

*AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. F. HOFSTÄDTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*MOLEKULARPATHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN KARZINOMEN DER PAPILLA
VATERI: KORRELATION KLINISCH-PATHOLOGISCHER VARIABLEN MIT
DELETIONEN DER CHROMOSOMEN 17P UND 18Q SOWIE DER EXPRESSION VON
P53, SMAD4 UND MASPIN*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eva Endreß

2012

*AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. F. HOFSTÄDTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*MOLEKULARPATHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN KARZINOMEN DER PAPILLA
VATERI: KORRELATION KLINISCH-PATHOLOGISCHER VARIABLEN MIT
DELETIONEN DER CHROMOSOMEN 17P UND 18Q SOWIE DER EXPRESSION VON
P53, SMAD4 UND MASPIN*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eva Endreß

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Arndt Hartmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Pompiliu Piso

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2013

Für meinen Vater
und für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Anatomie und Funktion der Papilla Vateri	7
1.1.1 Makroskopische Anatomie und Funktion der Papilla Vateri.....	7
1.1.2 Mikroskopische Anatomie der Papilla Vateri.....	9
1.2 Neoplasien der Papilla Vateri	9
1.2.1 Adenome und Karzinome der Papilla Vateri.....	9
1.2.2 Adenom-Karzinom-Sequenz bei Neoplasien der Papilla Vateri.....	14
1.3 Molekulare Pathogenese	16
1.3.1 Mikrosatelliteninstabilität.....	16
1.3.2 Chromosomale Instabilität am Chromosom 17p und 18q.....	18
1.4 Grundlagen zu den immunhistochemisch untersuchten Tumorsuppressorgenen	19
1.4.1 tp53.....	19
1.4.2 SMAD4.....	20
1.4.3 Maspin.....	22
1.5 Fragestellung	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Tumorgewebe.....	24
2.1.2 Chemikalien und Lösungen.....	25
2.1.3 Laborgeräte.....	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Amplifikation der DNA-Proben mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
A) Prinzip der Polymerasekettenreaktion.....	26
B) Protokoll dieser Arbeit.....	27
2.2.2 Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese.....	29
A) Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese im ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyzer.....	29
B) Protokoll dieser Arbeit.....	30
2.2.3 Immunhistochemie.....	32
A) Prinzip der Immunhistochemie.....	32
B) Protokoll dieser Arbeit.....	33
3. Ergebnisse	36
3.1 Mikrosatellitenanalysen am tp53-Locus	36
3.1.1 Korrelation LOH am tp53-Locus mit Tumorentität und MSI-Status.....	36
3.1.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Mikrosatellitenstatus des tp53-Locus.....	38

3.2 Mikrosatellitenanalysen am D18S61-Locus	40
3.2.1 Korrelation LOH am D18S61-Locus mit Tumorentität und MSI-Status.....	40
3.2.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Mikrosatellitenstatus des D18S61-Locus.....	42
3.3 p53-Immunhistochemie	44
3.3.1 Korrelation von p53-Immunhistochemie mit klinisch-pathologischen Parametern.....	44
3.3.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit einer p53-Protein-Expression.....	45
3.4 SMAD4-Immunhistochemie	46
3.4.1 Korrelation von SMAD4-Proteinexpression und klinisch-pathologischen Parametern..	46
3.4.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit einer SMAD4-Proteinexpression.....	48
3.5 Maspin-Immunhistochemie	48
3.5.1 Korrelation von Maspin-Proteinexpression und klinisch-pathologischen Parametern...	48
3.5.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von Maspin-Proteinexpression.....	52
4. Diskussion	56
4.1 Analyse von LOH für Chromosom 17p und 18q bei Papillenkarcinomen	56
4.1.1 Methodik.....	56
4.1.2 Vergleich von LOH an verschiedenen Mikrosatellitenloci des Chromosoms 17p mit TP53-LOH (17q21.31).....	59
4.1.3 Vergleich von LOH an verschiedenen Mikrosatellitenloci des Chromosoms 18q mit D18S61-LOH (18q22.2).....	59
4.1.4 Prognostische Wertigkeit des LOH-Status der untersuchten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 17p und 18q.....	60
4.2 Immunhistochemie bei Papillenkarcinomen	61
4.2.1 p53-Expression bei Papillenkarcinomen.....	61
4.2.2 Prognostische Wertigkeit der p53-Expression bei Papillenkarcinomen.....	63
4.2.3 SMAD4/DPC4-Expression bei Papillenkarcinomen.....	64
4.2.4 Prognostische Wertigkeit der SMAD4/DPC4-Expression bei Papillenkarcinomen.....	66
4.2.5 Maspin-Expression bei Papillen- und gastrointestinalen Karcinomen.....	67
4.2.6 Prognostische Wertigkeit der Maspin-Expression bei Papillen- und gastrointestinalen Karcinomen.....	68
5. Zusammenfassung	72
6. Literaturverzeichnis	75
7. Danksagung	83

1. Einleitung

1.1 Anatomie und Funktion der Papilla Vateri

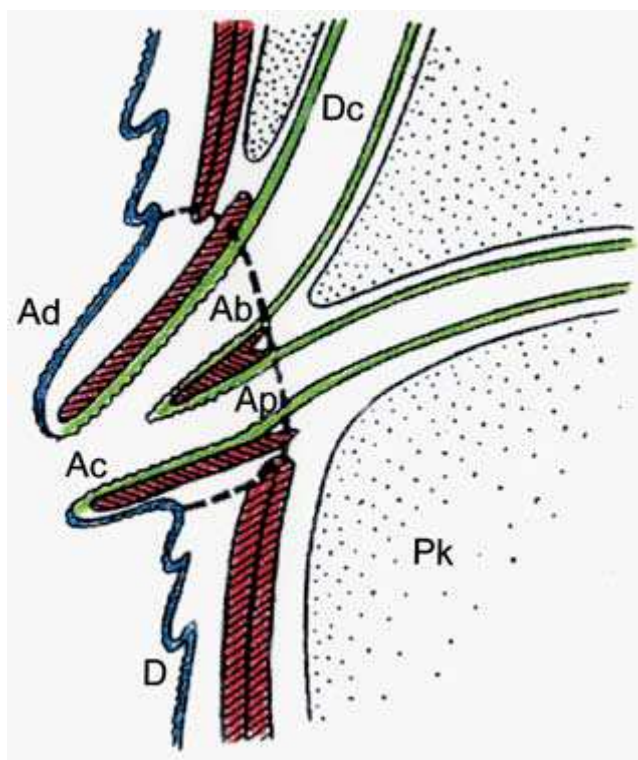
1.1.1 Makroskopische Anatomie und Funktion der Papilla Vateri

Die Papilla Vateri (Papilla duodeni major) umfasst den gemeinsamen Mündungsbereich des Ductus pancreaticus major und des Ductus choledochus. Sie liegt in der Wand der Pars descendens des Duodenum als ein röhrenförmiges, ca. 12 mm langes Gebilde, dessen Endteil etwas in das Duodenum hineinragt [Fischer, 2000].

Die Papilla Vateri untergliedert sich in

- common channel (ampullopankreatobiliäres Gangsegment),
- biliäres Gangsegment (distaler Ductus choledochus),
- pankreatisches Gangsegment (distaler Ductus pancreaticus) und
- das Ampullduodenum [Fischer, 2003].

Da der common channel oftmals etwas aufgeweitet ist, wird dieser Teil auch als Ampulle bezeichnet.



- | | |
|-----------|-----------------------------------|
| Ab | ampullobiliäres Gangsegment |
| Ap | ampullopankreatisches Gangsegment |
| Ac | Common Channel |
| Ad | Ampullduodenum |
| Dc | Ductus choledochus |
| Pk | Pankreaskopf |
| D | Duodenum |

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Ampulla Vateri [Fischer, 2003]

Es gibt drei **anatomische Varianten** der Papilla Vateri, die durch die Mündungs-, Zusammenfluß- und Verlaufsvarianten von Ductus choledochus, Ductus pancreaticus major und Ductus pancreaticus minor zustande kommen: Meist (in bis zu 85 % der Fälle) münden Gallengang und Pankreashauptgang präpapillär ineinander und bilden dann einen common channel mit oder ohne ampulläre Weitung. Wenn Ductus choledochus und Ductus pancreaticus zwar gemeinsam in der Papille münden, deren Gänge aber durch ein Septum getrennt bleiben, existiert keine Ampulle im engeren Sinne (5 %). Außerdem können Ductus pancreaticus und Ductus choledochus an verschiedenen Stellen ins Duodenum münden (9 %). [Wittekind, 2001]

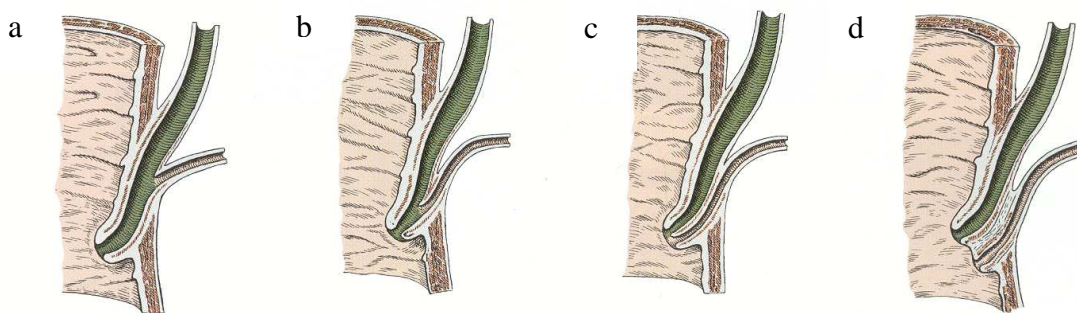


Abbildung 1.2: Verschiedene Mündungsvarianten des Ductus choledochus und des Ductus pancreaticus: a) Einmündung des Ductus pancreaticus in den Ductus choledochus ausserhalb der Darmwand. b) Gemeinsame Mündung von Ductus choledochus und Ductus pancreaticus. c) Gemeinsame Mündung beider Gänge, deren Lumina getrennt sind. d) Ausbildung einer Papilla bipartita durch getrennte Mündung von Ductus choledochus und Ductus pancreaticus. [Köpf-Maier, 2000, S. 187]

Die **Funktion der Papille** besteht darin, den Sekretfluss aus dem Duodenum in die Papille zu verhindern. Dazu trägt der besondere Aufbau der Papillenschleimhaut bei. Die Schleimhaut der Papille kennzeichnet sich durch hohe und dichtstehende Schleimhautfalten. Im Endteil der Papille verlaufen diese Falten eher längs, während sie in der Ampulle quer verlaufen. Untereinander sind die Falten noch durch kleine Segel verbunden, wodurch sich dichtstehende taschenförmige Klappen bilden, die den Sekretfluss nur in Richtung der Mündung erlauben und damit die Funktion eines Ventils erfüllen. Des Weiteren regelt die Papille den Abfluss von ca. 600 ml Galle und ca. 1500 ml Pankreassekret pro Tag in das Duodenum und die Ableitung der Galle in die Gallenblase. Diese Funktion kann die Papille mit Hilfe des komplexen Aufbaus des Sphinkter Oddi erfüllen: Durch dessen Kontraktion staut sich Sekret in die Gallenblase zurück. Endokrine, parakrine und autonome nervale Steuerung modulieren die Aktivität des Sphinkters. Ein wichtiges Hormon ist das in den APUD-Zellen des Duodenums gebildete Cholezystokin, das zu einer Verminderung des

Basaltonus des Sphincter Oddi und zu einer Kontraktion der Gallenblase führt und somit Gallenfluss ins Duodenum bewirkt. [Fischer, 2000, S. 1220]

1.1.2 Mikroskopische Anatomie der Papilla Vateri

Histologisch ist die Papilla Vateri aus der Tela mucosa mit dichten Schleimhautfalten, mukösen Drüsen und endokrinen Zellen, der Tela muscularis des Sphincter Oddi und der Tela adventitia aufgebaut.

Die Schleimhautfalten des common channels sind mit mukoidem hochzylindrischen Epithel ausgekleidet. Die Zellen haben basalständige Kerne und ein blaß-eosinophiles Zytoplasma und produzieren überwiegend saure Mukopolysaccharide und neutrale Muzine. In schwacher Intensität exprimieren diese Zellen CEA. Zum Ostium hin lassen sich vermehrt Becherzellen und Panethzellen nachweisen. Chromaffine neuroendokrine Zellen können immunhistochemisch nachgewiesen werden. Im Stroma finden sich wenige Lymphozyten, Plasmazellen und Mastzellen. Mukoide Drüsen münden in den Rezessus zwischen den Schleimhautfalten.

Sehr oft ziehen auch akzessorische Pankreasgänge in die Papillenmuskulatur, da das Pankreasgewebe in direkter Nachbarschaft der Papille liegt. Das umgebende Ampulloduodenum hingegen ist von intestinaler Schleimhaut bestehend aus Enterozyten, Becherzellen, Panethzellen und entero-endokrinen Zellen ausgekleidet. Die Papille ist somit Schnittpunkt zwei verschiedener Schleimhauttypen, wie die ösophago-gastrale Grenze oder die Cervix uteri. Zudem ist sie dauerhaft drei unterschiedlich zusammengesetzten Sekreten ausgesetzt. Im common channel mischen sich Pankreassekret und Gallensekret physiologischerweise. Dort treten im Bereich der Papille auch am häufigsten atypische Epithelien auf [Kimura, 2004]. Die Sondersituation als Schleimhautgrenze könnte erklären, warum dort im Bereich des Duodenums Adenome und Karzinome am häufigsten auftreten [Fischer, 2003].

1.2 Neoplasien der Papilla Vateri

1.2.1 Adenome und Karzinome der Papilla Vateri

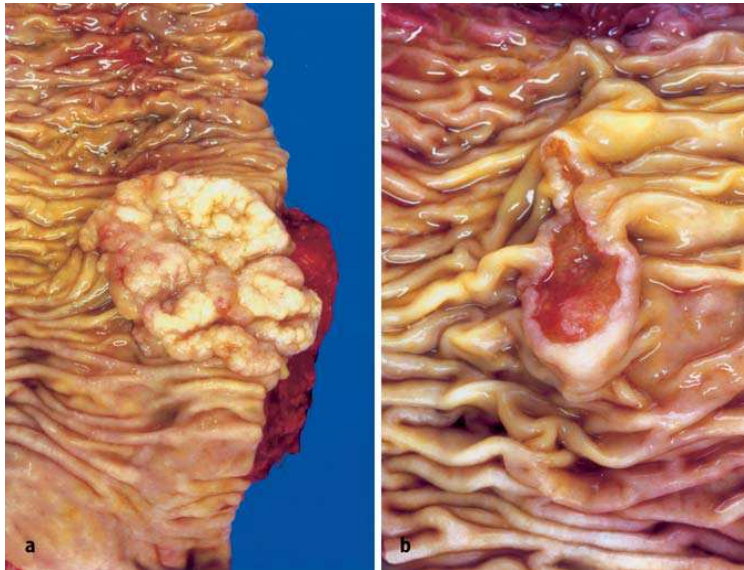
Neoplasien treten im Dünndarm wesentlich seltener auf als im Dickdarm. Innerhalb des Duodenums sind sie am häufigsten in der Pars descendens in der Nähe der Papille lokalisiert. Die Inzidenz des Papillenkarcinoms in der westlichen Welt beträgt ungefähr 0,2 bis 2 Fälle/100.000 pro Jahr. Die Unterscheidung zwischen Karzinomen der Papillenschleimhaut und Karzinomen der benachbarten Pankreaskopf-, distalen Ductus choledochus- oder

peripapillären Duodenalregion ist im fortgeschrittenen Stadien sehr schwierig. Deswegen kann die Häufigkeit der Papillenkarcinome nicht zuverlässig angegeben werden. Das typische Manifestationsalter für sporadische Papillenkarcinome liegt im siebten und achten Lebensjahrzehnt. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. Im Mittel treten Papillenkarcinome acht Jahre später auf als Papilladenome. Es wird vermutet, dass Karzinogene oder Co-Karzinogene in der Galle oder im Pankreassekret eine Rolle bei der Entstehung der Neoplasien spielen, Inhaltsstoffe des Zigarettenrauchs und Einfluss von Kontrazeptiva sind als Risikofaktoren umstritten. Ein wichtiger karzinogener Risikofaktor in küstennahen ostasiatischen Gebieten ist die Infektion der Gallenwege mit dem Leberegel. Unumstritten als Risikofaktor für präkanzeröse Läsionen sind die erblichen Polyposis-Syndrome, z. B. die familiäre adenomatöse Polypose (FAP). Während sporadische Neoplasien der Papilla Vateri mit der höchsten Inzidenz in der Altersgruppe von 60 bis 80 Jahren auftreten, entwickeln sich bei hereditären Polyposissyndromen Adenome und Karzinome schon früher [Wittekind, 2001]. So treten Karzinome der Papilla Vateri mit einem vergleichsweise jungen Durchschnittsalter von 45 Jahren auf. Die Papillenkarcinome manifestieren sich zeitlich nach den Karzinomen des Kolorektums; die Papillenregion ist nach dem Kolorektum der zweithäufigste Manifestationsort bei der familiären adenomatösen Polypose. Beim hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC) jedoch ist die Inzidenz der Papillenkarcinome gering [Fischer, 2003].

Nur selten findet man an der Papilla Vateri reine Adenome, d.h. Adenome ohne Karzinomanteil. Abhängig von der Größe und der Architektur treten in biopsierten Papilladenomen bei genauer histologischer Untersuchung Karzinomanteile auf: In Biopsien von kleinen tubulären Adenomen fanden sich in 23 % der Fälle invasive Karzinomanteile, während es in villösen Adenomen bis zu 60 % waren [Wittekind, 2001]. Viel häufiger treten Papilladenome in der Nachbarschaft von Papillenkarcinomen auf und man spricht von Karzinomen mit oder ohne Adenomanteil [Yamaguchi, 1987].

Makroskopisch lassen sich drei Wuchsformen der Papillentumoren unterscheiden [Fischer, 2000]:

- Die intramural-protruierenden Tumoren wachsen polypös in die Lichtung des common channel ein und wölben die von Duodenalschleimhaut überzogenen Papille in das Duodenum vor.
- Die exponiert-protruierenden Tumoren wachsen polypös durch die Papillenmündung in das Duodenum vor.
- Ulzerierte Tumoren zeichnen sich durch tiefeninvasives Wachstum aus.



a) polypöser Tumor
b) ulzeröser Tumor

Abbildung 1.3: Wuchsformen des Papillenkarzinoms [Fischer, 2003]

Durch Stenose und Verschluss der Papille kommt es zum Verschlussikterus, wodurch diese Karzinome symptomatisch werden. Die intramural-protrudierenden Tumoren verschließen die Papille früher (im Mittel 1,8 cm groß), während die exponiert-protrudierenden Tumoren (im Mittel 2,7 cm groß) und die ulzerierten Tumoren (im Mittel 3,3 cm groß) später symptomatisch werden. Die Papillenkarzinome infiltrieren per continuitatem die Duodenalwand und den benachbarten Pankreaskopf oder retrograd den Ductus choledochus. Da ulzerierte Karzinome bei Diagnosestellung meist weiter fortgeschritten sind als protrudierende Karzinome, haben sie häufiger bereits in regionäre Lymphknotenstationen metastasiert. Neben Verschlussikterus äußern sich periampulläre Tumore mit kolikartigen abdominalen Schmerzen und Fieber als mutmaßliche Folge einer Cholangitis [Fischer et al., 2000, S. 1233].

Mikroskopisch lässt sich bei **Papillenadenomen** ein tubulärer, tubulo-papillärer oder papillärer Aufbau unterscheiden. Die Tumorzotten und -drüsen werden durch unreifes Zylinderepithel mit niedriggradiger (low-grade intraepithelialer Neoplasie / LG-IEN) oder hochgradiger (high-grade intraepithelialer Neoplasie / HG-IEN) intraepithelialen Neoplasien (IEN: frühere Nomenklatur: Dysplasien) ausgekleidet. Becherzellen, argentaffine Zellen und Panethzellen sind häufig nachweisbar. CEA und CA 19.9 lassen sich zwar linear an der apikalen Zellmembran nachweisen, sind aber im Serum im Normbereich [Fischer, 2000, S. 1233].

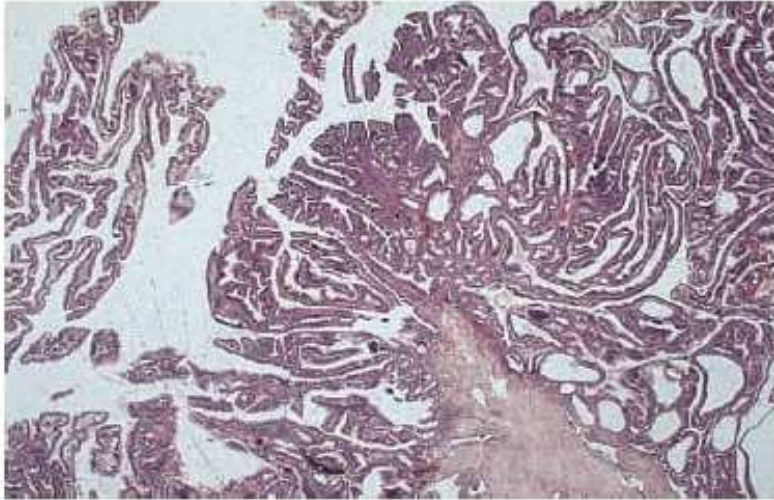


Abbildung 1.4: Adenom mit typischem tubulopapillärem Aufbau; HE-Färbung, 20fache Vergrößerung. [Wittekind, 2001]

Nach Kimura et al. werden **Papillenkarcinomen** in zwei histologische Hauptgruppen eingeteilt, den intestinalen Typ und den pankreatobiliären Typ.

Der **intestinale Typ** ähnelt dem tubulären Adenokarzinom des Kolons, das Zytoplasma ist eosinophil und wahrscheinlich stammt dieses Epithel von der duodenalen Mukosa ab. Kimura et al. fanden diesen Karzinomtyp in 25 % der untersuchten Karzinome.

Der in 72 % der Fälle gefundene **pankreatobiliäre Typ** zeichnet sich durch papilläre Auswüchse mit wenig fibröser Innenstruktur aus. Das Zytoplasma der Zellen ist klar. Dieser Zelltyp stammt vom pankreatobiliären Epithel ab [Kimura, 2004]. Außerdem weisen diese zwei Typen unterschiedliche immunhistochemische Eigenschaften auf (s. Abbildung 1.5). Neben diesen beiden Haupttypen der Papillenkarcinome gibt es noch weitere „ungewöhnliche“ Subtypen [Albores-Saavedra, 2000] wie das gering-differenzierte (G3) Adenokarzinom, das invasiv-papilläre Karzinom und das intestinal-muzinöse Karzinom, die in dieser Studie berücksichtigt wurden.

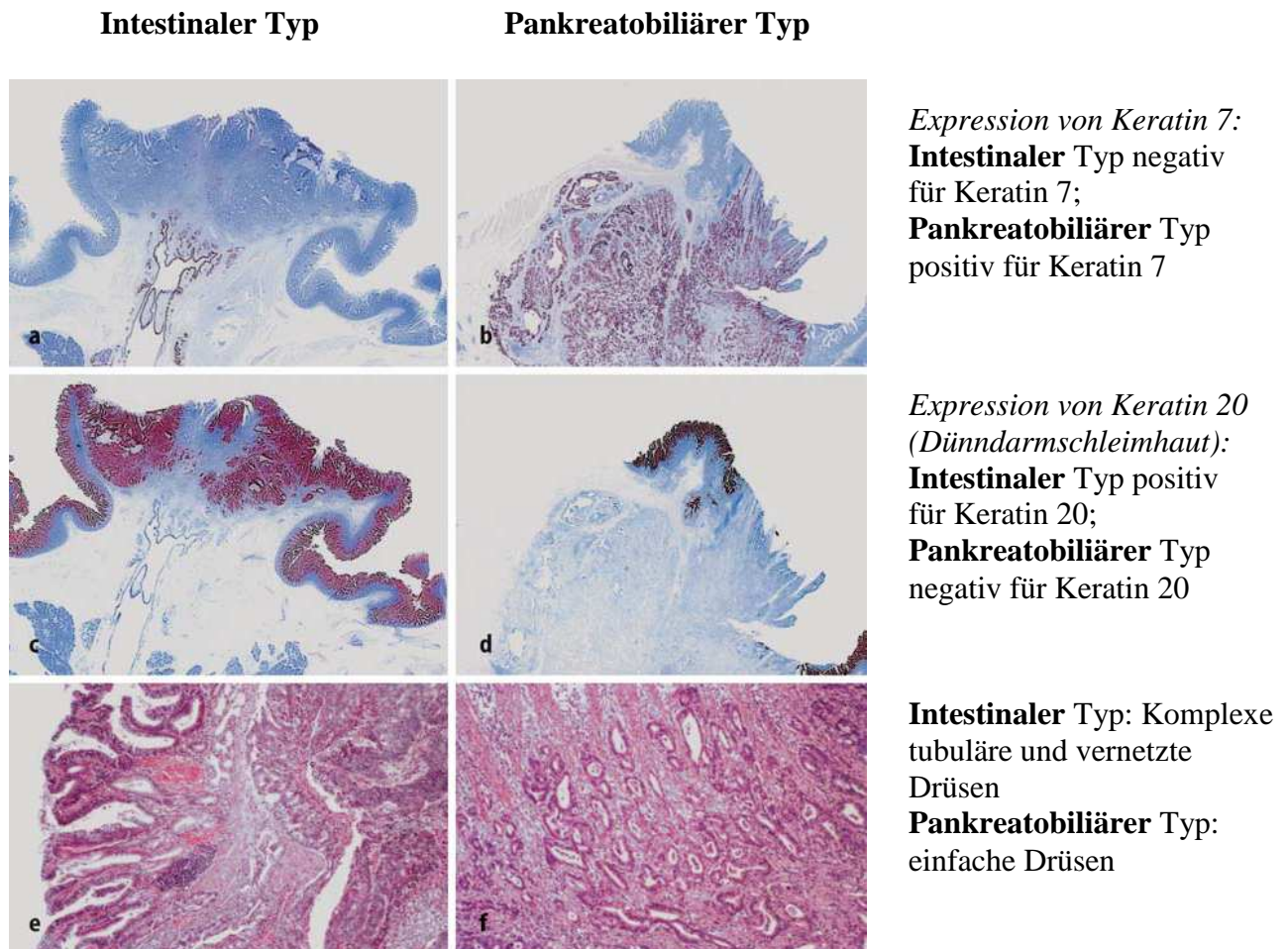


Abbildung 1.5: Histologische Eigenschaften des intestinalen und pankreatobiliären Typs des Papillenkarzinoms [Fischer, 2003]

Grosse Ulzerationen und histologische Pankreasinvasion sowie Lymphknotenmetastasen treten häufiger beim pankreatobiliären als beim intestinalen Typ auf. Auch die Überlebenskurven der beiden Karzinomtypen unterscheiden sich: Während die 5-Jahres-Überlebensrate beim intestinalen Typ bei ca. 60 - 80% liegt, beträgt sie beim pankreatobiliären Typ nur ca. 30 % [Kimura, 2004]. Auch die Rezidivrate ist beim pankreatobiliären Typ höher als beim intestinalen Typ. Trotz dieser Unterschiede ist der histologische Subtyp kein statistisch signifikanter Prognosefaktor [Lee, 2010] und hat keine Konsequenzen für die Therapie.

