptor (*uPAR*) and *c-myc* are both well known cancer genes and have been repeatedly associated with particularly unfavorable prognosis in various types of cancer.

Aims:

The present study aimed to establish *uPAR* and *c-myc* amplification status as relevant risk markers in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC).

Methods

We studied a collective of 60 clinically well characterized pancreatic cancer cases from a single institution for amplification of *uPAR* and *c-myc* using fluorescence in situ hybridization (FISH). To minimize potential confounders, all patients were in stage pT3 N1 and tumor grades 2/3.

Results

uPAR amplification was identified in 29 of 60 PDAC. 16 cases were low level (LL), 13 cases showed high level amplification (HL). The median survival of patients without amplification was 28,4 months compared to 15,5 months in LL cases and 12,4 months in HL cases (Cox-Mantel-test, $p=0.027$). *Myc* amplification was found in 32 cases. 12 cases were low level, 20 cases showed high level amplification. The median survival of patients without amplification was 27,5 months compared to 11,1 months in LL cases and 19,3 months in HL cases (Cox-Mantel-test, $p=0.048$). There was a statistical trend towards co-amplification of *uPAR* and *myc* ($r=0.227$, $p=0.026$). *uPAR* and *myc* amplification were not among the statistically significant parameters on multi-variate analysis (tumor stage, age at diagnosis).

Conclusions

Both *uPAR* and *myc* amplification are indicators of a PDAC subgroup with particularly dismal prognosis and tend to occur in the same tumor. Further work will be needed to establish whether this observation represents only a coincidence or a synergy between two important oncogenes. *uPAR* is a promising target both for imaging purposes and targeted therapy and merits further investigation.

Danksagung

Ich richte besonderen Dank an Frau Dr. med. Julia Kitz. Ihre Betreuung dieser Arbeit war durch große Hilfsbereitschaft und stetige Motivation aller Beteiligten gekennzeichnet. Durch ihre außergewöhnliche Kompetenz hat Sie die Entwicklung dieser Dissertation maßgeblich mitgestaltet.

Für die professionelle und gestaltende Unterstützung von Beginn des Projektes an bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. P. Ströbel.

Besonders möchte ich auch dem Team der Molekularpathologie danken. Die kompetente und geduldige Einarbeitung durch Frau Dr. med. K. Schmitz und Herr Prof. Dr. med. H. U. Schildhaus in die FISH-Diagnostik und die Evaluation meiner Ergebnisse waren wesentlicher Bestandteil zum Gelingen des Projektes. Vielen Dank auch an Frau S. Hugo, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und mich bei der Durchführung der Experimente freundlich und kompetent begleitet hat.

Zudem bin ich dem gesamten Team der Pathologie dankbar für die Hilfestellungen, die ich in allen Laboren bei der Bearbeitung der einzelnen Projekte erfahren habe. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Herrn Küffer, Frau Dunja Fuchs, Frau Kellner und Frau Martin-Ortega.

Für die gute Zusammenarbeit mit der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Ghadimi sowie bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. J. Gaedcke.

Ebenfalls danke ich dem Institut für Medizinische Statistik um Herrn Prof. Dr. Friede und insbesondere Herrn D. Ellenberger für die Betreuung des Projektes in statistischen Fragen. Zuletzt bedanke ich mich bei Frau Laut aus dem Institut für Ethik und Geschichte der Medizin und bei allen weiteren Personen, die sich bereit erklärt haben die Arbeit in Auszügen oder in Gänze kritisch zu lesen.