In der WHO-Klassifikation werden die Papillenkarzinome den Tumoren der Gallenblasen- und dem extrahepatischen Gallengängen zugeordnet. Sie machen 12,9 % der extrahepatischen Gallengangskarzinome aus [Kimura, 2004]. Das Staging der Papillenkarzinome erfolgt mittels TNM-Klassifikation: Die klinischen und pathologischen T-, N- und M-Kategorien entsprechen sich.

T-Kategorie: lokale Ausdehnung des Primärtumors

Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor begrenzt auf die Ampulla Vateri oder den Oddi-Sphinkter
T2	Tumor infiltriert in Duodenalwand
T3	Tumor infiltriert in Pankreas
T4	Tumor infiltriert in peripankreatisches Weichgewebe und/oder andere Nachbarorgane oder –strukturen

N-Kategorie: Befall regionärer Lymphknoten

Zu den regionären Lymphknoten zählen die Lymphknotengruppen superior und inferior des Pankreaskopf und –körper, die vorderen und hinteren pankreatikoduodenalen, pylorischen und proximalen mesenterialen Lymphknoten und die Lymphknoten am Ductus choledochus sowie proximale mesenteriale Lymphknoten.

Die Milzlymphknoten und die Lymphknoten am Pankreasschwanz zählen nicht zu den regionären Lymphknoten, sondern werden als Fernmetastasen klassifiziert.

Für das pathologische Staging werden üblicherweise 10 oder mehr Lymphknoten histologisch untersucht.

N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen

M-Kategorie: Fernmetastasen

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen (einschließlich Metastasen in Milzlymphknoten und/oder in Lymphknoten des Pankreasschwanz)

Stadiengruppierung des Papillenkarzinoms

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I A	T1	N0	M0
Stadium I B	T2	N0	M0
Stadium II A	T3	N0	M0
Stadium II B	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium III	T4	Jedes N	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

[Wittekind, 2010]

1.2.2 Adenom-Karzinom-Sequenz bei Neoplasien der Papilla Vateri

Die Tumorentstehung durch eine Adenom-Karzinom-Sequenz ist in Bezug auf kolorektale Tumore anerkannt: Durch schrittweise Akkumulation von Genveränderungen im Sinne des linearen Progressionsmodells von Fearon und Vogelstein [Fearon, 1990] erfolgt die Entwicklung aus normalem Epithel über mehrere Adenomstufen und zunehmender intraepithelialer Neoplasie (IEN; früher: Dysplasie) zum Karzinom. In diesem Prozess werden Tumorsuppressorgene durch Mutationen ausgeschaltet, z.B. APC (Adenomatosis polyposis

coli), p53, DCC (*deleted in colorectal cancer*) oder SMAD4 (Homolog des Drosophila-Gens MAD; *mothers against decapentaplegic*) bzw. Onkogene aktiviert (z. B. K-RAS). Eine Vielzahl von Autoren postuliert, dass auch für Neoplasien der Papilla Vateri die Adenom-Karzinom-Sequenz gilt. Das Vorhandensein von Adenomanteilen in chirurgischen Resektionspräparaten von Karzinomen der Papilla Vateri unterstützt dieses Konzept. So lassen sich in bis zu 90 % der daraufhin untersuchten Resektionspräparate im Randbereich adenomatöse Reste mit IEN identifizieren, aus denen sich ein Karzinom entwickelt hat [Kozuka, 1981], [Baczako, 1985]. Je höher das T-Stadium und der Malignitätsgrad der Karzinome ist, desto geringer ist der Adenomanteil, was für eine „Überwucherung“ der Adenomanteile durch das aggressive Karzinom spricht. Zudem zeigen retrospektive Studien, dass Patienten mit der Diagnose eines Adenoms durchschnittlich jünger sind als Patienten mit der Diagnose eines Karzinoms, was ebenfalls nahelegt, dass sich die Adenome zu Karzinomen weiterentwickeln [Stolte, 1996], [Kaiser, 2002].

Die besondere Situation der Papilla Vateri als Schleimhautgrenze wird als prokarzinogen gewertet. Morphologische Studien untermauern dies: In Autopsiepräparaten, in denen das Epithel des common channel und das Epithel der ampullopankreatischen und ampullobiliären Gangsegmente getrennt beurteilt werden, zeigt sich, dass der common channel wesentlich häufiger von IEN betroffen ist als das ampullopankreatische oder das ampullobiliäre Gangsegment. Low-grade IEN finden sich in 25 % der Fälle im Common channel, in nur 15 % im ampullobiliären Segment und in nur 6 % im ampullopankreatischen Segment. Auch high-grade IEN sind signifikant häufiger im common channel (3,8 %) als im ampullobiliären Gangsegment (2,3 %), im ampullopankreatischen Segment (1,0 %) oder im duodenalen Epithel (0,6 %) vorhanden. IEN, aus denen Karzinome hervorgehen können, wurden also am häufigsten im common channel gefunden, wo sich Gallensekret und Pankreassekret physiologischerweise mischen [Kimura, 2004].

Neben morphologischen Studien belegen auch molekularpathologische Untersuchungen die Entwicklung der Karzinome aus Adenomen. Beim kolorektalen Karzinom wurden bezüglich der genetischen Veränderungen zwei unterschiedliche Prozesse der Karzinomentstehung identifiziert, die sich beide unter dem Oberbegriff der genetischen Instabilität zusammenfassen lassen. Die sogenannte **LOH (loss of heterozygosity)-positiven Tumore (Signalweg der chromosomalen Instabilität)** weisen Hyperplodie und Allelverluste u.a. am Chromosom 18q und 17p auf. Tumore mit hochfrequenter Instabilität in Mikrosatelliten (MSI-high-positive Tumore), sind durch genetische Instabilität in Mikrosatelliten (**Signalweg der Mikrosatelliten-Instabilität /MSI**) gekennzeichnet. Auf diese zwei karzinogenetischen

Entstehungsmechanismen soll im Folgenden am Beispiel des kolorektalen Karzinoms näher eingegangen werden.

1.3 Molekulare Pathogenese

1.3.1 Mikrosatelliteninstabilität

Im Rahmen der genetischen Instabilität bei der Karzinomenstehung wird die **chromosomale** Instabilität von der **Mikrosatelliteninstabilität** unterschieden.

Mikrosatelliten sind einfach-repetitive DNA-Sequenzen mit einer Länge von bis zu sechs Basen. Diese repetitiven Basensequenzen, auch Repeats genannt, kommen in nicht-kodierender und in kodierender DNA vor. Im menschlichen Genom kommen am häufigsten (A)- und (CA)-Repeats vor, die 10- bis 60-mal wiederholt werden. Die Repeatlängen unterliegen einer großen interindividuellen Variation. Innerhalb des Gewebes eines Individuums ist die Länge der einzelnen Mikrosatelliten aufgrund der somatischen Stabilität jedoch konstant. Da Mikrosatelliten eine hohe Heterozygotierate aufweisen, ist die Mikrosatelliten-Analyse eine einfache Methode zum Nachweis für einen Verlust der Heterozygotie (LOH) [Rüschhoff, 1998]. Mikrosatelliten haben eine vergleichsweise hohe Mutationsrate. Die Mutation erfolgt über DNA-Replikation-Slippage: Während der Replikation ordnen sich der Matrizenstrang und der neugebildete Strang verschoben an, so dass die Repeatanzahl verändert ist. In In-vitro-Experimenten zeigte sich, dass DNA-Slippage sehr häufig vorkommt. In-vivo reduziert ein spezielles DNA-Reparatursystem, das **Mismatch-Repair-System**, die Mutationsrate der Mikrosatelliten um das 100- bis 1000-fache. Die Mikrosatelliten-Mutationsrate ergibt sich folglich aus der primären DNA-Slippage-Rate und der Effektivität des Mismatch-Repair-Systems. Inzwischen sind verschiedenen Mismatch-Repair-Gene identifiziert worden, z. B. die Gene hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS1, hPMS2 etc.. Diese Gene sind darauf spezialisiert, kleine DNA-Mutationen wie Basen-Fehlpaarungen und kurze Insertionen oder Deletionen zu erkennen. [Thibodeau, 1993], [Fishel, 1993]

Als Beispiel für Tumoren, die durch Mikrosatelliteninstabilität entstehen, dient das erbliche hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), ein Krebsdispositionssyndrom, das 5 – 8 % aller kolorektalen Karzinome ausmacht. Das HNPCC ist ein Beispiel für einen erblichen Defekt des Mismatch-Repair-Systems mit resultierender hochfrequenter Mikrosatelliteninstabilität (MSI-high). 90 % der HNPCC-assoziierten kolorektalen Karzinome (KRK) weisen Repeatlängenveränderungen auf, hingegen nur 12 % der sporadischen KRK. Aufgrund einer Keimbahnmutation liegt in allen Körperzellen ein

defektes Allel des betroffenen Mismatch-Repair-Gen vor. Tritt im Lauf des Lebens eine Alteration im zweiten Allel dieses Gens auf, resultiert eine hochfrequente Mikrosatelliteninstabilität. Auch in kodierenden Genabschnitten führt eine Repeatlängenveränderung zu Leserasterverschiebungen und dadurch zur Produktion verkürzter, funktionsloser Proteine. Diese Leserasterverschiebungen betreffen auch Gene, die für DNA-Reparatur, Signaltransduktion oder Apoptose verantwortlich sind. Dadurch können diese Zellen einen Wachstumsvorteil erwerben und akkumulieren aufgrund ihrer genetischen Instabilität weitere wachstumsfördernde Mutationen [Peltomäki, 1997]. Beim HNPCC-Syndrom dient ein international anerkanntes Panel von 5 Mikrosatelliten der Festlegung des MSI-Status: zu diesen Primern zählen BAT25, BAT26, D17S250, D2S123 und D5S346 (National Cancer Institute consensus panel). Kolorektale Karzinome werden in MSI-H (high-frequency MSI; mindestens zwei der fünf Marker instabil), MSI-L (low-frequency MSI; einer der fünf Marker instabil) und MSS (microsatellite stable; alle Marker stabil) eingeteilt. Bei MSI-high-Status spricht man auch vom RER-Phänotyp. (*Replication Error*). Es hat sich herausgestellt, dass MSI-H-Tumoren vor allem im proximalen Kolon lokalisiert sind, spezifische histopathologische Eigenschaften aufweisen und weniger aggressiv im klinischen Verlauf sind als MSI-L- und MSS-Tumoren [Boland, 1998]. In der Praxis wird der MSI-Status zum HNPCC-Screening bei sporadischen Fällen von kolorektalen Karzinomen verwendet. Studien bewiesen, dass bei MSI-H-Tumoren das betroffene Mismatch-Repair-Protein nicht synthetisiert und somit immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden kann [Dietmaier, 1997].

In Bezug auf Papillenkarcinome sind die Aussagen verschiedener Studien nicht einheitlich [Kim, 2003], [Imai, 1998], [Suto, 2001], [Iacono, 2007], [Achille, 1997], [Park, 2003]. Während einige Autoren keine Hinweise dafür sehen, dass Mikrosatelliteninstabilität eine Rolle bei der Karzinogenese der ampullären Tumoren spielt [Park, 2003], postulieren andere, dass Mikrosatelliteninstabilität bei ampullären Karzinomen – analog zum kolorektalen Karzinom – z.B. das TGF-beta-Rezeptor II-Gen verändern und damit einen schwerwiegenden Faktor in der Karzinogenese spielen könnte [Imai, 1998]. Mehrere Studien zeigen Ergebnisse, wonach MSI-positive Papillenkarcinome mit einer besseren Prognose einhergehen [Iacono, 2007], [Suto, 2001], [Achille, 1997].

In der vorliegenden Arbeit ist der MSI-Status der untersuchten Papillenkarcinome bekannt, da dies bereits im Rahmen vorangegangener Arbeiten untersucht worden ist. Dazu wurden das oben beschriebene Primer-Panel inklusive zwei weiterer Primer (BAT40 und D18S61) untersucht.

1.3.2. Chromosomale Instabilität am Chromosom 17p und 18q

Neben der Mikrosatelliteninstabilität gilt die chromosomale Instabilität als karzinogener Entstehungsmechanismus. Die chromosomale Instabilität geht mit Verlust oder Zugewinn von Genmaterial einher, die auch die Tumorsuppressorgene betreffen. Besonders häufig sind beim kolorektalen Karzinom das APC-Gen (Chromosom 5q), das p53-Gen (Chromosom 17p) und Chromosom 18q mit mehreren dort lokalisierten Tumorsuppressorgen betroffen. Mutationen des APC-Gens tragen zu weiteren strukturellen und numerischen Chromosomenveränderungen während der Mitose bei, da das APC eine stabilisierende Wirkung bei der Zellteilung hat. So entstehen Translokationen, Deletionen und Aneuploidie, die wiederum den Funktionsverlust von weiteren Tumorsuppressorgen (z.B. p53, SMAD 4) und Onkogenaktivierungen (K-RAS) nach sich ziehen [Yashiro, 2001].

Der im Rahmen der chromosomalen Instabilität auftretende Verlust der Heterozygotie (LOH) des Chromosoms **17p** ist eines der häufigsten Phänomene beim kolorektalen Karzinom (KRK). Untersuchungen ergaben 17p-LOH in bis zu 77 % der KRK [Bläker, 1999], [Yashiro 2001], [Goel, 2003], [Mueller, 1998]. Dieses Ereignis ist für die Transformation zum malignen Tumor notwendig. Zum Einen lässt sich 17p-LOH weniger häufig bzw. gar nicht in Adenomen finden [Yashiro, 2001]. Zum Anderen weisen de-novo-Karzinome häufiger 17p-LOH auf als Karzinome, die aus Adenomen entstanden sind. Klinisch sind de-novo-Karzinome aggressiver als ex-Adenom-Karzinome. Die höhere Rate an 17p-LOH widerspiegelt diese Tatsache molekularpathologisch als einen in der Tumorigenese weiter fortgeschrittenen Prozess [Mueller, 1998]. p53 ist ein wichtiges Tumorsuppressorgen, das auf Chromosom 17p13 lokalisiert ist. Durch Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 17p und aufgrund weiterer Alterationen des zweiten Allels kommt es zum Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens. Im Unterpunkt 1.4.1 wird auf die Funktionsweise des Tumorsuppressors p53 eingegangen.

Neben Chromosom 17p ist auch Chromosom **18q** beim kolorektalen Karzinom häufig von chromosomaler Instabilität betroffen. Analysen bei kolorektalen Karzinomen haben in bis zu 36 % der Fälle einen LOH des langen Arms des Chromosoms 18 gezeigt. Mehrere Autoren belegen, dass dies ein negativer prognostischer Faktor ist: KRK im Stadium III mit 18q-LOH gehen mit einer höheren Rezidivrate und geringerem krankheitsfreien und Gesamt-Überleben einher als Karzinome im gleichen Stadium ohne 18q-LOH. Somit kann 18q Allelverlust als prognostischer Marker bei Patienten des Stadiums III dienen [Sarli, 2004] oder auch Patienten des Stadiums II identifizieren, die ein hohes Rezidivrisiko haben und von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren könnten [Ogunbiyi, 1998]. Besonders wichtig ist die Region

18q21.1, die sich bei genaueren Analysen als relevante Region des LOH herausgestellt hatte. In dieser Region sind die Tumorsuppressorgene DCC und SMAD4 genetisch kartiert [Martínez-López, 1998]. Im Weiteren (Unterpunkt 1.4.2 und 1.4.3) werden die in dieser Arbeit untersuchten Gene SMAD4 und Maspin des Chromosoms 18q näher beleuchtet.

1.4 Grundlagen zu den immunhistochemisch untersuchten Tumorsuppressorgen

1.4.1 p53

Tumorsuppressorgene sind Gene, deren Genprodukte supprimierende Wirkung auf die Proliferation der Zelle haben. Der Verlust dieser hemmenden Funktion durch fehlende Bildung oder fehlerhaftes Genprodukt führt zu dereguliertem Wachstum der Zelle. Der Funktionsverlust des Gens tritt erst ein, wenn beide Allele des Tumorsuppressorgens fehlerhaft sind (**rezessives** Verhalten) [Böcker, 2001, S179].

Das Tumorsuppressorgen *TP53* ist auf Chromosom 17p13 lokalisiert und kodiert für den nukleären Transkriptionsfaktor p53. Im Falle eines DNA-Schadens der Zelle wird p53 hochreguliert und aktiviert verschiedene Zielgene. Dadurch kommt es zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase, einer Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen und, wenn der DNA-Schaden nicht behoben werden kann, zur Aktivierung des Apoptosemechanismus. Der Zellzyklus-Arrest erfolgt über die Aktivierung des Gens *WAF1* (= wilde type activating fragment 1). Dessen Genprodukt p21^{WAF1} ist ein Inhibitorprotein für zyklinabhängige Kinasen. Dadurch wird verhindert, dass die zyklinabhängigen Kinasen das Retinoblastom-1-Protein phosphorylieren und inaktivieren. Das Retinoblastom-Protein, ebenfalls ein Tumorsuppressor, blockiert den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus und so bleibt die Zelle in der G1-Phase stehen, was die Reparatur des DNA-Schadens ermöglicht. Unter Beteiligung von p53 werden in der Zelle Reparaturgene aktiviert, u.a. *GADD45* (growth arrest DNA damage). Ist der DNA-Schaden behoben, aktiviert p53 das *MDM2* (murine double minute)-Gen, dessen Genprodukt p53 inaktiviert. Wird der DNA-Schaden nicht behoben, aktiviert p53 das *bax*-Protein und *IGF-BP3* (insulin-like-growth-factor), die die Apoptose in Gang setzen. Das Tumorsuppressorgen p53 erfüllt somit seine Funktion als „Wächter des Genoms“ [Lane,1992]. Ohne die Funktion des Tumorsuppressorgens p53 findet keine Zellzykluskontrolle mehr statt, wodurch DNA-Schäden nicht korrigiert werden. Deswegen sind p53-mutierte Zellen genetisch instabiler und Mutationen treten in diesen Zellen vermehrt auf.

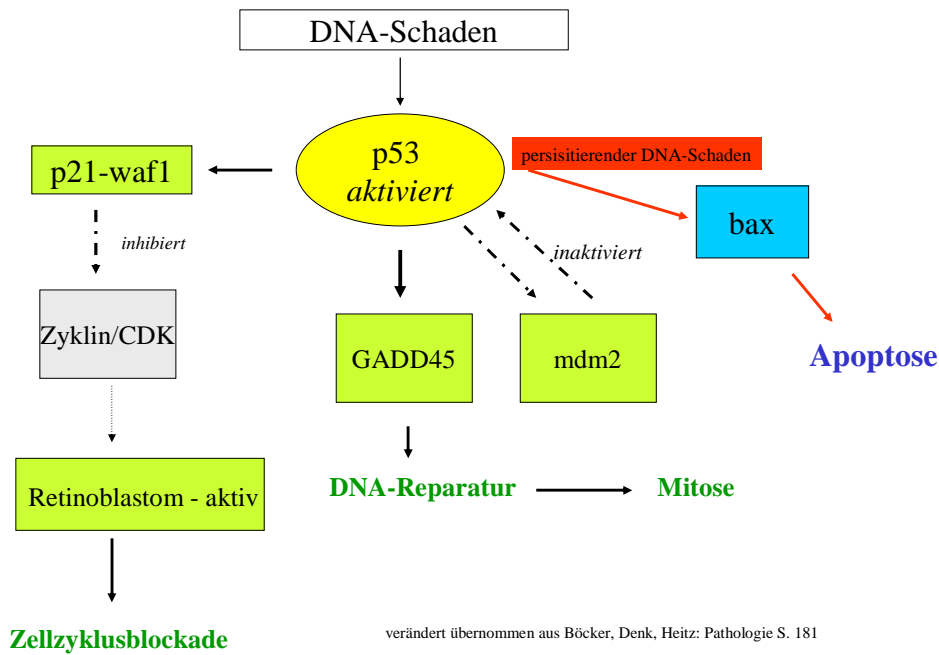


Abb. 1.6: Schematisch Darstellung des Wirkmechanismus des p53-Proteins

Mutierte p53-Proteine weisen eine verlängerte Halbwertszeit auf, kumulieren in den Zellkernen und werden dadurch immunhistochemisch nachweisbar. Immunhistochemische Detektion der p53-Proteine in der Zellkernen dient der Detektion von p53-Mutationen in gastrointestinalen Karzinomen. Speziell in ampullären Karzinomen liegt die Detektionsrate von p53-Genmutationen durch Immunhistochemie bei 80% [Scarpa 1993], [Scarpa 2000].

1.4.2 SMAD4

Das in dieser Studie untersuchte SMAD4 (Begriff ist Kombination aus SMA und MAD, jeweils das Homolog in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila*), auch DPC4 (*deleted in pancreatic carcinoma locus 4*) genannt, ist auf Chromosom 18q21.1 lokalisiert. Es spielt eine wichtige Rolle im TGF- β -Signalweg: TGF- β (*transforming growth factor β*) ist ein Zytokin, das eine wichtige Rolle im Signalnetzwerk der Zellen spielt und Wachstum, Differenzierung und Tod der Zellen regelt. Zur TGF- β -Familie gehören ca. 30 verschiedene Moleküle, die verschiedene, auch komplementäre Effekte haben und zu verschiedenen Zeitpunkten exprimiert werden.

TGF- β bewirkt eine Verbindung zweier Rezeptorkomplexe, die in der Folge Smad-Transkriptionsfaktoren aktivieren. Die Smad-Proteine sind die einzigen bekannten TGF β -Rezeptorsubstrate, die der Signalweitergabe dienen. Es gibt drei verschiedene Untergruppen von Smads, R-Smads, Co-Smads und I-Smads: R-Smads sind Smads, die als direkte

Rezeptorsubstrate dienen, z. B. die Smads 1, 2, 3, 5, 8. R-Smads werden phosphoryliert, was die Affinität zu einer zweiten Smad-Gruppe, den sogenannten Co-Smads erhöht. Beim Menschen ist nur ein Co-Smad bekannt, Smad 4, das von allen R-Smads zur Komplexbildung verwendet wird. Somit spielt Smad 4 eine Schlüsselrolle in der Signalweitergabe des TGF β -Signalwegs. Eine Keimzellmutation von Smad 4 verursacht das juvenile Polyposis-Syndrom. Die sogenannten I-Smads, Smad 6 und 7, inhibieren die TGF- β -Signale in einem Feedback-Mechanismus durch Inhibierung der Komplexbildung von R-Smads und Co-Smad. Smads haben im Zellkern keine präzise Funktion, sondern liefern lediglich ein Signal. Mehr als der Smad-Komplex selbst bestimmen die genetische Situation und andere Signalantworten der Zelle, welche Gene vom Smad-Komplex erkannt und mit welchem Ergebnis die Zielgene transkribiert werden. Die Affinität der Smads zu ihrer Zielsequenz ist gering und in Interaktion mit zellspezifischen Kofaktoren ergibt sich eine zellspezifische Smad-Antwort [Massagué, 2000], [Liu, 2010].

Der TGF- β -pathway führt in epithelialen, endothelialen, hämatopoietischen u.a. Zellen zu einem bedeutenden antiproliferativen Effekt durch Inhibierung der Zellteilung und durch Down-Regulierung von Transkriptionsfaktoren [Massagué, 2000]. TGF- β hat allerdings nicht nur eine Tumorsuppressorfunktion, in manchen Fällen korrelieren hohe TGF-Konzentrationen auch mit fortgeschrittenen klinischen Tumorstadien. Auf indirekte Weise könnte TGF- β Immunantworten unterdrücken und angiogenetische Faktoren stimulieren sowie auf direkte Weise Wachstum stimulieren, wenn Tumorzellen selektiv die Wachstumshemmung als Antwort auf TGF- β verloren haben. Viele Tumorzelllinien zeichnen sich durch einen Verlust der TGF- β -vermittelten Wachstumshemmung aus. Man schätzt, dass fast alle Pankreaskarzinome und Kolonkarzinome Mutationen in Proteinen des TGF- β -Signalwegs haben. Darunter sind auch Mutationen in Smad 2 und Smad 4, beide auf Chromosom 18q21 lokalisiert. Smad 2 und 4 werden entweder durch den Verlust der ganzen Chromosomenregion oder durch kleine Deletionen, Leserasterverschiebungen, nonsense- oder missense-Mutationen inaktiviert. Smad 4, anfangs DPC4 (homozygously deleted in pancreatic carcinoma locus 4) genannt, verzeichnet in der Hälfte der Pankreaskarzinome [Hahn, 1996] und in einem Drittel der Kolonkarzinome einen Verlust beider Allele [Massagué, 2000]. Woodford-Richens et al. haben die Rolle von SMAD4-LOH in Bezug auf die Adenom-Karzinom-Sequenz von kolorektalen Tumoren untersucht: Dabei zeigte sich, dass MSI-positive Tumoren keine LOH oder Mutation im SMAD4-Gen aufweisen, sondern häufig TGF- β -II-Rezeptor-Veränderungen. MSI-negative Tumoren hingegen zeigten häufig SMAD4-Mutationen oder Genverlust von SMAD4 oder DCC, einem weiteren

Tumorsuppressorgen auf Chromosom 18q. Er ordnet das Auftreten von SMAD4-Mutationen in der Adenom-Karzinom-Sequenz zeitlich nach der Auftrennung der pathways in MSI-positive und –negative Tumoren ein [Woodford-Richens, 2001].

Der Nachweis von DPC4/SMAD4-Inaktivierung ist durch Immunhistochemie relativ einfach möglich: Bei Pankreaskarzinomen liegt die Detektionsrate von DPC4-Alterationen bei 93% mit hoher Sensitivität und Spezifität [Wilentz, 2000]. Im normalen pankreatischen Gewebe kann DPC4 immunhistochemisch nachgewiesen werden. So liegt DPC4 in mittlerer bis starker Konzentration in Zytoplasma normaler Azinus-, Ductus- und Inselzellen vor, während die nukleäre Anfärbung variiert [Moore, 2001], [Wilentz, 2000].

1.4.3 Maspin

In direkter Nähe zu SMAD4 auf Chromosom 18q21 befindet sich das Maspin-Gen (SerpineB5). Maspin (*mammary serine protease inhibitor*) ist ein Serin-Protease-Inhibitor und wurde als Tumorsuppressorgen entdeckt, das in normalem Mamma- und Prostatagewebe auftritt und im Rahmen der Tumorigenese vermindert exprimiert wird. Es verhindert Invasivität, Zellmotilität und Metastasierung bei Mamma- und Prostatakarzinomen. Entsprechend korreliert der Verlust der Maspinexpression mit schlechterer Prognose bei Mamma- und Prostatakarzinomen [Abraham et al., 2003], [Pemberton, 1997] [Sheng 1996], [Zou, 1994], [Maass, 2001, B], [Maass, 2001, C], [Hojo, 2001], [Zou, 2002]. Im Gegensatz dazu exprimieren andere Gewebearten wie Pankreasgewebe oder Gallenblasengewebe kein Maspin und Maspin wird erst bei kanzerösen Läsionen exprimiert [Maass, 2001, A], [Ohike, 2003] [Kim, 2010]. In einigen Studien korrelierte Maspinexpression aber auch mit einer schlechteren Prognose, z.B. bei duktalem Mammakarzinom oder nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom [Umekita, 2002], [Hirai, 2005].

Auch beim kolorektalen Karzinom sind die Aussagen bezüglich der Wirkung von Maspin konträr: Nach Boltze geht beim kolorektalen Karzinomen ein Verlust von Maspin mit erhöhter p53-Proteinexpression einher, aber auch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein Tumorrezidiv und kürzeres rezidivfreies Überleben sowie Gesamt-Überleben [Boltze, 2005]. Bettstetter et al. belegen, dass eine Maspin-Überexpression im Zellkern bei mikrosatelliteninstabilen und gering differenzierten Tumoren auftritt [Bettstetter, 2005].

Die Funktionsweise des Maspin ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die tumorsuppressive Wirkung von Maspin kommt einigen Studien zufolge maßgeblich durch seine inhibitorische Wirkung auf die Angiogenese zustande. In einem in vivo Modell mit Rattencornea verhinderte Maspin Neovaskularisation. Auch mutierte Maspinderivate blockierten

Angiogenese in vivo und in vitro [Zhang, 2000]. Zudem bestehen Zusammenhänge mit dem p53-Signalweg: p53 induziert Maspinexpression, indem es direkt an eine p53-Bindestelle im Maspin-Promotor bindet [Zou, 2000]. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass intrazelluläres Maspin über eine vermehrte Expression von pro-apoptotischem bax zur Apoptose der Zellen führt [Zhang, 2005].

Maspin scheint also je nach Zelltyp tumorsuppressive Wirkung zu haben, wobei weder Funktionsweise noch Signaltransduktionswege geklärt sind.

1.5 Fragestellung

Die Karzinomentstehung ist bei kolorektalen Karzinomen – wie in der Einleitung dargestellt – intensiv untersucht. Bei Papillenkarcinomen sind in Bezug auf die Tumorigenese noch viele Fragen offen. Diese Arbeit untersucht ein Kollektiv von Papillenkarcinomen, für die aus anderen Doktor-Arbeiten klinisch-pathologische Variablen wie TNM-Stadium, MSI-Status oder Überlebenszeit bereits bekannt sind.

In dieser Arbeit wird die Rolle der Allelverluste an den Chromosomen 17p und 18q bei Papillenkarcinomen mittels LOH-Analyse für die Marker tp53 und D18S61 beleuchtet und diese in Bezug zu Gesamt-Überleben und MSI-Status gesetzt. Zum Einen sollen die Ergebnisse der LOH-Analyse für die hier gewählten Marker mit den publizierten Ergebnissen unter Verwendung anderer Marker auf diesen Chromosomenarmen verglichen werden. Zum Anderen soll untersucht werden, inwiefern die LOH-Analyse Aussagen über die Prognose treffen kann. Wenn sich hierbei signifikante Ergebnisse zeigen, könnten Details in der Karzinogenese der Papillenkarcinome geklärt werden.

Die im zweiten Teil immunhistochemisch untersuchten Tumorsuppressorgene p53, SMAD4 und Maspin befinden sich auf den per LOH-Analyse untersuchten Chromosomenarmen. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Expression dieser Tumorsuppressorgene werden mit pathologischen und klinischen Variablen wie TNM-Status und Überlebenszeit korreliert. So wird die Relevanz der untersuchten Tumorsuppressoren in der Karzinogenese der Papillenkarcinome beleuchtet. Zum Anderen könnten Zusammenhänge zwischen Allelverlusten der beiden Chromosomenarme und den immunhistochemisch untersuchten Tumorsuppressorproteinen bei Papillenkarcinomen aufgedeckt werden. Im Idealfall könnten Schlussfolgerungen für die klinische Praxis gezogen werden mit Konsequenzen für Prognose und Therapie der Papillenkarcinome.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tumorgewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 164 Karzinome der Papilla Vateri untersucht (152 Whipple-Operationen, 11 transduodenale Lokalresektionen, 1 diagnostische Biopsie). Die Tumorgewebeproben stammten aus verschiedenen pathologischen Instituten: Neben eigenen Präparaten des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg formalin-fixierte, paraffin-eingebettete Gewebeproben aus den pathologischen Instituten in Nürnberg, Kassel, Kiel, Basel (Schweiz) und Varese (Italien) der Jahre 1985 bis 2005.

Die histologischen Schnittpräparate wurden von zwei erfahrenen Pathologen der Universität Regensburg systematisch nachuntersucht und nach Albores-Saavedra subklassifiziert. Die Einteilung des Differenzierungsgrades erfolgte nach der WHO-Klassifikation des Verdauungstrakts. Klinische follow-up Daten sowie der MSI-Status unter Verwendung eines Primerpanels, das auch das National Cancer Institute consensus panel for HNPCC detection berücksichtigte (BAT 25, BAT 26, BAT40, D2S123, D5S346, D17S250, D18S61) waren bereits in anderen Doktorarbeiten für 144 Proben ermittelt worden. DNA aus den Tumorgewebeproben war bereits im Rahmen anderer Arbeiten isoliert worden und lag für Normalgewebe und Karzinomgewebe vor.

Tabelle 2.1 zeigt klinisch-pathologische Parameter der 164 untersuchten Papillenkarzinome.

Kriterien		Anzahl absolut	Anzahl relativ
Geschlecht (n = 164)	männlich	90	54,9 %
	weiblich	74	45,1 %
T-Stadium (n = 161)	T1	28	17,1 %
	T2	62	38,5 %
	T3	60	37,3 %
	T4	11	6,8 %
N-Stadium (n = 149)	N0	76	51,0 %
	N1	73	49,0 %
Grading (n = 160)	G1	23	14,4 %
	G2	79	48,2 %
	G3	58	36,3 %
histolog. Typ (n = 164)	intestinal	79	48,2 %
	pankreato-biliär	40	24,4 %
	G3-Adenokarzinom	22	13,4 %
	intest.-muzinös	14	8,5 %
	invasiv-papillär	9	5,5 %
Staging (n = 150)	I A	21	14,0 %
	I B	35	23,3 %
	II A	18	12,0 %
	II B	63	42,0 %
	III	10	6,7 %
	IV	3	2,0 %

Tabelle 2.1: Klinisch-pathologische Parameter der untersuchten Papillenkarcinome

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Lösungen für die PCR:

- H₂O gereinigt mit Millipore
- DMSO von Merck
- Taq-DNA-Polymerase gebrauchsfertig von Fermentas
- dNTPs: Didesoxynukleotiktriphosphate dATP, dCTP, dTTP, dGTP von Fermentas
- Primer: TP53ALS-FAM von Metabion
D18 S61-HEX von Metabion

TP53-ALS-Up-FAM	TCG AGG AGG TTG CAG TAA GCG GA
TP53-ALS-Down	AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG
D18S61-Up	AAC CAA CAT AAT ATA GCA ATG G
D18S61-Down-HEX	TTC GAA CTT CGA ACC ACC C

Tabelle 2.2: Primersequenzen

- Puffer: 10xReaktionsbuffer von Fermentas

Lösungen für Fragmentanalyse im ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyzer:

- Hi-Di™ Formamid von Applied Biosystems
- GS 400 HD Rox von Applied Biosystems

Lösungen für die Immunhistochemie:

- Citratpuffer (pH 7,3):
 - Lösung A: Citronensäure 0,1M: 21,01g C₆H₈O₇ (Merck) auf 1l H₂O
 - Lösung B: Natriumcitrat 0,1M: 29,41g C₆H₅O₇Na₃ auf 1l H₂O
 - 1 ml der Lösung A und 49 ml der Lösung B mischen, mit Aqua destillata auf 500ml auffüllen, Lagerung im Kühlschrank
- Antibody-Diluent (gebrauchsfertig) von Ventana Medical Systems (Tucson, USA)

2.1.3 Laborgeräte

- Thermomixer compact von Eppendorf
- PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research
- ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems
- Automat Roche MagNA Pure® LC Instrument von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
- Gerät NexES® IHC der Firma Ventana Medical Systems Inc

2.2 Methoden

2.2.1 Amplifikation der DNA-Proben mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

A) Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Die PCR dient dazu, bestimmte DNA-Sequenzen zu vermehren.

Folgende Komponenten sind für eine PCR notwendig:

- 1) Ein Primerpaar, das mit den die Zielsequenz flankierenden Sequenzen hybridisiert,
- 2) alle vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) und
- 3) eine hitzestabile DNA-Polymerase.

In drei Schritten wird die Zielsequenz „kopiert“:

1. Strangtrennung: Durch Erhitzen der Lösung auf 95 °C werden die beiden Stränge des ursprünglichen DNA-Moleküls getrennt.
2. Hybridisierung der Primer: Indem die Lösung auf 54 °C abgekühlt wird, können die Primer mit jeweils einem Strang hybridisieren. Ein Primer des Primerpaares hybridisiert an das 3'-Ende der Zielsequenz auf dem einen Strang, der andere an das 3'-Ende des komplementären Stranges. Die Primer werden in großem Überschuss zugegeben, wodurch der anfangs eingesetzte Doppelstrang sich nicht rückbildet.
3. Da bei 72 °C die hitzestabile DNA-Polymerase optimal arbeitet, wird die Lösung im nächsten Schritt auf diese Temperatur erhitzt. Die Polymerase verlängert beide Primer in Richtung der Zielsequenz.

Im ersten Zyklus geht die DNA-Synthese über die Zielsequenz hinaus, aber durch erneutes Erhitzen der Lösung beginnt der zweite Zyklus und die DNA-Stränge, u. a. die neusynthetisierten, werden getrennt und dienen wiederum als Quelle für die Synthese weiterer kurzer Stränge. Nach n Zyklen ist die Zielsequenz im Idealfall um das 2^n -fache amplifiziert.

B) Protokoll dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden der hex-markierte Mikrosatelliten-Marker D18S61 und der fam-markierte Mikrosatelliten-Marker TP53ALS verwendet, um festzustellen, ob diese Mikrosatelliten instabil sind, d.h. verlängert oder verkürzt vorliegen, oder ein Allel-Verlust (LOH) stattgefunden hat. Die Primer waren fluoreszenzmarkiert, damit die Genprodukte im ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyzer detektiert werden konnten.

Folgendes Protokoll wurde verwendet:

PCR-Reaktion für Primer TP53ALS:

Master-Mix für eine Reaktion

	Menge in μl
H ₂ O	20,5
DMSO	1,5
MgCl ₂	1,8
10xRx Buffer	3,0
dNTPs	0,6

TP53ALS-FAM	0,5
Taq-DNA-Polymerase	0,1
Total	28,0

Zu 28 µl Mastermix wurden 2 µl Proben-DNA hinzugefügt.

Für die PCR-Reaktion im Thermocycler PTC-200 Peltier Thermal Cycler wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

	Temperatur	Dauer
Schritt 1	94 °C	3 min
Schritt 2	94 °C	1 min
Schritt 3	60 °C	1 min
Schritt 4	72 °C	1 min

Schritt 2 bis Schritt 4 → 30 mal wiederholen

Schritt 5	72 °C	8 min
Schritt 6	8 °C	Für immer

PCR-Reaktion für Primer D18 S61:

Master-Mix für eine Reaktion

	Menge in µl
H ₂ O	16,5
DMSO	1,5
MgCl ₂	2,4
10xRx Buffer	3,0
dNTPs	0,6
D18S61-HEX	0,8
Taq-DNA-Polymerase	0,1
Total	25,0

Zu 25 µl Mastermix wurden 5 µl Proben-DNA hinzugefügt.

Für die PCR-Reaktion im PTC-200 Peltier Thermal Cycler wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

	Temperatur	Dauer
Schritt 1	94 °C	3 min

Schritt 2	94 °C	1 min
Schritt 3	52 °C	1 min
Schritt 4	72 °C	1 min
Schritt 2 bis Schritt 4 → 45 mal wiederholen		
Schritt 5	72 °C	8 min
Schritt 6	8 °C	Für immer

2.2.2 Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese

A) Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese im ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyzer

In der Elektrophorese werden geladene Teilchen in einem flüssigen Medium unter Einfluss eines elektrischen Feldes bewegt. Aufgrund verschiedener Wanderungsgeschwindigkeiten, die u.a. von der Ladung der Teilchen, seiner Form und seiner Größe sowie von der Größe des elektrischen Feldes abhängt, werden die Teilchen aufgetrennt. DNA-Fragmente können in der Elektrophorese aufgrund negativ geladener Phosphatgruppen nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Bisher wurde die Fragmentanalyse mit Silbergelelektrophorese durchgeführt. Dabei werden 20 bis 30 Proben auf ein Gel aufgebracht und die DNA-Fragmente durch einen Spannungsgradienten aufgetrennt. Durch Silberfärbung werden die DNA-Banden sichtbar gemacht und im direkten Vergleich ausgewertet.

Bei der Kapillarelektrophorese wandern die Proben in Kapillaren von 10-100 cm und einer Dicke von 25-100 µm. Neben den Vorteilen einer Verminderung der Konvektion bei größeren Spannungen durch verbesserte Wärmeabgabe und der Reduzierung der Probenvolumina lässt sich die Kapillarelektrophorese besser automatisieren als die klassische Elektrophorese. In dieser Arbeit wurde das Kapillarelektrophoresegerät ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems verwendet. Das Gerät erlaubt die Fragment- bzw. Sequenzanalyse von 96 Proben pro Lauf (4/h). Die negativ-geladenen DNA-Proben wandern in einer polymergefüllten Kapillare entlang eines Spannungsgradienten und werden über Fluoreszenzfarbstoffe detektiert. Vorteile des Geräts sind ein geringerer Arbeitsaufwand im Vergleich zur bisher gängigen Silbergelelektrophorese und die objektive Messbarkeit und damit Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Fragmentanalyse wird

- eine Mischung von DNA-Fragmenten ihrer Länge entsprechend aufgetrennt,
- ein Profil der Auftrennung erstellt,
- die Länge jedes Fragments in Basenpaaren ermittelt und
- die geschätzte relative Konzentration jedes Fragments in der Probe angegeben.

Um die DNA-Fragmente detektieren zu können, wurden in der PCR fluoreszenzmarkierte Primer verwendet. Dadurch ist jeder replizierte DNA-Strang mit einem Farbstoffmolekül gekennzeichnet. Im Gerät werden die Probenmoleküle durch elektrokinetische Injektion in die Kapillaren eingebracht, d.h. durch das Anlegen einer Spannung migriert die Probe in die Kapillare. Die Elektrophorese beginnt, wenn die Spannung entlang der Kapillaren aufgebaut wird. Die DNA-Fragmente wandern zum anderen Ende der Kapillare, wobei die kürzeren Fragmente schneller wandern als die längeren Fragmente. Wenn die Fragmente die Detektionskammer erreichen, werden sie durch einen Laserstrahl angeregt, wodurch der Farbstoff an den Fragmenten fluoresziert. Das ausgestrahlte Fluoreszenzlicht wird gesammelt, nach Wellenlänge getrennt und auf die Detektionskamera (charge-coupled device, CCD) fokussiert. Die CCD-Kamera überträgt die Fluoreszenz-Information als elektronische Daten auf einen Computer, die von der 3100-Avant Data Collection Software weiterverarbeitet werden. Nach der Datenprozessierung werden die Daten gespeichert und als Elektropherogramm dargestellt: auf der y-Achse die relative Farbstoff-Konzentration gegen die Zeit auf der x-Achse. Jeder Peak im Elektropherogramm entspricht einer einzelnen Fragmentgröße. Die Daten werden automatisch prozessiert: Über die Positionen und die Formen der Elektropherogramm-Kurven werden die Fragmentprofile berechnet und gespeichert. [Swerdlow, 1990], [ABI und ABI-Prism®Avant Genetic Analyzer System Profile – Handbuch]

B) Protokoll dieser Arbeit

Durch die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in den unterschiedlichen Primern der PCR können mehrere PCR-Produkte in einer Elektrophorese-Probe analysiert werden.

So waren in diesem Fall der TP 53-Primer fam-markiert (blau) und der D18S61-Primer hex-markiert (grün), so dass die jeweils zwei PCR-Amplifikate einer DNA-Probe gepoolt werden und in einer Elektrophorese-Probe analysiert werden konnten.

Die PCR-Amplifikate wurden folgendermaßen für die Analyse vorbereitet:

Jeweils 1 µl des PCR-Produktes wurde zum Elektrophorese-Ansatz (12 µl Hi-Di™ Formamid und 0,7 µl GS 400 HD Rox) hinzugefügt und in einer 96-well-Platte für den Elektrophoreselauf vorbereitet. Die Proben wurden bei 94 °C 3 min denaturiert und auf 4 °C

abgekühlt. Danach können die Proben in das Gerät eingebracht und der Lauf gestartet werden. Wie oben beschrieben werden die Daten prozessiert und können computergestützt weiter ausgewertet werden. Abbildungen 2.1 bis 2.4 zeigen typische Allelveränderungen für LOH und MSI an den Loci *TP53* und *D18S61* nach graphischer Darstellung:

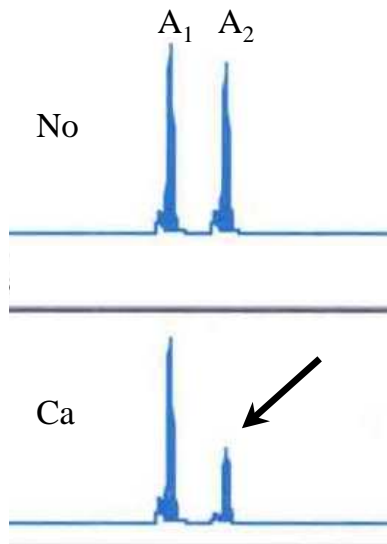


Abbildung 2.1: Elektropherogramm (Fall 4127/01) mit Nachweis eines *TP53*-LOHs (Pfeil); No=Normalgeweb;; Ca=Karzinomgewebe; A₁=Allel 1; A₂=Allel2

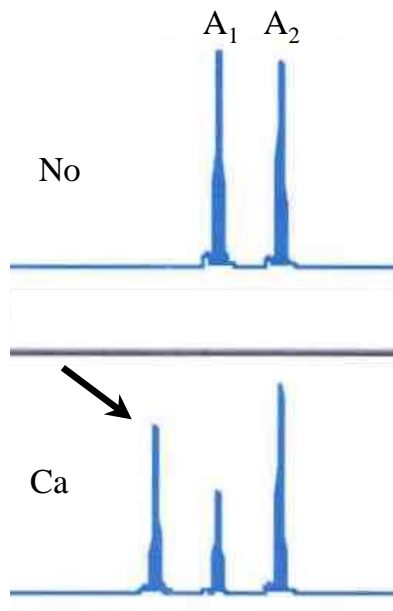


Abbildung 2.2: Elektropherogramm mit Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität (Fall 738/01) an *TP53* (Pfeil); No=Normalgewebe; Ca=Karzinomgewebe; A₁=Allel 1; A₂=Allel 2

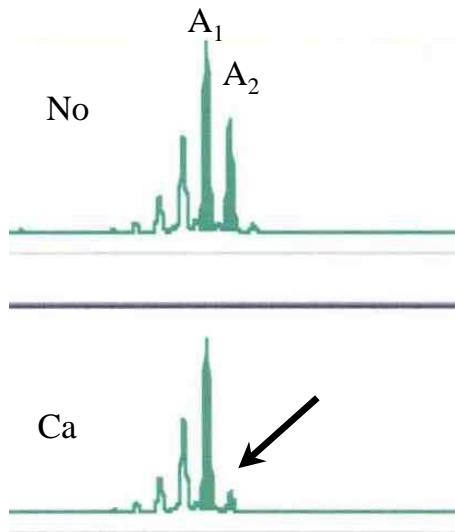


Abbildung 2.3: Elektropherogramm (Fall 25087/99) mit Nachweis eines D18S61-LOH (Pfeil); No=Normalgewebe; Ca=Karzinomgewebe; A₁=Allel 1; A₂=Allel 2

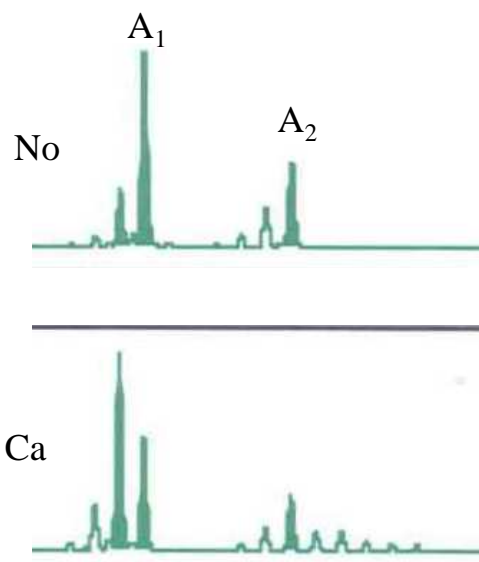


Abbildung 2.4: Elektropherogramm mit Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität (Fall 738/01) an D18S61 (Pfeile); No=Normalgewebe; Ca=Karzinomgewebe; A₁=Allel 1; A₂=Allel 2

2.2.3 Immunhistochemie

A) Prinzip der Immunhistochemie

Durch die Immunhistochemie (IHC) können bestimmte Proteine auf einem Gewebeschnitt nachgewiesen und sichtbar gemacht werden. Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Tatsache, dass Antikörper an zytoplasmatische oder nukleäre Zellkomponenten als entsprechenden Antigene auf einem Gewebeschnitt binden. Bei der indirekten Methode wird in einem zweiten Schritt der primäre Antikörper durch einen zweiten Antikörper sichtbar

gemacht. Häufig wird als primärer Antikörper ein Maus-Antikörper verwendet, der dann durch einen markierten Anti-Maus-Antikörper gebunden wird. Das Signal kann durch die sogenannte Avidin-Biotin-Methode verstärkt werden. Dabei ist der sekundäre Antikörper mit Biotin markiert, an das Avidin mit seinerseits drei freien Bindungsstellen binden kann. Diese Bindungsstellen wiederum können Markermoleküle, z.B. Meerrettichperoxidase besetzt werden.

B) Protokoll dieser Arbeit

Nach Anfertigen von 3 µm dicken Schnitten und Kühlung wurden die Proben in absteigender Alkoholreihe bis 70 % entparaffiniert und anschließend mit Wasser gespült. In der Mikrowelle wurden die Objektträger bei 250 Watt für 30 Minuten in Citratpuffer (pH 7,3) gekocht, um eine vollständige Entparaffinierung sicherzustellen. Nach einer weiteren Spülung wurden die Schnitte im Gerät NexES® IHC der Firma Ventana Medical Systems Inc (Strassburg, Frankreich) unter Verwendung des Ventana Basic DAB Detection Kits gefärbt. Als Negativkontrollen dienten Schnitte ohne primären Antikörper. Folgende Antikörper wurden benutzt:

Zielmolekül	Klon	Verdünnung	Firma
p53	Bp53-12	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
SMAD4	BC/B8	1:200	Biocare Medical, Concord, USA
Maspin	G 167-70	1:1000	Becton Dickinson, Pharmingen, Deutschland

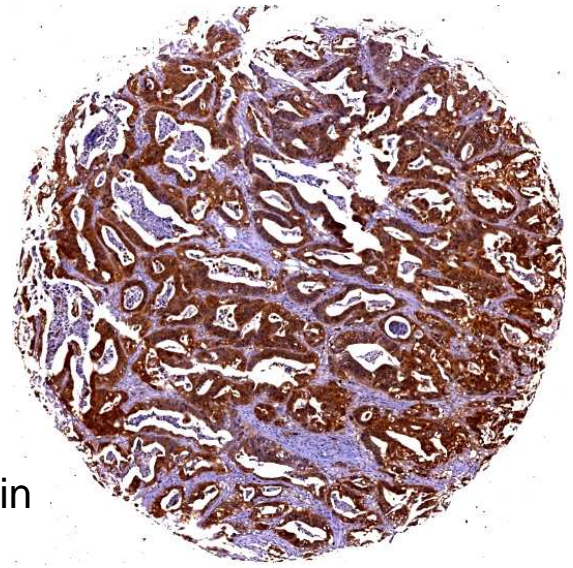
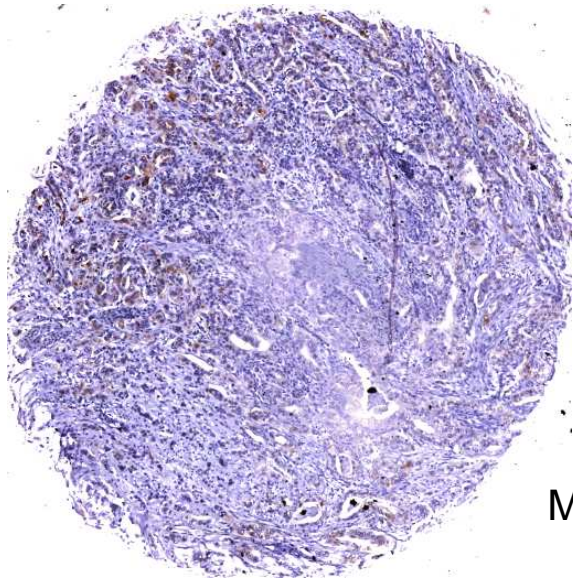
Tabelle 2.2: Antikörper, die für die immunhistochemischen Untersuchungen benutzt wurden

Nach einem ca. einstündigen Lauf wurden von den Objektträgern mit Leitungswasser Ölreste entfernt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe fertiggestellt.

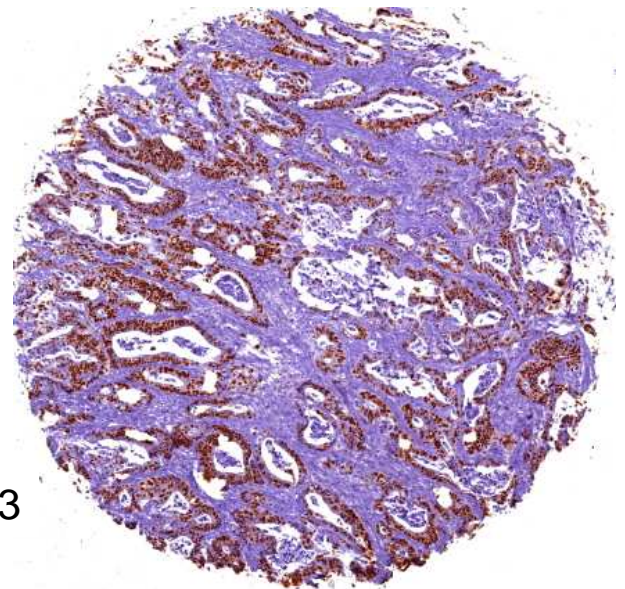
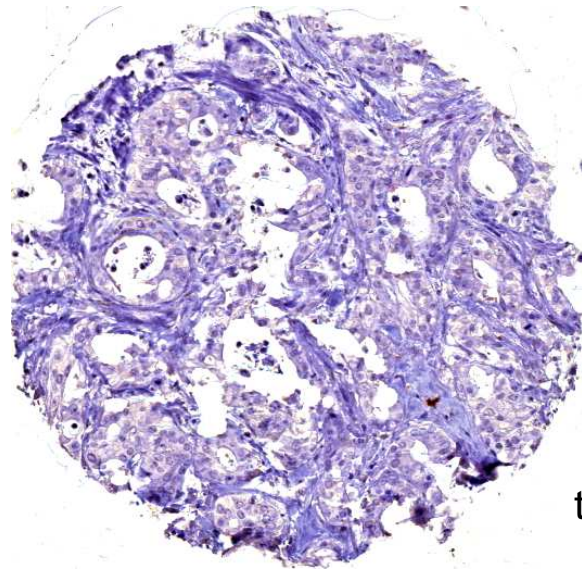
Unter einem Lichtmikroskop wurden die Schnitte ausgewertet: Die p53-Immunhistochemie wurde bei Anfärbung von mindestens 10% der Zellen unabhängig von der Färbeintensität als positiv gewertet.

Bei der Auswertung der SMAD4- und Maspin-Immunhistochemie wurde die subzelluläre, d.h. die nukleäre oder/und zytoplasmatische Anfärbung mit in die Auswertung einbezogen: Bei Vorhandensein nukleärer Anfärbung – auch wenn die Färbeintensität sehr schwach war – galt die SMAD4-Immunhistochemie als positiv, während ausschließliche zytoplasmatische Anfärbung SMAD4-negativ gewertet wurde. Bei der Auswertung der Maspin-Immunhistochemie wurden folgende Kriterien beachtet: nukleäre und/oder zytoplasmatische Färbung mit getrennter Auswertung von Intensität (negativ, geringe, mäßige, starke

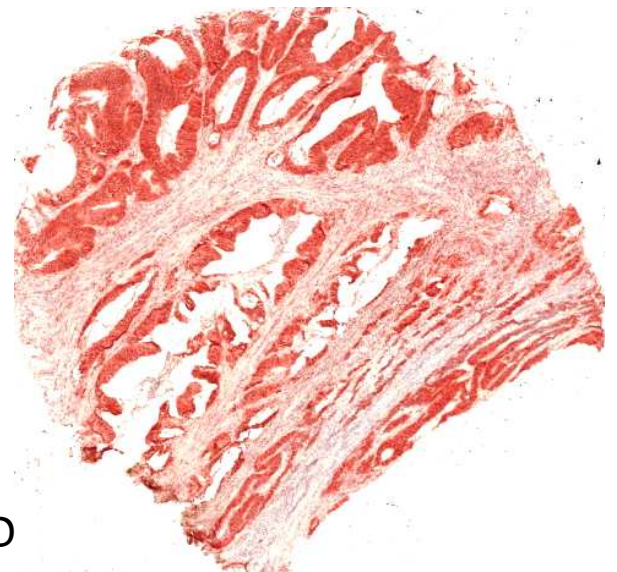
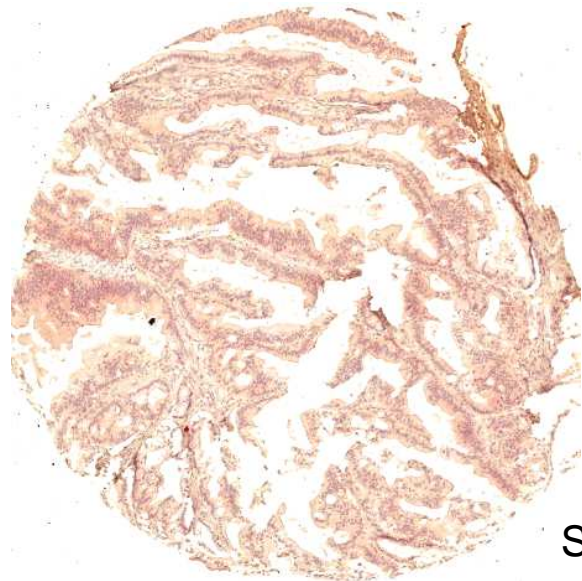
Färbeintensität) und Prozentsatz (Aufteilung in <20%, 20-80% und >80%) der nukleären oder zytoplasmatischen Färbung. Nach Bettstetter und Dietmaier [Bettstetter, 2005], [Dietmaier, 2006] wurden Tumore, bei denen mehr als 10% der Zellen mit mindestens mittlerer Intensität Maspin exprimieren als Maspin-positiv definiert, wobei zwischen nukleärer Maspin-Positivität und zytoplasmatischer Maspin-Positivität unterschieden wird.



Maspin



tp53



SMAD

Abbildung 2.5: Beispiele für negative (links) und positive(rechts) immunhistochemische Schnitte für Maspin, p53 und SMAD

3. Ergebnisse

3.1 Mikrosatellitenanalyse am *TP53*-Locus

3.1.1 Korrelation LOH am *TP53*-Locus mit Tumorentität und MSI-Status

In der Studie wurde ein Gesamt-Kollektiv aus 108 Karzinome hinsichtlich des Allelstatus für *TP53* untersucht, davon 59 Karzinome mit Adenomanteil (Ca-ex-Ad) und 49 Karzinome ohne Adenomanteil (de-novo-Ca). In der Subgruppe nach Ausschluß von MSI-high-Tumoren wurden 97 Karzinome ausgewertet. 27 der 108 untersuchten Papillenkarcinome waren für *tp53* stabil und zeigen eine erhaltene Heterozygotie (Retention of heterozygosity/ROH), 32 wiesen einen Allelverlust (Loss of heterozygosity/LOH) auf, 6 waren an *TP53* mikrosatelliteninstabil, 43 nicht informativ, d.h. in der Analyse zeigte sich nur ein Peak (2 Allele gleicher Größe). Eine Unterscheidung der Tumorentitäten (Ca-ex-Ad versus de-novo-Ca) erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des *TP53*-Status ($p=0,94$), auch nicht bei Analyse der Subgruppe ohne Berücksichtigung von MSI-high Tumoren (Ca_tp53_excl_MSI-high; $p=0,98$). Tabelle 3.1 zeigt die Ergebnisse im Detail.

Mikrosatellitenstatus am tp53-Locus		MSS			MSI n (% von gesamt)	Gesamt n	p
		ROH n (% von gesamt)	LOH n (% von gesamt)	NI n (% von gesamt)			
Gesamtkollektiv Papillenkarcinome (Ca_tp53_alle)		27 (25,0%)	32 (29,6%)	43 (39,8%)	6 (5,6%)	108	
Tumor- entität	Ca-ex-Ad	14 (23,7%)	24 (40,7%)	24 (40,7%)	4 (6,8%)	59	0,94
	De-novo-Ca	13 (26,5%)	19 (38,8%)	19 (38,8%)	2 (4,1%)	49	
MSI-L- und MSS- Papillenkarcinome (Ca_tp53_excl_MSI-h)		25 (25,8%)	30 (30,9%)	37 (38,1%)	5 (5,2%)	97	
Tumor- entität	Ca-ex-Ad	13 (24,5%)	21 (39,6%)	21 (39,6%)	3 (5,8%)	53	0,98
	De-novo-Ca	12 (27,3%)	16 (36,4%)	16 (36,4%)	2 (4,5%)	44	

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse am TP53-Locus für das Gesamtkollektiv und die Subpopulation der Papillenkarcinome jeweils unter Berücksichtigung der Tumorentitäten. (ROH: Retention of heterozygosity; LOH: Loss of heterozygosity; NI: nicht informativ; MSI: Mikrosatelliteninstabilität, MSS: Mikrosatellitenstabilität; MSI-L und MSS: Low-frequency Microsatellite instable und Microsatellite Stable; p: exakte Signifikanz (2-seitig), exakter Test nach Fisher)

Sollte ausschließlich der chromosomale Status im Sinne von Verlust oder Retention der Heterozygotie für TP53 betrachtet werden, so wurden die nicht-informativen und instabilen Tumore aus der Berechnung ausgeschlossen. Es ergab sich die Subgruppe Ca_tp53_dichotom mit 59 Fällen. Tabelle 3.2 zeigt die Ergebnisse.

<i>TP53</i> -Status		LOH n (% von gesamt)	ROH n (% von gesamt)	Gesamt n	<i>p</i>
Papillenkarcinome dichotom (<i>Ca_tp53_</i> <i>dichotom_alle</i>)		32 (54,2%)	27 (45,8%)	59	
Tumor- entität	Ca-ex-Ad	17 (54,8%)	14 (45,2%)	31	1,00
	De-novo-Ca	15 (53,6%)	13 (46,4%)	28	
MSI-L- und MSS- Papillenkarcinome dichotom (<i>Ca-tp53_</i> <i>dichotom_excl_MSI-h</i>)		30 (54,5%)	25 (45,5%)	55	
Tumor- entität	Ca-ex-Ad	16 (55,2%)	13 (44,8%)	29	1,00
	De-novo-Ca	14 (53,8%)	12 (46,2%)	26	

Tabelle 3.2: LOH-Status am TP53-Locus für Papillenkarcinome-**dichotom** (nach Ausschluss der instabilen und nicht-informativen Tumore) und deren Subpopulation jeweils unter Berücksichtigung der Tumorentitäten. (LOH: Loss of heterozygosity; ROH: retention of heterozygosity; *p*: exakte Signifikanz (2-seitig), exakter Test nach Fisher)

Auch hier bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Tumorentitäten ($p=1,00$). Als wichtigstes Ergebnis war eine LOH-Rate von 54,2 % für alle untersuchten Papillenkarcinome (*Ca_tp53_dichotom_alle*) festzuhalten.

3.1.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Mikrosatellitenstatus des TP53-Locus

Die klinischen Daten zum Überleben der Patienten wurden in anderen Doktorarbeiten erhoben. Hier sollte berechnet werden, welchen Einfluss der TP53-Status auf die Überlebenszeiten der Patienten hat. Für diese Analyse standen 66 Fälle mit follow-up-Daten zur Verfügung. Die durchschnittliche Überlebenszeit dieser 66 Fälle betrug 66,3 Monate (95%-CI 53,8 – 78,8). Beim Vergleich der verschiedenen Untergruppen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p= 0,09$), lediglich eine Tendenz, dass bei ROH- und LOH-Tumoren mit einem kürzeren Überleben gerechnet werden muss als bei MSI und NI-

Tumoren: Die durchschnittliche Überlebenszeit von Patienten mit NI-Tumoren betrug 84,4 Monate, bei Patienten mit LOH- oder ROH-Tumoren hingegen 44,7 bzw. 47,3 Monate. Bei der Gruppe der *TP53*-MSI-Gruppe war zu beachten, dass es sich in absoluten Zahlen um nur drei Fälle handelt. Von diesen drei Fällen waren zwei Fälle in der Kaplan-Meier-Analyse nach 36 und 59 Monaten zensiert und der verbliebene Patient nach 14 Monaten verstorben. Bei Patienten mit **Ca-ex-Ad** zeigte sich zwar ein statistischer Zusammenhang hinsichtlich des Gesamtüberlebens, aber da sich in dieser Subgruppe der nach 14 Monaten verstorbene Patient mit dem *TP53*-MSI-Tumor befindet, war dieses Ergebnis nicht repräsentativ. Bei Patienten mit **de-novo-Ca** ergab sich kein statistischer Unterschied im Gesamtüberleben. Auch nach Ausschluss von acht Patienten mit MSI-H-Tumoren ergaben sich ähnliche Überlebenskurven ohne statistische Signifikanz. Der Vergleich der Überlebenszeiten der *TP53*-MSS (Zusammenfassung der Tumoren mit *TP53*-ROH, -LOH und -NI) mit 65,6 Monaten (95%-CI <53 – 78 Monate) versus *TP53*-MSI mit 44,0 Monaten (95%-CI 20 – 68 Monate) war ohne statistische Signifikanz ($p=0,67$) (s. Abb. 3.1).

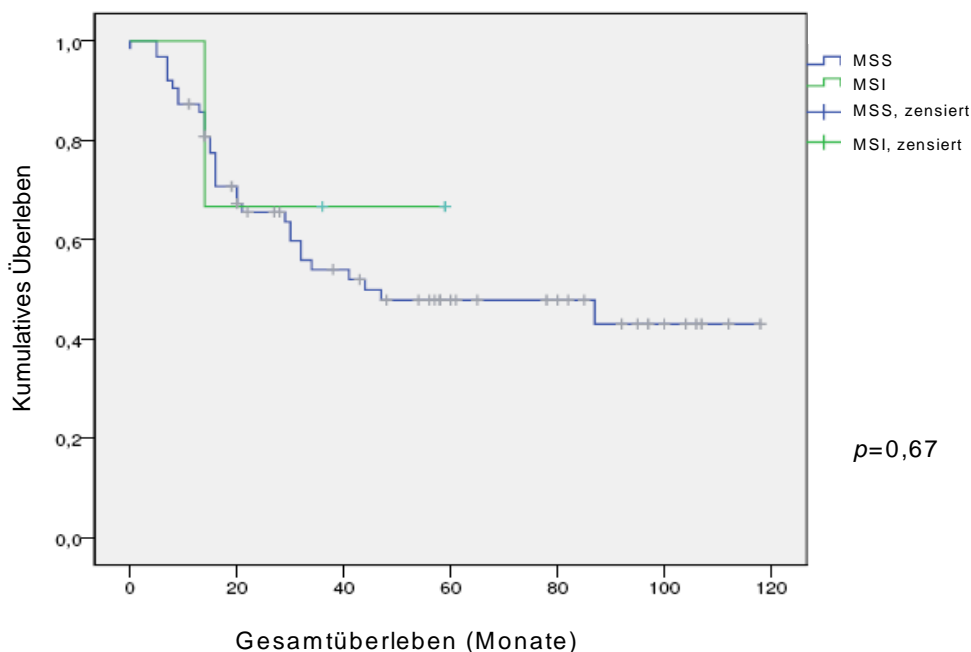


Abbildung 3.1: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von *TP53*-Mikrosatellitenstatus: *TP53*-MSS versus *TP53*-MSI; $n=66$; kein Ausschluss von RER-Tumoren; **MSS**: Mikrosatellitenstabilität am Locus *TP53*; **MSI**: Mikrosatelliteninstabilität am Locus *TP53*; **p**: Signifikanz mittels Log Rank (Mantel-Cox)

Bei gesonderter Betrachtung aller Patienten mit *TP53*-LOH oder *TP53*-ROH-Tumoren ergab sich kein statistischer Zusammenhang zwischen 17p-LOH und 17p-ROH (s. Abbildung 3.2). Die durchschnittlichen Überlebenszeiten betragen bei *TP53*-LOH 45 Monate (95%-CI 29-60) und bei *TP53*-ROH 47 Monate (95%-CI 21-73), analog dazu die medianen Überlebenszeiten

bei *TP53*-LOH 30 Monate (95%-CI 15-45) und bei *TP53*-ROH 20 Monate (95%-CI 0-42) ($p=0,77$). Eine Unterscheidung der Entitäten Ca-ex-Ad und de-novo-Ca oder der Ausschluss von MSI-H-Tumoren lieferte auch hier keine Unterschiede.

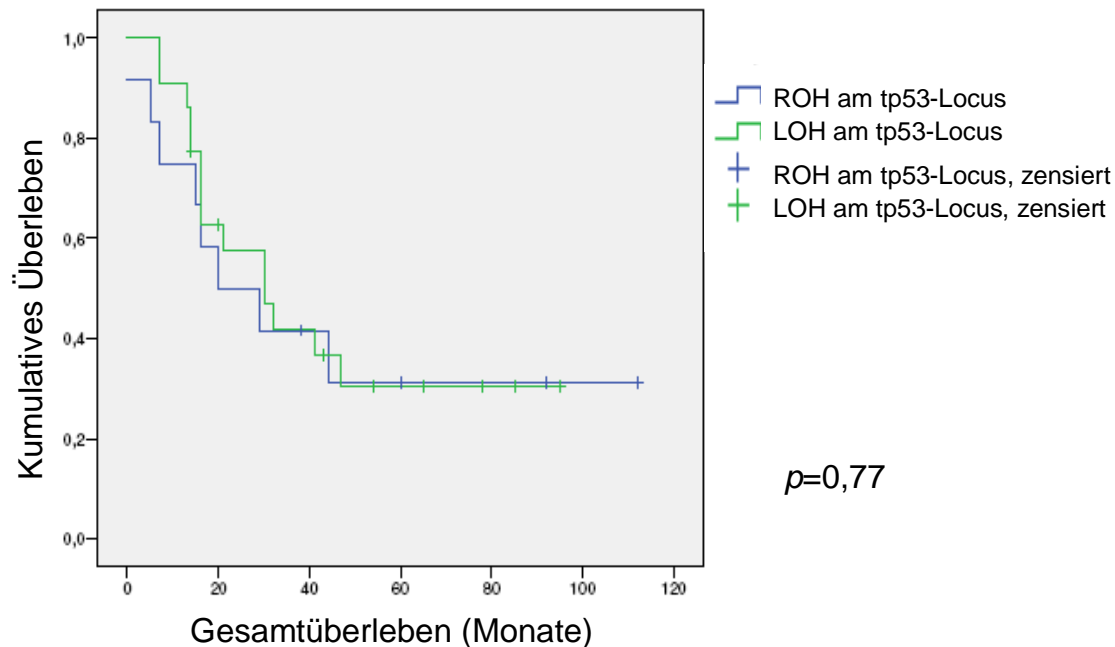


Abbildung 3.2: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom *TP53*-Allelstatus (nur LOH oder ROH), kein Ausschluss von MSI-H-Tumoren; $n = 34$; Signifikanz p mittels Log Rank (Mantel Cox)

3.2 Mikrosatellitenanalyse am *D18S61*-Locus

3.2.1 Korrelation LOH am *D18S61*-Locus mit Tumorentität und MSI-Status

Insgesamt wurde bei 98 Karzinomen die Mikrosatellitenanalyse für *D18S61* durchgeführt. Bei 52 Fällen handelte es sich um Ca-ex-Ad, bei den restlichen 46 um de-novo-Ca. Bei 25 der 98 Fälle trat ein Allelverlust (LOH) für *D18S61* auf, bei 11 Karzinomen zeigte sich eine Mikrosatelliteninstabilität für *D18S61*. Die zwei Tumorentitäten Ca-ex-Ad und de-novo-Ca zeigten in den Ergebnissen keine nennenswerten Unterschiede ($p=0,98$). Zehn der untersuchten Karzinome waren MSI-H. Nach deren Ausschluss (Ca_*D18S61*_excl_MSI-h) ergaben sich ähnliche Resultate für die verschiedenen Alterationen wie für die Gesamtpopulation. Lediglich die Zahl der MSI reduzierte sich in der Ca-*D18S61*_excl_MSI-h von 11,2 auf 3,4 %. Auch in dieser Subgruppe ergab die Unterscheidung nach Tumorentitäten kein signifikant unterschiedliches Ergebnis ($p=0,89$). Die weiteren Ergebnisse sind im Detail der Tabelle 3.3 zu entnehmen.

Mikrosatellitenstatus am D18S61-Locus	MSS			MSI n (% von gesamt)	Gesamt n	P	
	ROH	LOH	NI				
	n (% von gesamt)	n (% von gesamt)	n (% von gesamt)				
Gesamtkollektiv Papillenkarcinome (Ca_D18S61_alle)	47 (48,0%)	25 (25,5%)	15 (15,3%)	11 (11,2%)	98		
Tumor- entität	Ca-ex-Ad	25 (48,1%)	7 (13,5%)	7 (13,5%)	6 (11,5%)	52	0,98
	De-novo-Ca	22 (47,8%)	8 (17,4%)	8 (17,4%)	5 (10,9%)	46	
MSI-L- und MSS- Papillenkarcinome (Ca_D18S61_excl_MSI-h)	46 (52,3%)	25 (28,4%)	14 (15,9%)	3 (3,4%)	88		
Tumor- entität	Ca-ex-Ad	24 (52,2%)	7 (15,2%)	7 (15,2%)	1 (2,2%)	46	0,89
	De-novo-Ca	22 (52,4%)	7 (16,7%)	7 (16,7%)	2 (4,8%)	42	

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse am D18S61-Locus für das Gesamtkollektiv und die Subpopulation der Papillenkarcinome jeweils unter Berücksichtigung der Tumorentitäten. (ROH: Retention of heterozygosity; LOH: Loss of heterozygosity; NI: nicht informativ; MSI: Mikrosatelliteninstabilität, MSS: Mikrosatellitenstabilität; MSI-L und MSS: Low-frequency Microsatellite instable und Microsatellite Stable; p: exakte Signifikanz (2-seitig), exakter Test nach Fisher)

Bei ausschliesslicher Analyse von Karcinomen mit D18S61-ROH bzw. LOH ergab sich die Sub-Gruppe Ca_D18S61_dichotom mit 72 Fällen. Tabelle 3.4 zeigt die Ergebnisse. Auch hier konnte eine weitere Subgruppe nach Ausschluß der MSI-H Tumoren gesondert betrachtet werden ohne statistisch signifikante Unterschiede.

D18S61-Status		LOH n (% von gesamt)	ROH n (% von gesamt)	Gesamt n	<i>p</i>
Papillenkarcinome dichotom (<i>Ca_D18S61_</i> <i>dichotom_alle</i>)		25 (34,7%)	47 (65,3%)	72	
Tumor- entität	Ca-ex-Ad	14 (35,9%)	25 (64,1%)	39	1,00
	De-novo-Ca	11 (33,3%)	22 (66,7%)	33	
MSI-L- und MSS- Papillenkarcinome dichotom (<i>Ca-D18S61_</i> <i>dichotom_excl_MSI-h</i>)		25 (35,2%)	46 (64,8%)	71	
Tumor- entität	Ca-ex-Ad	14 (36,8%)	24 (63,2%)	38	0,89
	De-novo-Ca	11 (33,3%)	22 (66,7%)	33	

Tabelle 3.4: LOH-Status für D18S61 für Papillenkarcinome dichotom und für MSI-L- und MSS-Papillenkarcinome dichotom jeweils zusätzlich in Bezug auf Tumorentitäten. (**LOH**: Loss of heterozygosity; **ROH**: retention of heterozygosity; **p**: exakte Signifikanz (2-seitig), exakter Test nach Fisher)

3.2.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Mikrosatellitenstatus des D18S61-Locus

Für die Kaplan-Meier-Analyse standen 63 Fälle mit follow-up-Daten zur Verfügung. Hinsichtlich der Überlebenszeiten nach Kaplan-Meier ergab sich eine durchschnittliche Überlebenszeit von 61,2 Monaten (95%-CI 48,4 – 74,0) für die 63 untersuchten Fälle. Bei Patienten mit MSI-Tumoren war die Überlebenszeit signifikant länger mit 90,1 Monaten (95%-CI 72,0 – 108,2) als bei Patienten mit MSS-Tumoren (54,5 Monate; 95%-CI 41,1 – 67,8, $p=0,024$). Abbildung 3.3 zeigt die Überlebenskurven für D18S61-MSI versus D18S61-MSS (zusammengefasst aus LOH, ROH und NI). Die Überlebenszeiten der MSS-Tumoren im Detail betragen 45,2 Monate (95%-CI 24,8 – 65,5) für D18S61-LOH-Tumoren, 48,1 Monate (95%-CI 31,5 - 64,8) für D18S61-ROH und 78,6 Monate (95%-CI 44,9 – 112,2) für NI-Tumoren. Die gesonderten Betrachtungen der de-novo-Ca und der Ca-ex-Ad war bei geringer Fallzahl und zensierten Fällen nicht sinnvoll. Nach Ausschluss der 10 Patienten mit MSI-H-

Tumoren (Ca-D18S61_excl_MSI-high) ging die statistische Signifikanz bei reduzierter Fallzahl verloren, wobei nach wie vor die oben beschriebene Tendenz erhalten blieb ($p=0,16$).

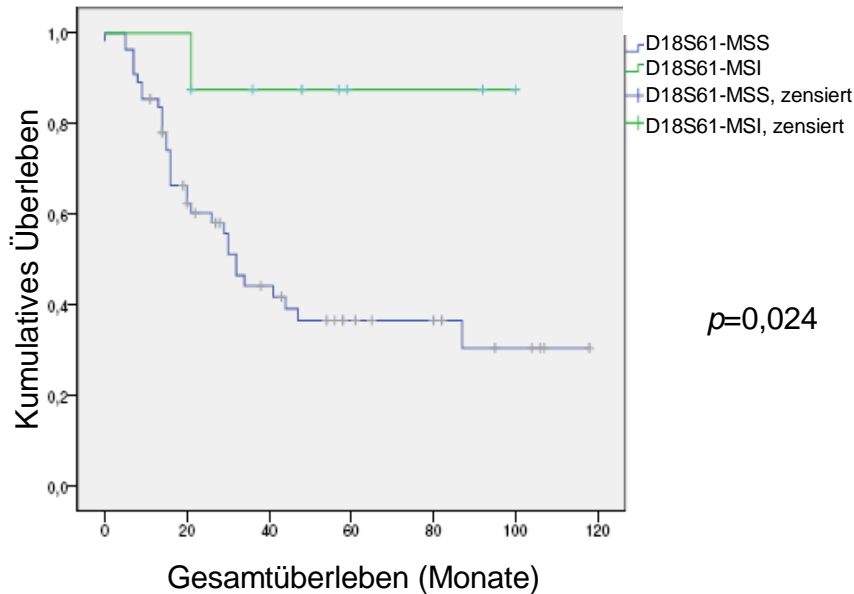


Abbildung 3.3: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von D18S61-Mikrosatellitenstatus: D18S61-MSS versus D18S61-MSI; $n=63$; kein Ausschluss von RER-Tumoren; **MSS**: Mikrosatellitenstabilität am Locus *tp53*; **MSI**: Mikrosatelliteninstabilität am Locus *tp53*; p : Signifikanz mittels Log Rank (Mantel-Cox)

Betrachtete man Patienten mit ROH und LOH für D18S61 (Ca-D18S61_dichotom), so zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Überleben ($p= 0,91$) und die Überlebenskurven verliefen gleichartig (s. Abb. 3.4). Die Fallzahl reduzierte sich in dieser Sub-Gruppe auf 46 Fälle. Die mittlere Überlebenszeit dieser Patienten betrug 48,7 Monate (95%-CI 35,0 – 62,3 Monate). Eine weitere Aufspaltung in die Tumorentitäten Ca-ex-Ad und de-novo-Ca lieferte bei noch geringerer Fallzahl keine relevanten Ergebnisse.

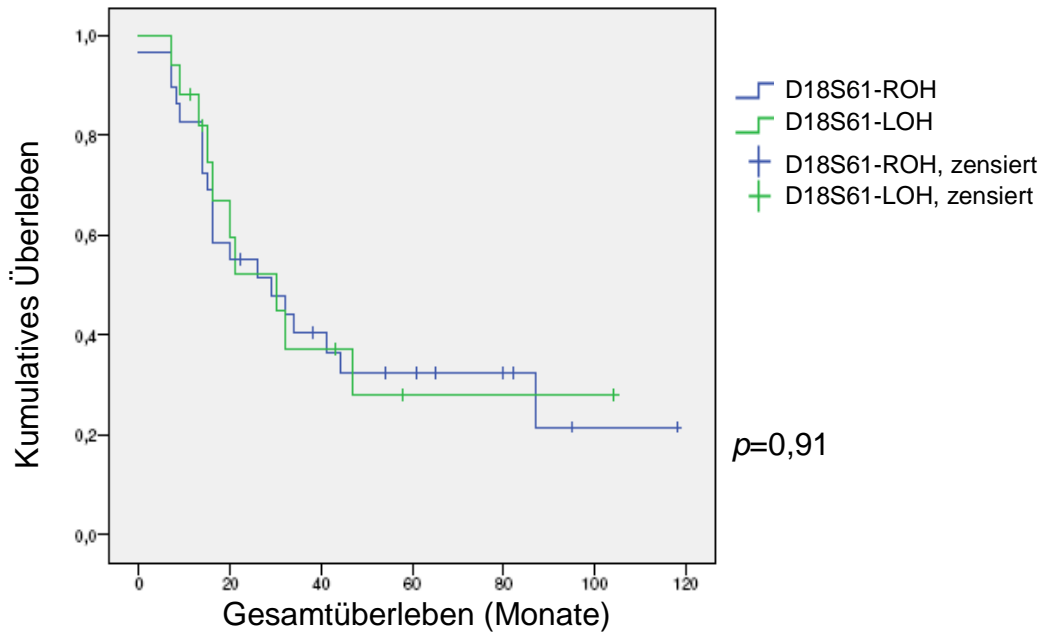


Abbildung 3.4: Gesamtüberleben für Ca-D18S61_dichotom in Abhängigkeit vom LOH-Status für D18S61 (keine RER-Tumoren enthalten); n = 46; Signifikanz p mittels Log Rank (Mantel Cox)

3.3 p53-Immunhistochemie

3.3.1 Korrelation von p53-Immunhistochemie mit klinisch-pathologischen Parametern

Insgesamt wurden 134 Papillenkarzinome bezüglich der immunhistochemischen Expression des p53-Proteins untersucht. Folgende Parameter wurden in Bezug auf p53-Expression untersucht: Tumorentität, histologischer Subtyp, pT- und pN-Stadium, Tumorigradung und –staging sowie 17p-Allelstatus.

Dabei zeigte sich bei keinem der klinisch-pathologischen Variablen ein signifikanter Zusammenhang mit der p53-Expression, auch nicht bei Gruppierung der pT- und UICC-Stadien (pT1 und pT2 versus pT3 und pT4; IA bis IIA versus IIB versus III bis IV). Auch in Bezug auf die tp53-LOH-Analyse unter Berücksichtigung von Tumoren mit LOH bzw. ROH ergaben sich keine statistisch signifikanten Korrelationen (Tabelle 3.5).

p53-Proteinexpression		p53-positiv n (% von gesamt)	p53-negativ n (% von gesamt)	Gesamt n	p
Gesamtkollektiv		51 (38,1%)	83 (61,9%)	134	
Tumorentität	De-novo-Ca	20 (31,7%)	43 (68,3%)	63	0,21
	Ca-ex-Ad	31 (43,7%)	40 (56,3%)	71	
pT-Stadium	pT1	8 (40,0%)	12 (60,0%)	20	0,30
	pT2	21 (42,0%)	29 (58,0%)	50	
	pT3	20 (38,5%)	32 (61,5%)	52	
	pT4	1 (10,0%)	9 (90,0%)	10	
Histolog. Subtyp	Intestinal	29 (46,0%)	34 (54,0%)	63	0,42
	Intest.-muz.	2 (20,0%)	8 (80,0%)	10	
	Pankreatobil.	12 (36,4%)	21 (63,6%)	33	
	G3-Adenoca.	6 (30,0%)	14 (70,0%)	20	
	Invasiv-pap.	2 (25,0%)	6 (75,0%)	8	
Tumorgrading	G1.	3 (27,3%)	8 (72,7%)	11	0,51
	G2	27 (42,9%)	36 (57,1%)	63	
	G3	20 (34,5%)	38 (65,5%)	58	
tp53-Allelstatus	LOH	12 (44,4%)	15 (55,6%)	27	1,0
	ROH	8 (42,1%)	11 (57,9%)	19	

Tabelle 3.5: Korrelation von p53-Immunhistochemie mit klinisch-pathologischen Parametern (**LOH**: Loss of heterozygosity; **ROH**: retention of heterozygosity; **p**: exakte Signifikanz (2-seitig), exakter Test nach Fisher)

3.3.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit einer p53-Protein-Expression

In der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier wurden 97 Fälle analysiert, von denen 33 (34%) eine p53-Überexpression aufwiesen. Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug 76 Monate (95%-CI 61-91). Bei p53-Überexpression war die mittlere Überlebensdauer mit 93 Monaten (95%-CI 66-121) nicht signifikant länger als bei fehlender Proteinexpression (56 Monate (95%-CI 42-69; $p=0,12$; Abb. 3.5).

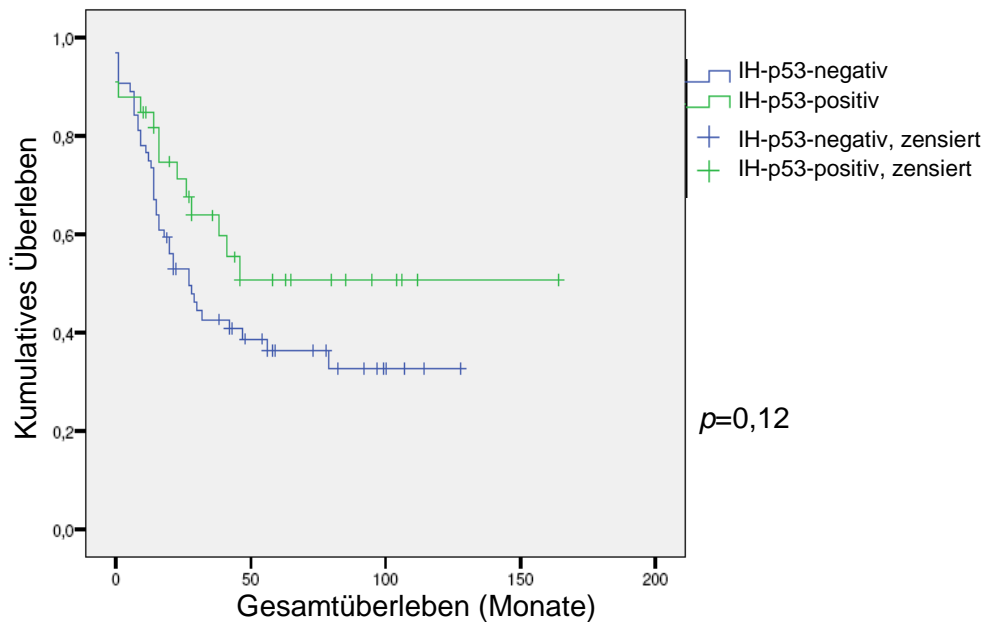


Abbildung 3.5: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von p53-Proteinexpression; n = 97;); IH-p53 = Immunhistochemie p53-Proteini; Signifikanz p mittels Log Rank (Mantel Cox)

3.4 SMAD4-Immunhistochemie

3.4.1 Korrelation von SMAD4-Proteinexpression und klinisch-pathologischen Parametern

Die Ergebnisse der SMAD4-Immunhistochemie wurden in Bezug auf Tumorentität, Tumorstadium, Wachstumsmuster, histologischer Subtyp, Tumorgrading, pT-Stadium und pN-Stadium analysiert. Zudem wurden sowohl tp53- und D18S61-Status mit der SMAD4-Expression korreliert. Die Ergebnisse zu einer Auswahl der untersuchten Parameter sind der Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Von 133 untersuchten Fällen waren 32 (=24%) negativ für SMAD4, d.h. keine nukleäre Färbung. Bezüglich Tumorentität, histologischem Subtyp, Tumorgrading und Wachstumsmuster ergab sich jeweils kein signifikanter Zusammenhang mit den Ergebnissen der SMAD4-Proteinexpression. Dagegen korrelierte der Nodalstatus signifikant mit der SMAD4-Proteinexpression: Während 85% der nodal-negativen Karzinome SMAD4-positiv waren, wiesen nodal-positive Karzinome (pN1) nur in 27 % eine SMAD4-Expression auf ($p=0,007$). Zusätzlich zeigten Karzinome in Abhängigkeit vom pT-Stadium (gruppiert: pT1/pT2-Tumore versus pT3/pT4-Tumore) und UICC-Stadium (gruppiert: IA-IIA versus IIB versus III/IV) in fortgeschrittenem pT- bzw. UICC-Stadium häufiger einen SMAD4-Proteinexpressionsverlust: Während in den Stadien IA bis IIA (ohne Lymphknotenbefall) nur

13% der Karzinome SMAD4-negativ waren, stieg die Rate im Stadium IIB auf 36% und im Stadium III/IV auf 40% an ($p = 0,009$). Analog dazu waren 15,7% der pT1/pT2-Tumore und 34,4% der pT3/pT4-Tumore SMAD4-negativ ($p=0,015$). Unter Berücksichtigung der histologischen Subtypen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der SMAD4-Proteinexpression. D18S61-Mikrosatelliten-Status und SMAD4-Expression korrelierten nicht signifikant miteinander: Bei Karzinomen mit D18S61-LOH war die Rate an SMAD4-Proteinexpressionsverlust mit 47% höher als bei Tumoren mit D18S61-ROH, -NI und -MSI ($p = 0,097$). 40% der SMAD4-negativen Papillenkarcinome wiesen einen LOH an D18S61 auf, hingegen nur 16% der SMAD4-positiven. Auch tp53-Status und SMAD4-Proteinexpression korrelierten nicht signifikant ($p = 0,22$).

SMAD4-Proteinexpression		Negativ (nur zytoplasmatisch) n (% von gesamt)	Positiv (zytoplasmatisch und nukleär oder nur nukleär – auch wenn sehr schwach) n (% von gesamt)	Gesamt N	p
Gesamtkollektiv		32 (24,1%)	101 (75,9%)	133	
Histolo- gischer Subtyp	Intestinal	15 (23,8%)	48 (76,2%)	63	0,74
	Intest.-muz.	1 (9,1%)	10 (90,9%)	11	
	Pankreatobil.	8 (24,2%)	25 (75,8%)	33	
	G3-Adenoca.	6 (31,6%)	13 (68,4%)	19	
	Invasiv-pap	2 (28,6%)	5 (71,4%)	7	
pT	PT1	2 (11,1%)	16 (88,9%)	18	0,081
	PT2	9 (17,3%)	43 (82,7%)	52	
	PT3	18 (34,0%)	35 (66,0%)	53	
	PT4	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8	
pT1/2 vs pT3/4	pT1 o. pT2	11 (15,7%)	59 (84,3%)	70	0,015
	pT3 o. pT4	21 (34,4%)	40 (65,6%)	61	
Stadium gruppiert	I A; I B, II A	8 (13,3%)	52 (86,7%)	60	0,009
	II B	19 (35,8%)	34 (64,2%)	53	
	III, IV	4 (40,0%)	6 (60,0%)	10	
pN	PN0	9 (14,5%)	53 (85,5%)	62	0,007
	PN1	22 (36,7%)	38 (63,3%)	60	
Ca_D18S61	MSS	10 (25,6%)	29 (74,4%)	39	0,097
	MSI	1 (10,0%)	9 (90,0%)	10	
	LOH	8 (47,1%)	9 (52,9%)	17	
	NI	1 (9,1%)	10 (90,9%)	11	
Ca_D18S61 _dichotom	ROH	10 (25,6%)	29 (74,4%)	39	0,132
	LOH	8 (47,1%)	9 (52,9%)	17	

Tabelle 3.6: Korrelation klinisch-pathologischer Parameter und SMAD4-Proteinexpression (p : exakte Signifikanz (2-seitig), exakter Test nach Fisher)

3.4.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit einer SMAD4-Proteinexpression

Betrachtete man die Gesamtzahl von 98 Ampulla-Vateri-Karzinomen, für die Überlebensdaten und SMAD4-Proteinexpression-Status vorlagen, so ergaben sich tendenziell bessere Überlebenszeiten für Patienten mit SMAD4-proteinexprimierenden Karzinomen ($p = 0,108$). Die durchschnittliche Überlebenszeit von Patienten mit Karzinomen mit SMAD4-Proteinexpressionsverlust betrug 43 Monate (95%-CI 25-61 Monate) versus 68 Monate (95%-CI 55-81 Monate) bei Patienten mit Karzinomen mit erhaltener SMAD4-Proteinexpression.

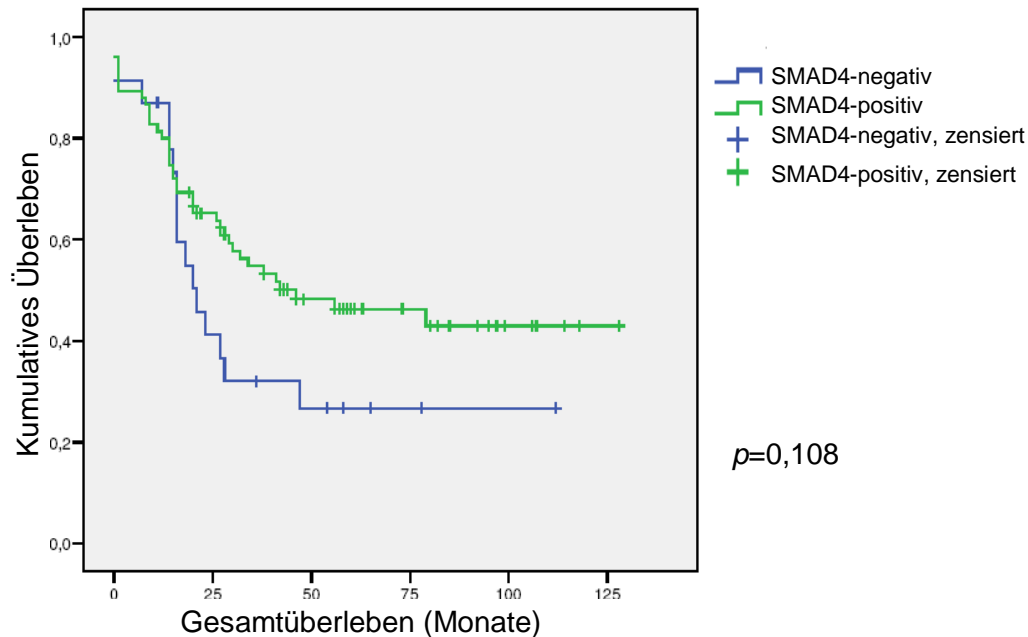


Abbildung 3.6: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der SMAD4-Proteinexpression; $n = 98$; Signifikanz p mittels Log Rank (Mantel Cox); grüner Graph=SMAD4-positiv, blau=SMAD4-negativ

3.5 Maspin-Immunhistochemie

3.5.1 Korrelation von Maspin-Proteinexpression und klinisch-pathologischen Parametern

Insgesamt wurde bei 83 Karzinome die Maspin-Proteinexpression untersucht. Die Ergebnisse wurden in Bezug auf folgende klinisch-pathologischen Kriterien untersucht: Tumorentität, Tumorstadium, MSI-Status, histologischem Subtyp, Grading, pT-Stadium, pN-Stadium und p53-Immunhistochemie.

Bei Auswertung einer **zytoplasmatischen** Maspin-Proteinexpression ergab sich ein signifikanter Zusammenhang in Abhängigkeit vom UICC-Stadium: Bei den niedrigen UICC-

Stadien IA bis IIA und IIB lag der Anteil der Karzinome mit >80% zytoplasmatischer Maspin-Positivität deutlich höher als in den Stadien III und IV (71,0% in Stadien IA bis IIA, 77,8% in Stadium IIB versus 20% in Stadien III/IV) ($p=0,005$). In Bezug auf alle weiteren klinisch-pathologischen Parameter ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge. Eine Tendenz ($p=0,055$) zu ausgeprägter *zytoplasmatischer* Maspin-Positivität (>80% der Tumorzellen) wies die Gruppe der intestinalen und intestinal-muzinösen Karzinome im Vergleich zu den anderen histologischen Subgruppen auf (77,8% versus 52,6%). Diese Tendenz zeigte sich ebenfalls bei Auswertung der hochgradig (>80%) *nukleär* Maspin-proteinexprimierenden Karzinome ($p=0,072$; Tabelle 3.7 und 3.8).

Zytoplasmatische Maspin-Proteinexpression		< 20% n (% von gesamt)	20 – 80% n (% von gesamt)	> 80% n (% von gesamt)	Gesamt	P
Gesamtkollektiv		6 (7,2%)	22 (26,5%)	55 (66,3%)	83	
Stadium gruppiert	IA, IB, IIA	1 (3,2%)	8 (25,8%)	22 (71,0%)	31	0,005
	IIB	3 (8,3%)	5 (13,9%)	28 (77,8%)	36	
	III, IV	2 (20,0%)	6 (60,0%)	2 (20,0%)	10	
Tumor-grading	Grade 1	0 (0,0%)	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5	0,11
	Grade 2	4 (10,5%)	5 (13,1%)	29 (76,3%)	38	
	Grade 3	2 (5,0%)	15 (37,5%)	23 (57,5%)	40	
Histolog. Subtyp	Intestinal	2 (5,40%)	5 (13,5%)	30 (81,1%)	37	0,18
	Intest-muz.	0 (0,0%)	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8	
	Pankr.-bil.	2 (11,8%)	5 (29,4%)	10 (58,8%)	17	
	G3-Ad.ca	1 (7,1%)	6 (42,9%)	7 (50,0%)	14	
Histolog. Subtyp gruppiert	Inv.-pap.	1 (14,3%)	3 (42,9%)	3 (42,9%)	7	0,055
	Int.+int-muz	2 (4,4%)	8 (17,8%)	35 (77,8%)	45	
	Andere	4 (10,5%)	14 (36,8%)	20 (52,6%)	38	

Tabelle 3.7: Korrelation von zytoplasmatischer Maspin-Proteinexpression (unabhängig von Intensität) und klinisch-pathologischen Variablen. (p : exakte Signifikanz (2-seitig), exakter Test nach Fisher)

Nukleäre Maspin-Proteinexpression		< 20% n (% von gesamt)	20 – 80% n (% von gesamt)	> 80% n (% von gesamt)	Gesamt	P
Gesamtkollektiv		19 (22,9%)	46 (55,4%)	18 (21,7%)	83	
Histolog. Subtyp	Intestinal	6 (16,2%)	22 (59,5%)	9 (24,3%)	37	0,34
	Intest-muz.	0 (0,0%)	5 (62,5%)	3 (37,5%)	8	
	Pankr.-bil.	5 (29,4%)	9 (52,9%)	3 (17,6%)	17	
	G3-Ad.ca	4 (28,6%)	8 (57,1%)	2 (14,3%)	14	
	Inv.-pap.	4 (57,1%)	2 (28,6%)	1 (14,3%)	7	
Histolog. Subtyp gruppiert	Intest-muz.	6 (13,3%)	27 (60,0%)	12 (26,7%)	45	0,072
	Andere	13 (34,2%)	19 (50,0%)	6 (15,8%)	38	
pT	pT1	3 (50,0%)	3 (50,0%)	0 (0,0%)	6	0,51
	pT2	7 (20,6%)	20 (58,8%)	7 (20,6%)	34	
	pT3	6 (17,1%)	19 (54,3%)	10 (28,6%)	35	
	pT4	3 (37,5%)	4 (50,0%)	1 (12,5%)	8	

Tabelle 3.8: Korrelation von nukleärer Maspin-Proteinexpression (unabhängig von Intensität) und klinisch-pathologischen Variablen. (p: exakte Signifikanz (2-seitig), exakter Test nach Fisher)

Wurden dagegen Karzinome als Maspin-positiv definiert, bei denen mehr als 10% der Zellen Maspin mit *mindestens mittlerer Intensität* nukleär oder zytoplasmatisch exprimieren, so korrelierte die **nukleäre** Maspin-Positivität signifikant mit den histologischen Subtypen: Papillen-Karzinome vom intestinalen und intestinal-muzinösen Subtyp waren am häufigsten Maspin-positiv (84% und 100%). Der pankreatobiliäre Subtyp wies eine etwas geringere Maspin-Positivität (71%) auf, gefolgt vom G3-Adenokarzinom (57%) und dem invasiv-papillären Papillenkarzinom (43%; $p=0,03$). Dieses Verhältnis spitzte sich noch zu, wenn man die histologischen Subtypen gruppiert in intestinal/intestinal-muzinösen Typ im Vergleich zu den anderen Subtypen betrachtet ($p=0,01$). In Bezug auf UICC- und pT-Stadien wurde zwar keine statistische Signifikanz erreicht, aber eine Tendenz klar erkennbar: Vom Stadium pT1 bis zum Stadium pT3 stieg die nukleäre Maspin-Positivität von 33% auf 80%, um im Stadium pT4 auf 63% abzufallen ($p=0,08$). In Bezug auf das UICC-Stadium zeigte sich eine ähnliche Tendenz ($p=0,07$), wobei einzelne Stadien nur geringe Fallzahlen aufwiesen (Tabelle 3.9).

Bei Berücksichtigung der **zytoplasmatischen** Maspin-Positivität zeigte sich analog ein signifikanter Zusammenhang zwischen den gruppierten histologischen Subtypen mit eindeutig höherer zytoplasmatischer Maspin-Expression bei den intestinalen Subtypen. Im

Stadium pT4 war analog zur nukleären Maspin-Positivität ein deutlicher Abfall festzustellen (Stadien pT1 bis pT3 jeweils > 83%; pT4 = 50,0 %).

Interessant war ein Vergleich von zytoplasmatischer und nukleärer Maspinexpression im Stadium pT1: Während im Stadium pT1 nur 33,3% der Karzinome nukleär positiv waren, waren 83,3% der pT1-Karzinome zytoplasmatisch positiv (s. Tabelle 3.9 und 3.10).

Nukleäre Maspin-Proteinexpression		Negativ Nuk-pos. Zellen < 10% <i>oder</i> schwache Intensität n (% von gesamt)	Positiv Nuk-pos. Zellen > 10% <i>und</i> mind. mittlere Intensität n (% von gesamt)	Gesamt n	p
Gesamtkollektiv		21 (25,3%)	62 (74,7%)	83	
PT	pT1	4 (66,7%)	2 (33,3%)	6	0,08
	pT2	7 (20,6%)	27 (79,4%)	34	
	pT3	7 (20,0%)	28 (80,0%)	35	
	pT4	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8	
Stadium	I A	4 (80,0%)	1 (20,0%)	5	0,07
	I B	4 (23,5%)	13 (76,5%)	17	
	II A	1 (11,1%)	8 (88,9%)	9	
	II B	8 (22,2%)	28 (77,8%)	36	
	III	3 (42,9%)	4 (57,1%)	7	
	IV	0 (0,0%)	3 (100,0%)	3	
Histolog. Subtyp	Intestinal	6 (16,2%)	31 (83,8%)	37	0,03
	Intest.-muz.	0 (0,0%)	8 (100,0%)	8	
	Pankreatobil.	5 (29,4%)	12 (70,6%)	17	
	G3-Adenoca.	6 (42,9%)	8 (57,1%)	14	
	Invasiv-pap.	4 (57,1%)	3 (42,9%)	7	
Histolog. Subtyp gruppiert	Intestinal + intest.-muz.	6 (13,3%)	39 (86,7%)	45	0,01
	Andere	15 (39,5%)	23 (60,5%)	38	

Tabelle 3.9: Korrelation von nukleärer Maspin-Proteinexpression und klinisch-pathologischen Variablen; (p: exakte Signifikanz (2-seitig), exakter Test nach Fisher)

Zytoplasmatische Maspin-Proteinexpression		Negativ Zyt-pos. Zellen < 10% <i>oder</i> schwache Intensität n (% von gesamt)	Positiv Zyt-pos. Zellen >10% <i>und</i> mind. mittlere Intensität n (% von gesamt)	Gesamt n	p
Gesamtkollektiv		14 (16,9%)	69 (83,1%)	83	
pT	pT1	1 (16,7%)	5 (83,3%)	6	0,086
	pT2	4 (11,8%)	30 (88,2%)	34	
	pT3	5 (14,3%)	30 (85,7%)	35	
	pT4	4 (50,0%)	4 (50,0%)	8	
Histolog. Subtyp	Intestinal	4 (10,8%)	33 (89,2%)	37	0,14
	Intest.-muz.	0 (0,0%)	8 (100,0%)	8	
	Pankreatobil.	4 (23,5%)	13 (76,5%)	17	
	G3-Adenoca.	3 (21,4%)	11 (78,6%)	14	
	Invasiv-pap.	3 (42,9%)	4 (57,1%)	7	
Histolog. Subtyp grupp.	Intestinal + intest.-muz.	4 (8,9%)	41 (91,1%)	45	0,043
	Andere	10 (26,3%)	28 (73,7%)	38	

Tabelle 3.10: Korrelation von zytoplasmatischer Maspin-Proteinexpression und klinisch-pathologischen Variablen (p: exakte Signifikanz (2-seitig), exakter Test nach Fisher)

Es bestand kein Zusammenhang zwischen immunhistochemischer Maspin- und p53-Proteinexpression. Insbesondere ergab sich kein statistischer Zusammenhang zwischen nukleärer Maspin-Proteinexpression (>10% mit zytoplasmatischer Maspinexpression ohne Berücksichtigung der Färbeintensität) oder dem prozentualen Anteil der nukleären Maspin-Proteinexpression mit der p53-Proteinexpression ($p=1,0$ bzw. $p=0,99$). Ein Zusammenhang mit dem MSI-high-Status war weder für nukleäre noch für zytoplasmatische Positivität nachweisbar ($p=0,68$ und $p=0,86$).

3.5.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von Maspin-Proteinexpression

Die nukleäre und auch zytoplasmatische Maspin-Proteinexpression unter Anwendung der Kriterien von Bettstetter und Dietmaier zeigte bei dem untersuchten Kollektiv keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Gesamt-Überleben ($p=0,21$ und $p=0,17$).

Eine deutliche Tendenz im Überleben zeigte sich, wenn man getrennt nach prozentualer nukleärer bzw. zytoplasmatischer Maspin-Proteinexpression untersuchte: Bei ausgeprägter nukleärer Maspin-Proteinexpression (>80% der Zellen nukleär positiv) war die Überlebenszeit der Patienten länger als bei mittlerer nukleärer Maspinexpression (20-80% der Zellen nukleär positiv) oder negativer nukleärer Anfärbung ($p=0,096$; Abb. 3.7). Die

durchschnittliche Überlebenszeit betrug 76 Monate (95%-CI: 54 – 97 Monate) versus 51 (95%-CI: 35 – 68 Monate) versus 45 (95%-CI: 17 – 72 Monate).

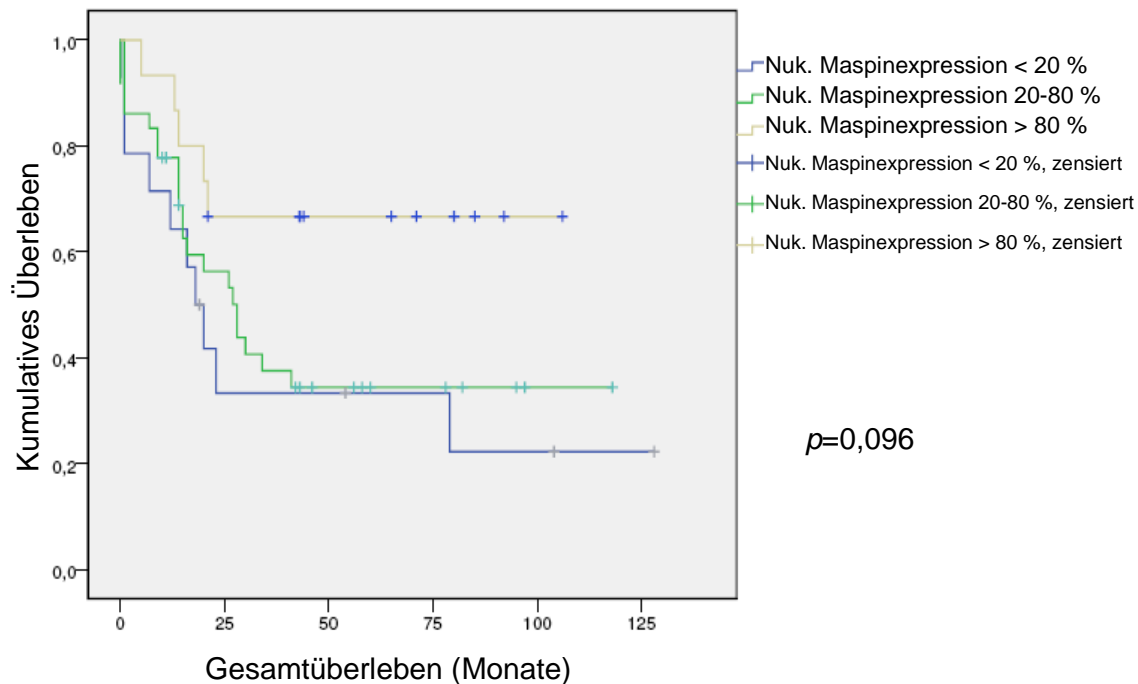


Abbildung 3.7: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von Maspin-Proteinexpression unter Berücksichtigung des prozentualen nukleären Anteil bei Auftrennung in <20 %, 20-80 % und >80 % der Zellen; $n = 65$; Signifikanz p mittels Log Rank (Mantel Cox)

Bei Betrachtung der Überlebenszeiten bei ausgeprägter **nukleärer** Maspinexpression (>80%) versus mittlerer oder negativer nukleärer Maspinexpression (<80%) zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,042$). (s. Abb. 3.8) Analog ergab sich in Abhängigkeit von der prozentualen **zytoplasmatischen** Maspin-Proteinexpression eine deutliche Tendenz ($p=0,083$) für ein längeres Überleben von Patienten mit Karzinomen mit deutlicher zytoplasmatischer Maspin-Proteinexpression (>80%) im Vergleich zu mittlerer oder negativer Maspin-Proteinexpression (s. Abb. 3.9).

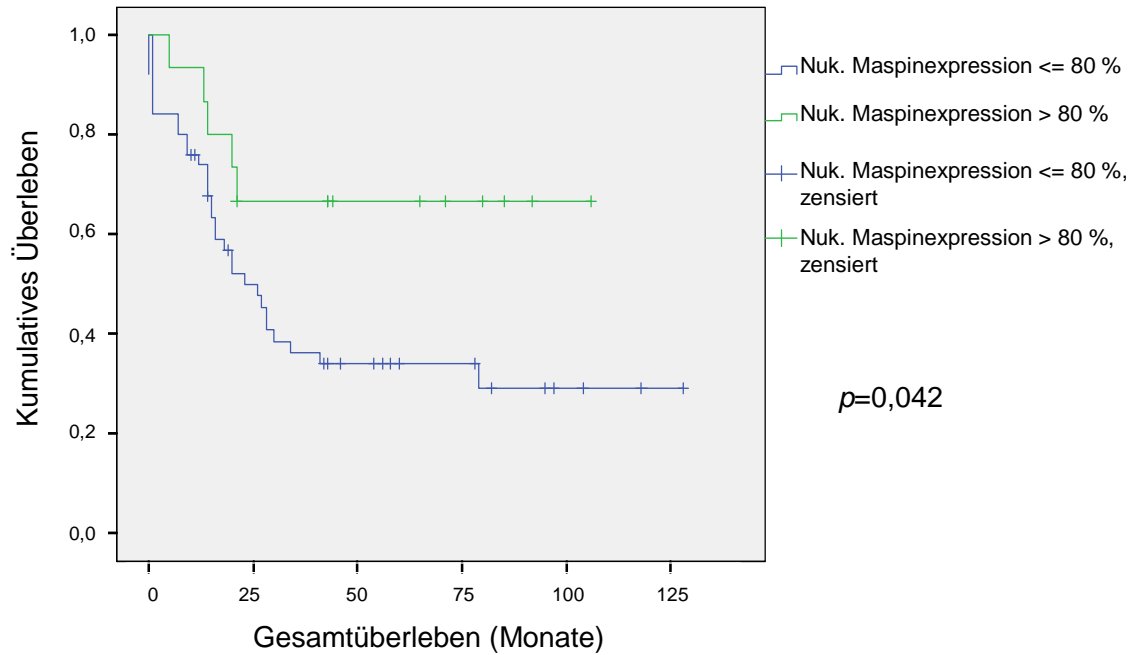


Abbildung 3.8: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von nukleärer Maspin-Proteinexpression unter Berücksichtigung des prozentualen nukleären Anteil bei Auftrennung zwischen >80 % und ≤80 % der Zellen; n = 65; Signifikanz p mittels Log Rank (Mantel Cox)

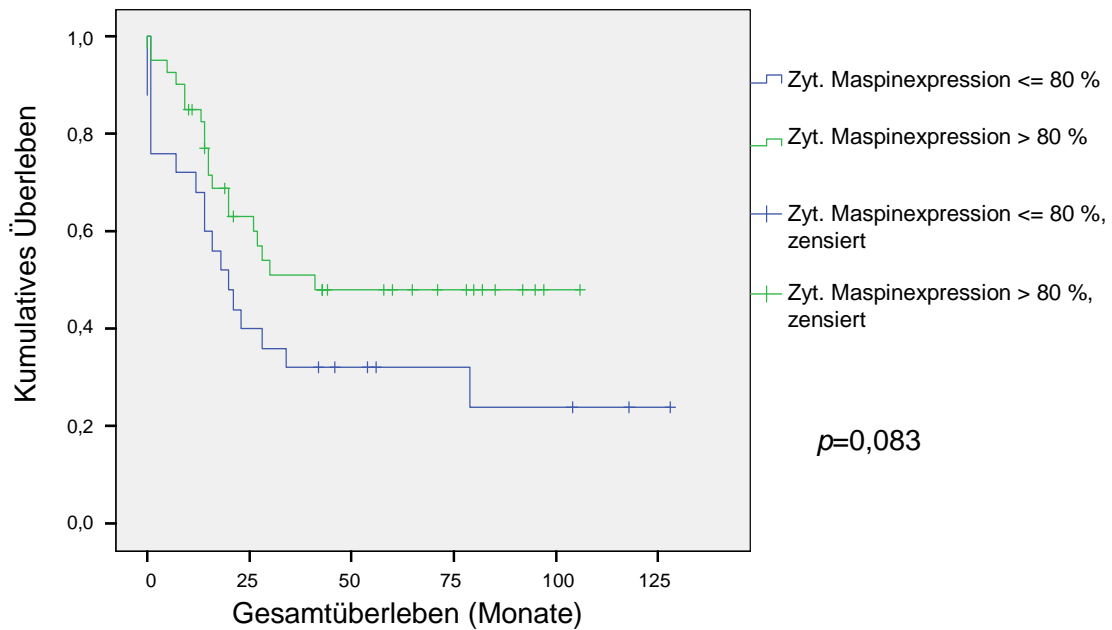


Abbildung 3.9: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von zytoplasmatischer Maspin-Proteinexpression unter Berücksichtigung des prozentualen zytoplasmatischen Anteils bei Auftrennung zwischen >80 % und ≤80 % der Zellen; n = 65; Signifikanz p mittels Log Rank (Mantel Cox)

Im weiteren wurden die Überlebensfunktionen bei positiver nukleärer bzw. zytoplasmatischer Maspin-Proteinexpression (> 10% der Zellen mit mindestens mittlerer Intensität) dargestellt. Die Zusammenhänge waren jeweils nicht statistisch signifikant, aber es zeigte sich eine schwache Tendenz, dass sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch-positive Tumoren längeres Gesamtüberleben aufwiesen.

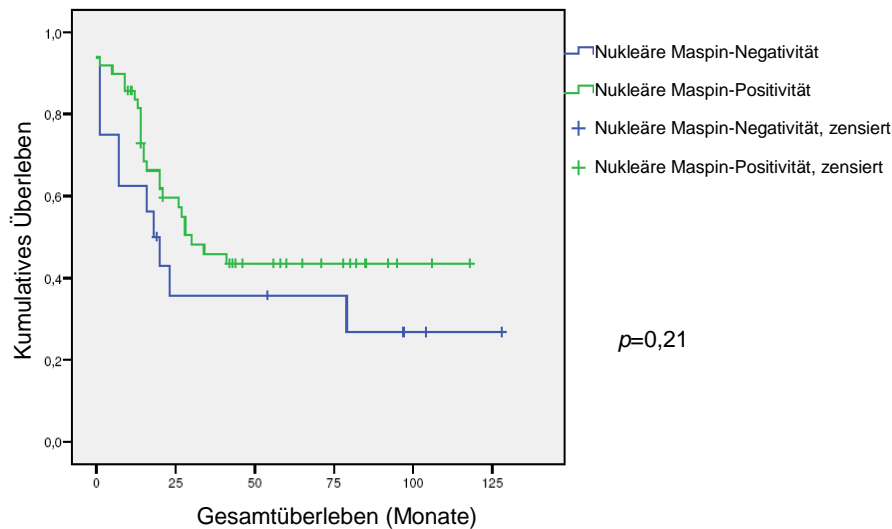


Abbildung 3.10: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der nukleären Maspin-Proteinexpression; Maspin-Positivität: > 10 % der Zellen mit mind. mittlerer Intensität; Maspin-Negativität: ≤ 10 % der Zellen oder nur schwache Intensität; n = 65; Signifikanz p mittels Log Rank (Mantel Cox)

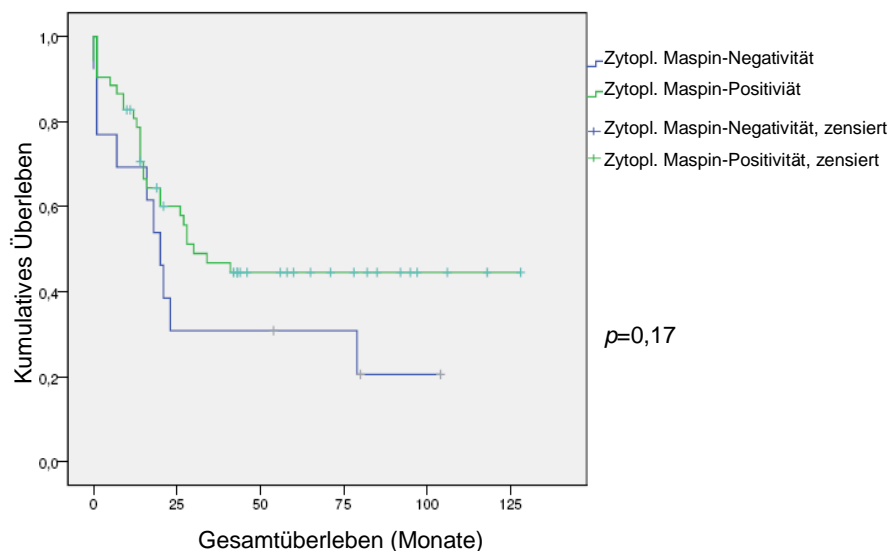


Abbildung 3.11: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Maspin-Proteinexpression; Maspin-Positivität: > 10 % der Zellen mit mind. mittlerer Intensität; Maspin-Negativität: ≤ 10 % der Zellen oder nur schwache Intensität; n = 65; Signifikanz p mittels Log Rank (Mantel Cox)

4. Diskussion

4.1 Analyse von LOH für Chromosom 17p und 18q bei Papillenkarzinomen

4.1.1 Methodik

In der Literatur fanden sich die vier in Tabelle 4.1 aufgeführten publizierten Studien zu 18q- und 17p-LOH bei Karzinomen der Papilla Vateri.

Autor, Jahr	Fallzahl Papillenkarzinome	Verwendete Primer 17p und 18q	Cut-off für LOH	Ergebnis: LOH	
				17p	18q
Scarpa, 2000	53 Einschluss von RER-Tumoren	D17S559 D17S1176 D18S69 D18S64	Intensitätsverlust von mind. 60 %	53 %	34 %
Moore, 2001	16 Ausschluss von RER-Tumoren	<i>werden immer getestet; bei negativem o. nicht-informativem Ergebnis zusätzlich</i>		63 %	50 %
Iacono, 2007	59	D17S513 D17S525 D18S61 D18S58		55 %	36 %
Park, 2003	32 13 de-novo-Ca 19 Ca-ex-Ad	TP53 D18S34	Intensitätsverlust von mind. 50%	54 %	42 %
Aktuelle Studie	72	TP53 D18S61	Intensitätsverlust von mind. 50%	55 %	35 %

Tabelle 4.1: Veröffentlichungen zu 17p und 18q-LOH bei Papillenkarzinomen; . Grau hinterlegt: Studien aus Veroneser Arbeitsgruppen.

Drei der vier Veröffentlichungen stammten aus dem pathologischen Institut in Verona [Scarpa, 2000], [Moore, 2001], [Iacono, 2007]. Diese drei Arbeiten griffen alle auf denselben Gewebepool zurück. Die 59 von Iacono et al. untersuchten Proben stammten aus chirurgischen Resektionen von Tumoren der Papilla Vateri in der chirurgischen Klinik Verona aus den Jahren 1970 bis 2001, während Scarpa et al. Proben aus den Jahren 1986 bis 1994 untersuchten. Bei Moore et al. dienten die Ampulla-Vateri-Karzinome (AVC) als Vergleich zu pankreatischen Tumoren und 15 der 16 AVC waren Teil der bereits bei Scarpa et al. untersuchten Tumoren. Moore et al. schlossen nur kleine Läsionen mit unzweifelhaft

ampullärer Herkunft in die Studie mit ein und Tumoren mit RER-Phänotyp aus. Zur Ermittlung des LOH-Status verwendeten die Veroneser Arbeitsgruppen alle eine Methodik, die sich im Cut-off für LOH und in der Anzahl und Art der verwendeten Primer von dieser Arbeit unterschied: So wurden die LOH-Analysen mittels Silbergelten durchgeführt und die Intensitätsverluste der Allele, welche mindestens 60 % bei LOH betragen sollten, visuell beurteilt. In dieser Doktorarbeit wurde die Kapillarelektrophorese verwendet, die eine exakte Quantifizierung zulässt und bei der ein 50%-iger Intensitätsverlust als üblicher Cut-off zur Festlegung eines LOH galt. Der niedrigere Schwellenwert könnte Abweichungen im Sinne einer höheren LOH-Rate in der vorliegenden Studie zur Folge haben. Von den Arbeitsgruppen in Verona wurden jeweils mindestens zwei Primer für die Chromosomenarme 17p und 18q untersucht. Bei negativem, d.h. ROH-Ergebnis oder im Falle eines nicht-informativen Ergebnisses erfolgte die Analyse zweier weiterer Marker. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich ein Marker auf jedem Chromosomenarm betrachtet. Dadurch ergab sich eine eingeschränkte Aussagekraft für die LOH-Analyse, v.a. auch bei relativ hoher Rate an nicht-informativen Ergebnissen (für *TP53* 40 %) und somit Verringerung der auswertbaren Fallzahl. Die in Verona verwendeten Primer für Chromosom 17 sind alle in der Region 17p13 auf dem kurzen Arm lokalisiert, in der auch *TP53* liegt. Die für den langen Arm des Chromosoms 18 gewählten Primer liegen im Bereich 18q21 und 18q22. Die Ideogramme in Abbildung 4.1 und 4.2 zeigen die verschiedenen Regionen der zwei untersuchten Chromosomen. Die primär von den Arbeitsgruppen in Verona verwendeten Primer D18S69 und D18S64 liegen in der Region 18q21 und damit etwas zentromernäher als der in dieser Arbeit verwendete Primer D18S61 auf 18q22.2.

Park et al. verwendeten ebenfalls nur einen Marker pro Chromosomenarm und zwar den hier verwendeten Primer *TP53* für 17p und D18S34 für 18q. D18S34 liegt in der Region 18q12.2-12.3 und somit nochmals zentromernäher.

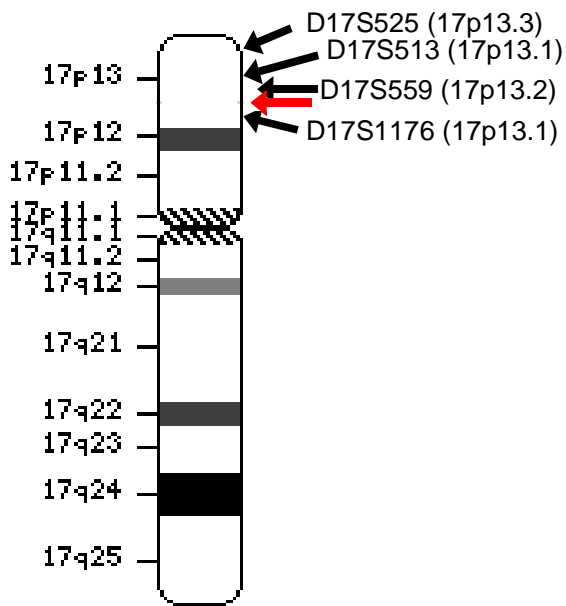


Abbildung 4.1: Ideogramm des Chromosom 17 mit Markierung der diskutierten Mikrosatellitenloci sowie des Allels für TP53 (roter Pfeil) [überarbeitet nach

www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/]

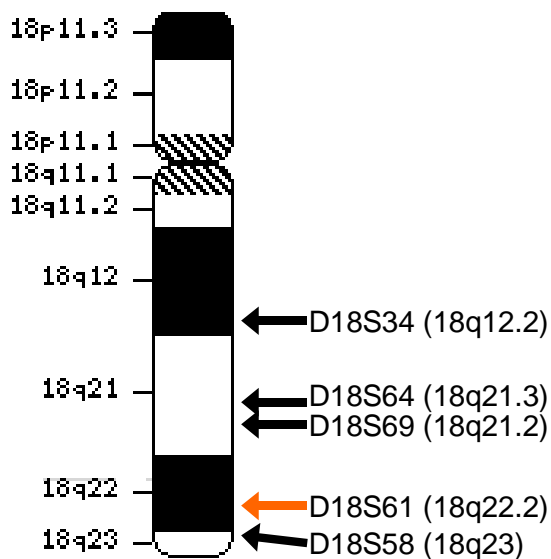


Abbildung 4.1: Ideogramm des Chromosom 18 mit Markierung der diskutierten Mikrosatellitenloci sowie des Allels für D18S61 (roter Pfeil) [überarbeitet nach www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/]

Die Lokalisation der Primer auf den Chromosomenarmen könnte relevant sein, wenn man bedenkt, dass Deletionen in manchen Regionen des Chromosoms gehäuft auftreten. So kann ggf. je nach Lokalisation des Primers auf dem Chromosomenarm in manchen Regionen häufiger LOH an den Mikrosatellitenloci festgestellt werden.

4.1.2 Vergleich von LOH an verschiedenen Mikrosatellitenloci des Chromosoms 17p mit TP53-LOH (17q21.31)

Mit 55 % LOH für *TP53* war das Ergebnis dieser Doktorarbeit nahezu identisch mit dem Ergebnis von Park et al. (54%), die mit ähnlicher Methodik arbeiteten (nur ein Marker, gleicher Marker, Gelelektrophorese). Aber auch die Studien von Iacono et al. und Scarpa et al. lieferten ein sehr ähnliches Ergebnis, obwohl die Vergleichbarkeit bei unterschiedlichen Analyseverfahren (s.o.) eingeschränkt ist. Moore et al., die die RER-Tumoren bei den Berechnungen ausgeschlossen haben – analog zur Subgruppe Ca-tp53-dichotom-excl-MSI-high, verzeichneten mit 63% eine hohe LOH-Rate. Dies mag sich dadurch erklären, dass MSI-high-Tumoren ohne Allelverlust berechtigt der ROH-Gruppe zugeordnet werden, wie Scarpa et al. für ihr Kollektiv mit ergänzenden Untersuchungen nachgewiesen haben. Deswegen schlossen Scarpa et al. die RER-Tumoren nicht aus der Analyse aus und ermittelten eine LOH-Rate von 53%. In der hier vorliegenden Arbeit (n=59) lag die LOH-Rate nach Ausschluß der RER-Tumoren jedoch nur 0,3 % höher. Die auffallend hohe LOH-Rate bei Moore et al. könnte durch eine statistische Verzerrung bei niedriger Fallzahl (n=16) zustande kommen. Insgesamt war *TP53*-LOH mit 55% ein häufiges Ereignis in der Karzinogenese der Papillenkzinome, wobei es keine Unterschiede zwischen De-novo- und Ex-Adenom-Karzinomen diesbezüglich gab.

4.1.3 Vergleich von LOH an verschiedenen Mikrosatellitenloci des Chromosoms 18q mit D18S61-LOH (18q22.2)

Mit 34,7 % D18S61-LOH (s. Ca_D18S61_dichotom_alle) ergab sich in dieser Untersuchung eine vergleichbare Rate zu den Studien aus Verona (Scarpa et al. 34 %, Iacono et al. 36%, Moore et al. 50 %). Wie oben beschrieben wurde in den italienischen Arbeitsgruppen nicht nur ein Marker pro Chromosomenarm untersucht, sondern mindestens zwei und nicht oder nicht ausschließlich der Marker D18S61 verwendet. Bei der aktuellen Studie waren 15% der Allele für D18S61 nicht informativ, ein relativ geringer Anteil, der die Aussagekraft des Primers nur mäßig minderte. Einen Unterschied der Ergebnisse entsprechend der Primerwahl (zentromernah oder telomernah) und Anzahl der untersuchten Primer schien es nicht zu geben, insbesondere auch dann nicht, wenn man die Studie von Park et al. mit einer etwas höheren LOH-Rate von 42% bei zentromernäherem Primer miteinbezog. Die Auswahl der Primer am Chromosom 18 schien keine größere Konsequenz zu haben, sodass die Vermutung naheliegt, dass das Deletionen mit LOH der Mikrosatellitenloci am Chromosom 18q häufig vorkommen und das mutmaßliche Zielgen für die Tumorprogression der Papillenkzinome ebenfalls in diesem Bereich liegt. Dies träfe beispielsweise auf das Gen *SMAD4/DPC4* auf

Chromosom 18q21.1 zu. Wie in dieser Doktorarbeit unterschieden Park et al. nach Tumorentität und bestätigten das hier gefundene Ergebnis, dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Karzinomen mit Adenomanteil und den Karzinomen ohne Adenomanteil bezüglich der LOH-Analyse für Chromosom 18 ergab. Inwiefern der Ein- oder Ausschluss von MSI-high-Tumoren die Ergebnisse der Studien beeinflussen, war nicht genau zu beurteilen. Moore et al. schlossen die RER-Tumoren aus der Analyse aus, während Scarpa et al. mit dem Argument, dass jeweils die Heterozygotie bei den MSI-high-Fällen erhalten bleibt, die Tumoren in die Analyse einschlossen. In dieser Studie ergab sich ein nahezu gleiches Ergebnis nach Ausschluss der RER-Tumoren.

4.1.4 Prognostische Wertigkeit des LOH-Status der untersuchten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 17p und 18q

Von den in Tabelle 4.1 aufgeführten Studien waren nur in den Publikationen von Scarpa et al. und Iacono et al. Überlebensdaten der Patienten enthalten. In der Studie von Iacono et al., 2007, war *17p-LOH* unabhängig vom pT-Stadium ein negativer prognostischer Marker, während Tumoren vom RER-Phänotyp Langzeitüberleber waren. Auch bei Scarpa et al. erwies sich *17p-LOH* als schlechter prognostischer Faktor, das relative Risiko zu sterben bei *17p-LOH* war 11,3 (95% CI) mal höher als bei *17p-ROH* (Einschluss der RER-Tumoren in die Analyse). Bei Ausschluss der RER, die ja - wie bei Iacono et al. beschrieben - bessere Überlebenswahrscheinlichkeiten hatten, reduzierte sich das relative Risiko bei *17p-LOH*-Tumoren auf 7,8 (95% CI). Die mediane Überlebenszeit betrug bei Scarpa et al. bei *17p-LOH* 20 Monate (95% CI 13-25), während in der vorliegenden Studie die mediane Überlebenszeit nicht signifikant unterschiedlich für Patienten mit *TP53-LOH*-Tumoren 30 Monate (95% CI 15-45) und für Patienten mit *TP53-ROH*-Tumoren 20 Monate (95% CI 0-42) betrug ($p=0,77$). Diese Diskrepanz könnte einerseits durch die unterschiedliche Primerauswahl für Chromosom 17p erklärt werden: wie bereits beschrieben untersuchten Scarpa et al. und Iacono et al. mindestens zwei Primer am Chromosom 17p und ergänzten ggf. durch weitere zwei Primer. Allerdings bestand eine große Übereinstimmung zwischen LOH-Rate bei Iacono et al., Scarpa et al. und der vorliegenden Studie. Scarpa et al. und Iacono et al. arbeiteten in ihren Analysen mit einer größeren Fallzahl ($n=53$ bzw. $n=59$), während in der vorliegenden Studie die nicht-informativen Fälle (40%) für die Kaplan-Maier-Analyse nicht zur Verfügung standen und sich dadurch die Zahl der Fälle mit Daten zum Überleben auf nur 34 Patientenverläufe reduzierte. Möglicherweise wurde in der vorliegende Studie aufgrund dieser geringeren Fallzahl kein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt.

Auch für Patienten mit **18q-LOH**-Tumoren ermittelten Scarpa et al. und Iacono et al. jeweils ein kürzeres Überleben. Die vorliegende Studie bestätigte dieses Ergebnis nicht. Das könnte daran liegen, dass nur mit einem Marker gearbeitet wurde, der mutmaßlich keine repräsentative Aussage für weitere LOH beispielsweise der Tumorsuppressorgene auf Chromosom 18q zulässt, wenngleich die LOH-Rate denen der anderen Studien entsprach. Auch hier standen in der vorliegenden Studie nur 46 Fälle mit Überlebensdaten zur Verfügung, was die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen ebenfalls erklären könnte. Das bessere Überleben der D18S16-MSI-Tumoren war im Sinne des besseren Überleben der RER-Tumoren zu deuten. Es war zwischen D18S61-MSI, welches lediglich die Mikrosatelliteninstabilität für D18S61 beschreibt, und dem RER-Phänotyp, bei dem ein Defekt des mismatch-repair-Systems vorliegt und definitionsgemäß mind. 30 % von 5 international für kolorektale Karzinome genau definierten Mikrosatellitenmarkern (Konsensus-Panel) instabil sind, zu unterscheiden. In der vorliegenden Studie zählten 5 der 8 Tumoren, die MSI für D18S61 aufweisen, zum RER-Phänotyp, was sich in gutem Überleben widerspiegelte.

4.2 Immunhistochemie bei Papillenkarcinomen

4.2.1 p53-Proteinexpression bei Papillenkarcinomen

Tabelle 4.2. zeigt in einer Übersicht die Ergebnisse der bisherigen Veröffentlichungen zur immunhistochemischen p53-Proteinexpression, die im Folgenden mit den Ergebnissen der aktuellen Studie diskutiert werden sollen.

Literatur (Autor, Jahr)	n	Kriterien für p53- Überexpression	Ergebnis für Papillenkarcinome: immunhistochemische p53- Überexpression [% der Fälle] und Kommentare zu den Ergebnissen
Younes, 1995	17 AVC 5 Adenome 4 No AV	Pos. Zellen (kein Cut-off)	94 % AVC 40 % Adenome 0 % No AV
Dorandeu, 1997	45 AVC	Pos. Zellen (kein Cut-off)	49 %
Zhao, 1999	37 AVC	> 10 % der Zellen	46 %
Park, 2000	52 AVC de novo 42 AVC ex Ad	>10% der Nuklei	32 % AVC Stadium I/II 53 % AVC Stadium III/IV 14 % Ca-assoziiertes Adenom 0 % bei Normalgewebe → p53-Überexpression in AVC de novo mit schlechterer Prognose
Takashima, 2000	146 AVC gesamt 85 AVC de novo 61 AVC ex Ad 9 Adenome	>10% der Zellen	59 % AVC gesamt 92 % AVC Stadium I 56 % AVC Stadium II - IV 56 % AVC de novo 62 % AVC ex Ad 36 % Ca-assoziiertes Adenom 0 % in reinen Adenomen → p53-Akkumulation spät in der Karzinogenese!
Svrcek, 2003	14 AVC	>10% der Zellen	36%
Zhou, 2004	55 AVC	>10 % der Zellen	p53-Expression kein signifikanter Faktor im Überleben
Santini, 2005	39 AVC	>20% der Nuklei	38%
Su, 2008	36 AVC 17 Adenome	>10 der Nuklei	42 % AVC 18 % Adenome
Sung, 2009	67 AVC u.a.	>5% der Nuklei	62 %
Aktuelle Studie	134 AVC gesamt 63 AVC de novo 71 AVC ex Ad	>10 % der Zellen	38 % AVC gesamt 32 % AVC de novo 44 % AVC ex Ad

Tabelle 4.2: Veröffentlichungen zur immunhistochemischen p53-Proteinexpression in Ampulla-Vateri-Karzinomen 1995 bis 2009 (No AV=Normalgewebe Ampulla Vateri; AVC=Ampulla-Vateri-Karzinome)

In der vorliegenden Studie waren 38 % aller Karzinome p53-positiv. In der Literatur variierte die Zahl der p53-positiven Papilla-Vateri-Karzinome zwischen 32 % und 62 % [Takashima, 2000], [Zhao, 1999], [Park, 2000], [Svrcek, 2003], [Dorandeu, 1997], [Su, 2008], [Sung, 2009], [Santini, 2005]. Bei Younes et al. waren 94 % p53-positiv Karzinome, wobei jegliche Anfärbung als positiv gewertet wurde [Younes, 1995]. Bei den meisten anderen

Arbeitsgruppen - wie auch in dieser Studie – wurde für p53-Positivität ein Cut-off von mindestens 10 % der Tumorzellen berücksichtigt. Unterscheidet man de-novo-Ca und Ca-ex-Ad, so lagen die Ergebnisse dieser Studie mit 32 % bzw. 44 % niedriger als bereits publizierte Daten mit 56 % bzw. 62 % [Takashima, 2000].

Übereinstimmend zeigten die oben genannten Studien, dass die p53-Expression im Rahmen der Karzinogenese ansteigt: Bei Normalgewebe oder reinen Adenomen zeigte sich keine p53-Expression, bei Karzinom-assoziierten Adenomen 14 – 36 % und 32 – 62 % bei Karzinomen [Takashima, 2000], [Park, 2000]. Bezüglich der p53-Überexpression innerhalb der Karzinomgruppe waren die Aussagen widersprüchlich: Die vorliegende Arbeit bestätigte andere Studien, dass die p53-Expression nicht korreliert mit histologischem Differenzierungsgrad, Tumorentität (de-novo Ca bzw. Ca-ex-Ad) [Park, 2000], histologischem Subtyp und Tumorstadium [Zhao, 1999]. Park et al. dagegen fanden eine positive Korrelation zwischen p53-Überexpression und gruppiertem Tumorstadium im Sinne einer Steigerung der p53-Expression bei höherem Stadium (Stadium I/II versus III/IV: 32 % versus 63 %, $p=0,05$) [Park, 2000]. Dagegen zeigte sich in der Studie von Takashima et al. bei fortgeschrittenem UICC-Stadium ein Abfall der p53-Expression (p53-Überexpression Stadium I 92%; Stadium IV 40%). Takashima et al. mutmaßten, dass dies durch einen möglichen weiteren Allelverlust von 17p oder eine zusätzliche Mutation zustande kommt, die die Halbwertszeit von p53-Proteinen in höheren Tumorstadien wiederum verkürzt [Takashima, 2000]. Scarpa et al. schlussfolgerten aus ihren Daten, dass die zur Überexpression führende Mutation des *TP53*-Gens beim Adenom-Karzinom-Übergang stattfindet, während der Verlust des verbleibenden intakten Gens durch LOH bei fortgeschrittenen Karzinomen auftritt [Scarpa, 2000]. Der in dieser Studie belegte fehlende Zusammenhang zwischen p53-Überexpression und Allelstatus des *TP53*-Gens untermauert die These von Scarpa et al., dass die Überexpression durch Mutation zustande kommt und „zeitlich“ vor dem Allelverlust auftritt.

4.2.2 Prognostische Wertigkeit der p53-Expression bei Papillenkarcinomen

Was die prognostische Wertigkeit der immunhistochemischen p53-Proteinexpression angeht, blieben die Aussagen in der Literatur widersprüchlich: Während bei Park et al., 2000, in der Untersuchung der 5-Jahres-Überlebensrate die Patienten mit p53-negativen Tumoren etwas besser abschnitten als Patienten mit p53-positiven Tumoren, ermittelten Santini et al. eine statistisch signifikant längere Überlebenszeit für Patienten mit p53-positiven Tumoren.

Santini et al. führten dies auf den von ihnen belegten Zusammenhang der p53-Überexpression mit der Apoptose der Tumorzellen zurück. Demnach haben Patienten eine bessere Prognose, bei denen die Tumorzellen BAX exprimieren, ein Protein, das durch p53 aktiviert wird und die Zellen in die Apoptose führt. Die vorliegende Arbeit konnte zwar die Tendenz eines besseren Überlebens bei p53-Überexpression bestätigen, aber über den Zusammenhang mit der Apoptose keine Aussage treffen. Andere Autoren [Scarpa, 1993], [Takashima, 2000], [Park, 2000] haben nachgewiesen, dass eine pathologische p53-Protein-Überexpression ab dem Übergang vom Adenom zum Karzinom besteht, mutmaßlich durch Synthese eines mutierten und damit funktionseingeschränkten p53-Proteinen mit verlängerter Halbwertszeit.

4.2.3 SMAD4/DPC4-Expression bei Papillenkarcinomen

In Tabelle 4.3. sind die für die Ergebnis-Diskussion der aktuellen Studie relevanten Veröffentlichungen zu SMAD4-Expression bei Papillenkarcinomen aufgeführt.

Literatur (Autor, Jahr)	n (Papillenkarzinome)	Kriterien für Positivität/Negativität	Ergebnis für Papillenkarzinome DPC4/SMAD4-Negativität
Beghelli, 2002	89	Positiv , wenn diffuse zytoplasmatische o. nukleäre Anfärbung Negativ , wenn keine Färbung o. nur gelegentlich positive Zellen → 90% der positiven Fälle: zyt.+ nuk. Anfärbung. Nur 2 von 37 negativen Fällen zeigen gelegentlich pos. Zellen.	41 % Histologische Subtypen: - 38% intestinaler Typ - 50% pankreatobiliärer Typ - 20% Kolloidkarzinom
McCarthy 2003	140	Positiv , wenn nukleäre und zytoplasmatische Anfärbung oder nur nukleäre Anfärbung Negativ , wenn keine nukleäre Anfärbung → im Allgemeinen liegt nukleäre und zytoplasmatische Färbung gemeinsam vor	34 % Histologische Subtypen: - 36 % Intestinaler Typ - 37 % Pankreatobiliärer Typ - 0 % Kolloidkarzinome
Svrcek, 2003	14 (und 27 primäre Dünndarmkarzinome)	Positiv , wenn zytoplasmatische Anfärbung mit mind. fokaler nukleärer Anfärbung Negativ , wenn keine zytoplasmatische o. nukleäre Anfärbung Fokal positiv , wenn vereinzelte Zellen anfärben.	14 %
Moore, 2001	16	Positiv , wenn zytoplasmatische Anfärbung mit gelegentlicher nukleärer Anfärbung Negativ , wenn keine zytoplasmatische o. nukleäre Anfärbung Fokal positiv , wenn fokaler Verlust der Anfärbung	38 %
Aktuelle Studie	133	Positiv , wenn zytoplasmatisch und nukleäre Anfärbung oder nur nukleäre Anfärbung, auch wenn sehr schwach Negativ , wenn keine nukleäre Anfärbung	24 %

Tabelle 4.3: Veröffentlichungen zu SMAD4/DPC4-Expression bei Papillenkarzinomen 2001 bis 2003

Bei den Auswertekriterien der vier publizierten Studien bestanden kleine Differenzen: Bei Beghelli et al. war ein Tumor DPC4-negativ, wenn keine Färbung oder nur gelegentlich positive Zellen vorhanden sind, Svrcek et al. und Moore et al. werteten Fälle mit vereinzelt positiven Zellen als fokal positiv und McCarthy et al. werteten – analog in der vorliegenden Arbeit - nur Fälle als negativ, die keinerlei nukleäre Anfärbung aufwiesen. Moore und Beghelli, beide vom Institut für Pathologie der Universität Verona, griffen dabei auf denselben Pool von Gewebeproben zurück: Beghelli untersuchte 89 Proben aus den Jahren 1986 bis 2000, Moore 16 Proben aus den Jahren 1986 bis 1994.

Das Ergebnis der vorliegenden Studie bezüglich SMAD4-Negativität lag mit 24 % etwas unter den Ergebnissen der Studien mit größeren Fallzahlen (34 – 41 %) [Moore, 2001], [Beghelli, 2002], [McCarthy, 2003]. Möglicherweise trug die strengere Definition von SMAD4-Negativität in der vorliegenden Studie zu der geringeren Rate bei. Zudem bestätigte die aktuelle Arbeit, dass die beiden histologischen Haupttypen (intestinal und pankreatobiliär) gleich häufig SMAD4-Negativität aufweisen [McCarthy, 2003]. Keine der oben genannten Studien fand eine signifikante Korrelation zwischen klinisch-pathologischen Parametern und dem SMAD4-Status. Im Bezug auf das Gesamt-Überleben gaben die hier erhobenen Daten Hinweis dafür, dass Patienten mit SMAD4-positiven Tumoren länger überleben als Patienten mit SMAD4-negativen Tumoren (68 versus 43 Monate). Mit der Annahme, dass ein Verlust der SMAD4-Expression auch Verlust der tumorsuppressiven Wirkung bedeutet [Wilentz, 2000], [Beghelli, 2002], lässt sich ein Zusammenhang mit kürzerem Überleben sowie eine signifikante Korrelation der SMAD4-Negativität mit Nodalstatus und höherem pT-Stadium stimmig erklären. Genau diesbezüglich ergab die aktuelle Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen pN-Stadium ($p=0,007$) und SMAD4-Negativität. Auch die zunehmende SMAD4-Negativität bei zunehmendem pT-Stadium ($p=0,015$) ließ sich dahingehend deuten.

4.2.4 Prognostische Wertigkeit der SMAD4/DPC4-Expression bei Papillenkarcinomen

Dass DPC4/SMAD4 das mutmaßliche Gen ist, das bei 18q-Verlust betroffen ist und damit auch das in anderen Studien [Scarpa, 2000], [Iacono, 2007] ermittelte schlechtere Überleben erklärt, bezweifelten Beghelli et al., da deren Studie an 89 Papillenkarcinomen keine klinisch-pathologische Korrelation mit dem SMAD4-Status nachweisen konnte. Genausowenig war dies bei Bläker et al. in Bezug auf Dünndarmkarcinome der Fall [Bläker, 2002]. Die bei Moore et al. im Detail aufgeführten Daten zeigten, dass Tumore mit 18q-LOH nicht identisch sind mit Fällen, die auch immunhistochemisch DPC4-Negativität aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit zeigten 40 % der SMAD4-negativen Karcinome einen LOH für D18S61 im Vergleich zu nur 15 % bei SMAD4-Positivität. Offensichtlich ist der Verlust der Heterozygotie für D18S61 nicht oder nicht ausschließlich ursächlich für den Verlust der SMAD4-Expression. Bei Beghelli et al. ging ein SMAD4-Verlust nicht mit einem schlechteren klinischen Outcome einher, weswegen ein weiteres Tumorsuppressorgen auf Chromosom 18q vermutet wird. Die vorliegende Arbeit lieferte im Gegensatz dazu Daten, dass ein immunhistochemischer SMAD4-Proteinexpressionsverlust nicht nur mit höherem Tumorstadium korreliert, sondern auch mit schlechterem Überleben.

4.2.5 Maspin-Expression bei Papillen- und gastrointestinalen Karzinomen

Für Papillenkarcinome ist bisher wenig über die Maspinexpression bekannt. Die vorliegende Arbeit analysierte 83 Papillenkarcinomen in Relation zu klinisch-molekularen Parametern. Bei Anwendung der Kriterien von Bettstetter und Dietmaier [Bettstetter, 2005], die Tumore als zytoplasmatisch oder nukleär Maspin-positiv definieren, wenn mehr als 10% der Zellen mit mindestens mittlerer Färbeintensität Maspin exprimieren, ergaben sich in der vorliegenden Studie folgende statistisch signifikante Zusammenhänge: Intestinal bzw. intestinal-muzinöse Papillenkarcinome waren signifikant häufiger zytoplasmatisch oder nukleär Maspin-positiv als die anderen histologischen Untergruppen ($p=0,043$ bzw. $p=0,01$). G3-Adenokarcinome und der invasiv-papilläre Subtyp waren vor allem nukleär weniger häufig Maspin-positiv (57 % und 43 %) als der intestinale und pankreatobiliäre Subtyp (84 % und 71%). Dies weist auf einen möglichen Zusammenhang zwischen geringerem Differenzierungsgrad und Verlust der Maspinexpression hin. Auch der Rückgang der nukleären und zytoplasmatischen Maspin-Expression im Stadium pT4 (s. Tabelle 3.9 und 3.10) ($p=0,08$ und $0,086$) deutet auf ein aggressiveres Tumorstadium hin. Nach Zhang et al. (2005) führt intrazelluläre Maspin-Expression zu vermehrter Expression von proapoptotischen Protein BAX. Dadurch entsteht ein Wachstumsvorteil bei fehlender Maspinexpression. Bei duktalem Pankreas-Adenokarcinom findet man ähnliche Veränderungen der Maspinexpression im Rahmen der Tumorigenese wie bei Papillenkarcinomen mit einer deutlich höheren Maspinexpression bei gutem bis mittlerem Differenzierungsgrad im Vergleich zum G3-Adenokarcinom. In vitro aktiviert zudem wildtyp-p53 den Maspin-Promotor [Zou, 2000] und dies scheint auch in vivo zu gelten: Für verschiedene Tumorgewebe wurde ein inverser Zusammenhang zwischen dem Level mutierter p53-Proteine und der Maspinexpression nachgewiesen [Zhang, 2002]. In dieser Studie ließ sich dieser Zusammenhang allerdings nicht zeigen: Analog zu den Ergebnissen bei duktalem Pankreaskarcinom bestand kein Zusammenhang zwischen p53- und Maspinexpression [Ohike, 2003].

Die Arbeit von Blandamura et al. [Blandamura, 2007] ist bisher die einzige die u.a. immunhistochemisch die Maspinexpression bei Adenokarcinomen der Papilla Vateri ($n=23$) untersucht und zwischen einer nukleär-betonten Expression und nukleärer Expression in Prozent der Gesamtzellzahl unterscheidet. Dabei ergab sich eine inverse Korrelation zwischen nukleär-betonter Maspinexpression und p53-Expression. Die vorliegende Arbeit ($n=83$) lieferte keine Korrelation zwischen immunhistochemischer nukleärer Maspinexpression

(analog beurteilt) ($p=1,0$) oder nukleärer prozentualer Anfärbung ($p=0,99$) und p53-Expression. Die von Blandamura et al. gefundene statistische Tendenz zwischen pM- und pN-Status mit betont nukleärem Expressionsmuster konnte in dieser Arbeit ebensowenig nachgewiesen werden wie eine inverse Korrelation des pM- und pT-Stadium mit der prozentualen Maspinexpression ($p=0,51$). Die vorliegenden Daten weisen auf einen Bezug zwischen zytoplasmatischer Maspinexpression und niedrigem pT-Stadium hin.

Bettstetter et al. haben kolorektale Karzinome in Bezug auf Maspin-Status und zugrunde liegendem Entstehungsmechanismus (chromosomale Instabilität versus Mikrosatelliteninstabilität) untersucht [Bettstetter, 2005]. Ausgehend vom Maspin-negativen Normalgewebe wird im Rahmen der Karzinogenese Maspin v.a. zytoplasmatisch vermehrt exprimiert. Besonders die Invasionsfront und gering-differenzierte Karzinomareale wiesen eine intensive nukleäre Maspinexpression auf. Maspin-Aktivität scheint somit abhängig von seiner intrazellulären, d.h. nukleären oder zytoplasmatischen Lokalisation zu sein; Maspin muss an der Zellmembran liegen, um seine tumorsuppressive Wirkung zu entfalten. Die vermehrte nukleäre Konzentration in den aggressiveren Tumoranteilen deutet daraufhin hin, dass Maspin im Zellkern „gefangen“ ist und die tumorsuppressive Wirkung nicht entfalten kann [Sood 2002]. Ein weiteres wichtiges Ergebnis von Bettstetter et al. betrifft die unterschiedliche Maspin-Expression in Bezug auf die unterschiedlichen Pathways der Entstehung kolorektaler Karzinome: MSS-/MSI-L-Tumore exprimierten deutlich weniger Maspin als die MSI-H-Tumoren, was Bettstetter et al. auf Verlust der Heterozygotie oder auf epigenetische Promotor-Hypermethylierung zurückführten. In der vorliegenden Arbeit ergaben sich in Bezug auf den MSI-Status keine Zusammenhänge mit der Maspin-Expression, wobei eine definitive Aussage diesbezüglich bei geringer Fallzahl der MSI-high-Karzinome ($n=10$) nicht möglich war.

4.2.6 Prognostische Wertigkeit der Maspin-Expression bei Papillen- und gastrointestinalen Karzinomen

Maspin gilt als *Tumorsuppressor*-Gen bei Mamma- und Prostatakarzinomen und der *Verlust* der im Normalgewebe physiologischen Maspinexpression im Laufe der Karzinogenese geht mit einer größeren Tumoraggressivität einher [Zou, 1994], [Maass, 2002], [Zou, 2002]. Andererseits gibt es publizierte Daten, dass eine *erhöhte* Maspinexpression bei Mammakarzinomen mit schlechterer Prognose verbunden ist [Umekita, 2002] [Lee, 2006] oder dass die Prognose von der intrazellulären Lokalisation des Maspin abhängig ist [Mohsin, 2003]. Bei Geweben, die physiologischerweise kein Maspin exprimieren, ist eine

Maspinexpression im Rahmen der Tumorigenese mit besserer Prognose assoziiert, z.B. bei Plattenepithelkarzinomen im HNO-Bereich, nicht jedoch bei Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (s. Tabelle 4.4).

Autor, Jahr	Tumorart	Immunhistochemische Maspinexpression als Prognosefaktor
Mammakarzinome		
Mohsin, 2003	Invasiv duktales Mammakarzinom	Nukleäre Maspinexpression mit guten Prognosefaktoren assoziiert, zytoplasmatische Maspinexpression mit schlechten Prognosefaktoren assoziiert.
Maass, 2001	Invasiv-duktales Mammakarzinom	Starke Maspinexpression → signifikant weniger Lymphknotenmetastasen ($p < 0,01$)
Kim, 2003	Frühstadium Mammakarzinom	Maspinexpression nicht mit krankheitsfreiem oder allgemeinem Überleben assoziiert
Lee, 2006	Duktales Mammakarzinom	Maspinexpression mit schlechterer Prognose assoziiert.
Umekita, 2002	Duktales Mammakarzinom	Maspinexpression → kürzeres krankheitsfreies Überleben
HNO-Tumore		
Luo, 2009	Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle	Bei Maspinexpression signifikant längeres Überleben ($p = 0,014$)
Marioni, 2010	Nasopharyngeales Karzinom	Bei Maspinexpression Trend zu längerem krankheitsfreiem Überleben ($p = 0,08$)
Bronchialkarzinome		
Bircan, 2010	Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom der Lunge	Maspinexpression kein signifikanter prognostischer Faktor
Hirai, 2005	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	Zytoplasmatische Maspinexpression → kürzeres Gesamtüberleben
Kolonkarzinome		
Fung, 2010	Kolonkarzinom, Stadium C = III?	Maspinexpression kein signifikanter prognostischer Faktor
Dietmaier, 2006	Kolonkarzinom, Stadium III	Nukleäre Maspinexpression → kürzeres Gesamtüberleben ($p = 0,018$)
Sonstige		
Bauerschlag, 2010	Ovarialkarzinome	Maspinexpression → längeres Überleben
Eigene Daten	Papillenkarzinome	Bei Maspinexpression tendenziell längeres Überleben

Tabelle 4.4: Maspinexpression als Prognosefaktor; Farbkode: Grün hinterlegt: bessere Prognose bei Maspinexpression, gelb hinterlegt: keine Auswirkung der Maspinexpression auf Prognose, rot hinterlegt: schlechtere Prognose bei Maspinexpression.

Die prognostische Wertigkeit von Maspin-Expression in Bezug auf Papillenkarzinome ist bisher nicht untersucht worden. In der aktuellen Studie ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Maspinexpression und die Überlebenszeiten in der Kaplan-

Meier-Analyse. Allerdings zeigte sich eine Tendenz, dass Patienten mit Maspin-exprimierendem Tumor länger überleben als Patienten mit Maspin-negativem Karzinom unabhängig von zytoplasmatischer oder nukleärer Expression. Für gastrointestinale Karzinome gibt es in der Literatur wenige Daten zur Bedeutung von Maspin auf die Prognose. In einer Studie von Dietmaier et al. an Kolonkarzinomen im Stadium III (n=172) war die nukleäre Maspinexpression ein negativer prognostischer Marker. Möglicherweise kann Maspin seine tumorsuppressive Wirkung nicht im Zellkern ausüben und wirkt dort evtl. sogar als zusätzliches Onkogen. Die vorliegende Studie konnte mit ihren Ergebnissen dieses Konzept weder unterstützen noch widerlegen. Zur Klärung der prognostischen Wirkung von Maspinexpression bei Papillenkarzinomen sind weitere Studien nötig. Interessant ist der von Dietmaier gefundene Zusammenhang zwischen Maspinexpression bei Kolonkarzinomen Stadium III und dem Benefit einer 5-FU-basierten Chemotherapie. Nur Patienten mit nukleär Maspin-exprimierendem Tumor profitierten von einer solchen Chemotherapie. Somit kann die immunhistochemische Charakterisierung von Tumoren nicht nur helfen, zugrundeliegende Entstehungsmechanismen der Karzinogenese aufzuklären, sondern auch Daten liefern für eine klinisch relevante Patienten-Stratifikation mit konsekutiver, individualisierter Therapie-Adaptation.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine große Anzahl von Papillenkarcinomen (n=164) bezüglich des Allelstatus der Chromosomen 17p und 18q (Mikrosatellitenmarker *TP53* und D18S61) sowie bezüglich immunhistochemischer Proteinexpression von p53, SMAD4 und Maspin untersucht. Die Ergebnisse wurden in Bezug zu klinisch-pathologischen Variablen und zum Gesamtüberleben der Patienten gesetzt.

Für den *TP53*-Locus ergab sich eine LOH-Rate von 54 % und für den D18S61-Locus eine LOH-Rate von 35 %. Tumorentität (de-novo-Ca oder Ca-ex-Ad) und ausschließliche Berücksichtigung der MSI-L- und MSS-Tumoren erbrachte keine statistisch relevanten Unterschiede. Bis auf Mikrosatelliteninstabilität am D18S61-Locus, die mit längerem Gesamtüberleben einherging, waren die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse am *TP53*- und D18S61-Locus ohne Relevanz für die Überlebenszeiten der Patienten. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten LOH-Raten waren vergleichbar mit bereits publizierten Daten, wo z.T. andere oder mehrere verschiedene Mikrosatellitenprimer für die jeweiligen Chromosomenarme untersucht wurden. Die Verwendung unterschiedlicher Mikrosatellitenmarker erklärt möglicherweise, dass diese Studie nicht den in anderen Publikationen postulierten Überlebensnachteil bei 17p- und 18q-LOH bestätigen konnte.

Das auf Chromosom 17p kodierte Tumorsuppressorgen p53 wurde in 38 % der untersuchten Papillenkarcinome immunhistochemisch nachgewiesen und ist tendenziell mit längerem Gesamtüberleben ($p=0,12$) assoziiert. Die vorliegende Arbeit bestätigt die diesbezüglich vorhandenen Publikationen, dass eine p53-Überexpression nicht mit klinisch-pathologischen Variablen wie Differenzierungsgrad, histologischer Subtyp und Tumorstadium korreliert. Auch mit dem im ersten Teil der Arbeit ermittelten *TP53*-Mikrosatellitenstatus hat sich kein signifikanter Zusammenhang ergeben. Die p53-Überexpression ist offensichtlich an andere Mechanismen als einen Verlust oder Retention der Heterozygotie gekoppelt. Die in anderen Studien nachgewiesene schrittweise Akkumulation von alterierten p53-Proteinen im Rahmen der Karzinogenese, deutet darauf hin, dass die alterierten p53-Proteine in Rahmen der karzinogenetischen Veränderungen schon vor der Entstehung des Karzinoms akkumulieren. Eine tumorsuppressive Wirkung von p53 in der Karzinogenese von Papillenkarcinomen untermauerten die Daten dieser Studie trotz tendenziell längerem Überleben bei p53-Expression nicht, v.a. da sich keine Zusammenhänge zu klinisch-pathologischen Variablen ergeben haben.

Hingegen ließ sich eine tumorsuppressive Wirkung von SMAD4 durch die Daten dieser Arbeit belegen: Expressionsverlust des SMAD4-Proteins (24% der Karzinome) ging signifikant mit positivem Nodalstatus ($p=0,007$) und zunehmendem pT-Stadium ($p=0,015$) einher sowie tendenziell schlechterem Überleben ($p=0,11$). Mit den hier gefundenen Korrelationen ist die vorliegende Studie die erste, die derartige Zusammenhänge nachweisen konnte. Verlust der Heterozygotie des Mikrosatellitenmarker D18S61 am Chromosom 18q – Lokalisation des SMAD4-Gens – korrelierte schwach mit SMAD4-Negativität ($p=0,13$): So schien LOH des Chromosoms 18q neben anderen Mechanismen wie Mutationen ursächlich für den SMAD4-Expressionsverlust zu sein.

Die Maspin-Proteinexpression bei Papillenkarcinomen wurde in dieser Studie erstmals an einem großen Kollektiv ($n=83$) mit Überlebensdaten evaluiert. Maspin, ein weiteres auf Chromosom 18q gelegenes Tumorsuppressorgen, wurde in dieser Studie bezüglich subzellulärer Lokalisation, prozentualer Anfärbung und Färbeintensität untersucht. Es ergaben sich Hinweise für eine Tumorsuppressorfunktion des Maspin bei Papillenkarcinomen: Bei deutlicher nukleärer oder zytoplasmatischer Maspinexpression ($>80\%$) der Zellen zeigte sich signifikant bzw. tendenziell längeres Überleben ($p=0,04$ und $p=0,08$). Auch in Bezug auf klinisch-pathologische Variablen zeigte sich die Tumorsuppressorfunktion des Maspin: Ausgeprägte prozentuale zytoplasmatische Maspin-Expression ($>80\%$) fiel signifikant von $>70\%$ Expression in den niedrigen UICC-Stadien auf nur 20% in den UICC-Stadien III und IV ($p=0,005$) ab. Auch die Unterscheidung der histologischer Subtypen zeigte signifikante Unterschiede: Nukleäre Maspinpositivität war signifikant häufiger bei intestinalem, intestinal-muzinösen und pankreatobiliären Subtyp als bei G3-Adenokarcinom und invasiv-papillärem Subtyp. Die Unterscheidung nach subzellulärer Lokalisation erbrachte jeweils nur marginale Unterschiede in den statistischen Berechnungen, so dass eine Funktionseinschränkung je nach Lokalisation, wie von einigen Autoren postuliert, durch diese Daten bei Papillenkarcinomen nicht bestätigt werden konnte.

Zur Klärung der Zusammenhänge zwischen Chromosomenstatus und immunhistochemischer Expression von Tumorsuppressorgen bei Papillenkarcinomen sind weitere Studien nötig. Insbesondere Studien über die Auswirkung von bestimmten Chemotherapien auf die weitere Prognose abhängig von molekularpathologischen Eigenschaften, z.B. die Wirksamkeit von 5-

FU-basierten Chemotherapien bei nukleär-Maspin-positiven Tumoren analog der Kolonkarzinome Stadium III, wären wünschenswert.

6. Literaturverzeichnis

- Abraham S, Zhang W: Maspin functions as tumor suppressor by increasing cell adhesion to extracellular matrix in prostate tumor cells, *J Urol*. 2003 Mar.
- Achille A, Biasi MO, Zamboni G, Bogina G, Iacono C, Talamini G, Capella G, Scarpa A: Cancers of the papilla of Vater: mutator phenotype is associated with good prognosis. *Clin Cancer Res*. 1997 Oct;3(10):1841-7.
- Akkiprik M, Ataizi-Celikel C, Düşünceli F, Sönmez O, Güllüodlu BM, Sav A, Ozer A: Clinical significance of p53, K-ras and DCC gene alterations in the stage I-II colorectal cancers. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2007 Mar;16(1):11-7
- Albores-Saavedra J, Henson DE, Klimstra DS. Tumors of the Gallbladder, Extrahepatic Bile Ducts, and Ampulla of Vater. *Atlas of Tumor Pathology*. Washington, D.C., 2000.
- Baczako K, Buchler M, Beger HG, Kirkpatrick CJ, Haferkamp O: Morphogenesis and possible precursor lesions of invasive carcinoma of the papilla of Vater: epithelial dysplasia and adenoma. *Hum Pathol*. 1985 Mar;16(3):305-10
- Bauerschlag DO, Habermann M, Weimer J, Meinhold-Heerlein I, Hilpert F, Weigel M, Bauer M, Mundhenke C, Jonat W, Maass N, Schem C: Heterogeneous expression of serine protease inhibitor maspin in ovarian cancer. *Anticancer Res*. 2010 Jul;30(7):2739-44.
- Beghelli S, Orlandini S, Moore PS, Talamini G, Capelli P, Zamboni G, Falconi M, Scarpa A: Ampulla of Vater cancers: T-stage and histological subtype but not Dpc4 expression predict prognosis. *Virchows Arch*. 2002 Jul;441(1):19-24. Epub 2002 Apr 12.
- Bendardaf R. Elzagheid A.: E-cadherin, CD44s and CD44v6 correlate with tumour differentiation in colorectal cancer, *Oncol Rep*, 2005
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemie*, 5. Auflage, 2003, Spektrum Akademischer Verlag, S. 166 f.
- Bettstetter M, Woenckhaus M, Wild PJ, Rümmele P, Blaszyk H, Hartmann A, Hofstädter F, Dietmaier W: Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer. *J Pathol*. 2005 Apr;205(5):606-14.
- Bircan A, Bircan S, Kapucuoglu N, Songur N, Ozturk O, Akkaya A: Maspin, VEGF and p53 expression in small biopsies of primary advanced lung cancer and relationship with clinicopathologic parameters. *Pathol Oncol Res*. 2010 Dec;16(4):553-61.
- Bläker H, Graf M, Rieker RJ, Otto HF: Comparison of losses of heterozygosity and replication errors in primary colorectal carcinomas and corresponding liver metastases. *J Pathol*. 1999 Jul;188(3):258-62.

- Bläker H, von Herbay A, Penzel R, Gross S, Otto HF: Genetics of adenocarcinomas of the small intestine: frequent deletions at chromosome 18q and mutations of the SMAD4 gene. *Oncogene*. 2002 Jan 3;21(1):158-64.
- Blandamura S, D'Alessandro E, Guzzardo V, Giacomelli L, Moschino P, Parenti A, Ninfo V: Maspin expression in adenocarcinoma of the ampulla of Vater: relation with clinicopathological parameters and apoptosis. *Anticancer Res*. 2007 Mar-Apr;27(2):1059-65.
- Böcker W, Denk H, Heitz P: *Pathologie*; Urban&Fischer; 2001.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Nov 15;58(22):5248-57. Review.
- Boltze C.: Loss of maspin is a helpful prognosticator in colorectal cancer: a tissue microarray analysis; *Pathol Res Pract*. 2005
- Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J: Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res*. 1997 Nov 1;57(21):4749-56
- Dorandeu A, Raoul JL, Siriser F, Leclercq-Rioux N, Gosselin M, Martin ED, Ramée MP, Launois B: Carcinoma of the ampulla of Vater: prognostic factors after curative surgery: a series of 45 cases. *Gut*. 1997 Mar;40(3):350-5
- Fearon ER, Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67. Review.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R: The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):1027-38.
- Fischer HP, Zhou H: *Pathologie der Papilla Vateri*, aus: W. Doerr, E. Uehlinger: *Spezielle pathologische Anatomie, Band 10, Pathologie der Leber und Gallenwege*, 2. Auflage, Springer, 2000
- Fischer HP, Zhou H: Pathogenese und Histopathologie von Adenomen und Karzinomen der Papilla Vateri. *Pathologie* 2003; 24: 196-203
- Fujii H, Ajioka Y, Kazami S, Takagaki T, Gong Zhu X, Hirose S, Watanabe H, Shirai T: Loss of heterozygosity in the clonal evolution of flat colorectal neoplasms. *J Pathol*. 2002 Jul;197(3):298-306.
- Fung CL, Chan C, Jankova L, Dent OF, Robertson G, Molloy M, Bokey L, Chapuis PH, Lin BP, Clarke SJ: Clinicopathological correlates and prognostic significance of maspin expression in 450 patients after potentially curative resection of node-positive colonic cancer. *Histopathology*. 2010 Feb;56(3):319-30.

- Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR: Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res.* 2003 Apr 1;63(7):1608-14.
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE: DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science.* 1996 Jan 19;271(5247):350-3.
- Hirai K, Koizumi K, Haraguchi S, Hirata T, Mikami I, Fukushima M, Yamagishi S, Kawashima T, Okada D, Shimizu K, Kawamoto M: Prognostic significance of the tumor suppressor gene maspin in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2005 Jan;79(1):248-53.
- Hojo T, Akiyama Y, Nagasaki K, Maruyama K, Kikuchi K, Ikeda T, Kitajima M, Yamaguchi K: Association of maspin expression with the malignancy grade and tumor vascularization in breast cancer tissues. *Cancer Lett.* 2001 Sep 28;171(1):103-10.
- Iacono C, Verlato G, Zamboni G, Scarpa A, Montresor E, Capelli P, Bortolasi L, Serio G: Adenocarcinoma of the ampulla of Vater: T-stage, chromosome 17p allelic loss, and extended pancreaticoduodenectomy are relevant prognostic factors. *J Gastrointest Surg.* 2007 May;11(5):578-88.
- Imai Y, Tsurutani N, Oda H, Inoue T, Ishikawa T: Genetic instability and mutation of the TGF-beta-receptor-II gene in ampullary carcinomas. *Int J Cancer.* 1998 May 4;76(3):407-11.
- Kaiser A, Jurowich C, Schönekeas H, Gebhardt C, Wunsch PH: The Adenoma-Carcinoma Sequence Applies to Epithelial Tumours of the Papilla of Vater; *Z Gastroenterologie* 2002; 40:913-920
- Kim DH, Yoon DS, Dooley WC, Nam ES, Ryu JW, Jung KC, Park HR, Sohn JH, Shin HS, Park YE: Association of maspin expression with the high histological grade and lymphocyte-rich stroma in early-stage breast cancer. *Histopathology.* 2003 Jan;42(1):37-42.
- Kim SG, Chan AO, Wu TT, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A: Epigenetic and genetic alterations in duodenal carcinomas are distinct from biliary and ampullary carcinomas. *Gastroenterology.* 2003 May;124(5):1300-10
- Kim J, Jang KT, Kim KH, Park JW, Chang BJ, Lee KH, Lee JK, Heo JS, Choi SH, Choi DW, Rhee JC, Lee KT: Aberrant maspin expression is involved in early carcinogenesis of gallbladder cancer. *Tumour Biol.* 2010 Oct;31(5):471-6.
- Kimura W, Futakawa N, Zhao B: Neoplastic diseases of the papilla of Vater. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2004;11(4):223-31. Review
- Köpf-Maier P: Wolf-Heidegger's Atlas of Human Anatomy, Karger 2000, S. 187

- Kools P, Van Imschoot G, van Roy F: Characterization of three novel human cadherin genes (CDH7, CDH19, and CDH20) clustered on chromosome 18q22-q23 and with high homology to chicken cadherin-7. *Genomics*. 2000 Sep 15;68(3):283-95.
- Kozuka S, Tsubone M, Yamaguchi A, Hachisuka K: Adenomatous residue in cancerous papilla of Vater. *Gut*. 1981 Dec;22(12):1031-4]
- Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.
- Lee MJ, Suh CH, Li ZH: Clinicopathological significance of maspin expression in breast cancer. *J Korean Med Sci*. 2006 Apr;21(2):309-14
- Lee JH, Lee KG, Ryou H, Jun YJ, Paik SS, Park HK, Lee KS: Significance analysis of histologic type and perineural invasion as prognostic factors after curative resection of ampulla of Vater carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2010 May-Jun;57(99-100):646-52
- Liu T, Feng XH: Regulation of TGF-beta signalling by protein phosphatases. *Biochem J*. 2010 Sep 1;430(2):191-8. Review.
- Luo J, Zhou L, Zheng GJ, Ji T, Zhong LP: Expression of murray serine proteinase inhibitor in oral squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2009 Oct;44(10):606-10.
- Maass N, Hojo T, Ueding M, Lüttges J, Klöppel G, Jonat W, Nagasaki K: Expression of the tumor suppressor gene Maspin in human pancreatic cancers. *Clin Cancer Res*. 2001 Apr;7(4):812-7; A
- Maass N, Hojo T, Rösel F, Ikeda T, Jonat W, Nagasaki K: Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clin Biochem*. 2001 Jun;34(4):303-7; B
- Maass N, Teffner M, Rösel F, Pawaresch R, Jonat W, Nagasaki K, Rudolph P: Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast. *J Pathol*. 2001 Oct;195(3):321-6; C
- Maass N, Nagasaki K, Ziebart M, Mundhenke C, Jonat W: Expression and regulation of tumor suppressor gene maspin in breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2002 Oct;3(4):281-7.
- Marioni G, Koussis H, Scola A, Maruzzo M, Giacomelli L, Karahontziti P, de Filippis C, Staffieri A, Blandamura S: Expression of MASPIN and angiogenin in nasopharyngeal carcinoma: novel preliminary clinico-pathological evidence. *Acta Otolaryngol*. 2010 Aug;130(8):952-8.
- Martínez-López E, Abad A, Font A, Monzó M, Ojanguren I, Pifarré A, Sánchez JJ, Martín C, Rosell R: Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1998 Jun;114(6):1180-7.
- Massagué J, Blain S, Lo R: TGFβ Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders, Review, *Cell*, Vol 103, Oct 13, 2000

- McCarthy DM, Hruban RH, Argani P, Howe JR, Conlon KC, Brennan MF, Zahurak M, Wilentz RE, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Klimstra DS: Role of the DPC4 tumor suppressor gene in adenocarcinoma of the ampulla of Vater: analysis of 140 cases. *Mod Pathol.* 2003 Mar;16(3):272-8.
- Mehlen P, Fearon E: Role of the Dependence Receptor DCC in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 22, Aug. 15, 2004
- Mohsin SK, Zhang M, Clark GM, Craig Allred D: Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors. *J Pathol.* 2003 Apr;199(4):432-5
- Moore PS, Orlandini S, Zamboni G, Capelli P, Rigaud G, Falconi M, Bassi C, Lemoine NR, Scarpa A: Pancreatic tumours: molecular pathways implicated in ductal cancer are involved in ampullary but not in exocrine nonductal or endocrine tumorigenesis. *Br J Cancer.* 2001 Jan;84(2):253-62.
- Moore PS, Missiaglia E, Beghelli S, Bragantini E, Mina MM, Zamboni G, Falconi M, Scarpa A: Allelotype of ampulla of Vater cancer: highly frequent involvement of chromosome 11. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004 Jun;130(6):339-45.
- Mueller JD, Haegle N, Keller G, Mueller E, Saretzky G, Bethke B, Stolte M, Höfler H: Loss of heterozygosity and microsatellite instability in de novo versus ex-adenoma carcinomas of the colorectum. *Am J Pathol.* 1998 Dec;153(6):1977-84
- Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, Ezumi K, Terayama M, Hemmi H, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Monden M: A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2007 Jun 15;95(8):652-62.
- Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Herfarth K, Gagliardi G, Swanson PE, Birnbaum EH, Read TE, Fleshman JW, Kodner IJ, Moley JF.: Confirmation that chromosome 18q allelic loss in colon cancer is a prognostic indicator. *J Clin Oncol.* 1998 Feb;16(2):427-33.
- Ohike N, Maass N, Mundhenke C, Biallek M, Zhang M, Jonat W, Lüttges J, Morohoshi T, Klöppel G, Nagasaki K: Clinicopathological significance and molecular regulation of maspin expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Lett.* 2003 Sep 25;199(2):193-200.
- Park S, Kim SW, Kim SH, Lee BL, Kim WH: Loss of heterozygosity in ampulla of Vater neoplasms during adenoma-carcinoma sequence. *Anticancer Res.* 2003 May-Jun;23(3C):2955-9
- Park S, Kim SW, Kim SH, Darwish NS, Kim WH: Lack of microsatellite instability in neoplasms of ampulla of Vater. *Pathol Int.* 2003 Oct;53(10):667-70.
- Peltomäki P, Vasen HF: Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 1997 Oct;113(4):1146-58.

- Pemberton PA, Tipton AR: Maspin is an intracellular serpin that partitions into secretory vesicles and is present at the cell surface, *J Histochem Cytochem.* 1997 Dec
- Popat S, Houlston RS: A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer.* 2005 Sep;41(14):2060-70. Review.
- Rosivatz E, Becker I, Bamba M, Schott C, Diebold J, Mayr D, Höfler H, Becker KF: Neoreexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *Int J Cancer.* 2004 Sep 20;111(5):711-9.
- Rüschhoff J, Dietmaier W, Bocker T, Wallinger S, Kullmann A, Beham F, Hofstädter F: Molekulare Krebsdispositionsdiagnostik am Beispiel des kolorektalen Karzinoms. *Pathologe* 1998 19:269-278
- Santini D, Tonini G, Vecchio FM, Borzomati D, Vincenzi B, Valeri S, Antinori A, Castri F, Coppola R, Magistrelli P, Nuzzo G, Picciocchi A: Prognostic value of Bax, Bcl-2, p53, and TUNEL staining in patients with radically resected ampullary carcinoma. *J Clin Pathol.* 2005 Feb;58(2):159-65.
- Sarli L, Bottarelli L, Bader G, Iusco D, Pizzi S, Costi R, D'Adda T, Bertolani M, Roncoroni L, Bordi C: Association between recurrence of sporadic colorectal cancer, high level of microsatellite instability, and loss of heterozygosity at chromosome 18q. *Dis Colon Rectum.* 2004 Sep;47(9):1467-82. Epub 2004 Aug 12.
- Scarpa A, Capelli P, Zamboni G, Oda T, Mukai K, Bonetti F, Martignoni G, Iacono C, Serio G, Hirohashi S: Neoplasia of the ampulla of Vater. Ki-ras and p53 mutations. *Am J Pathol.* 1993 Apr;142(4):1163-72
- Scarpa A, Di Pace C, Talamini G, Falconi M, Lemoine NR, Iacono C, Achille A, Baron A, Zamboni G . Cancer of the ampulla of Vater: chromosome 17p allelic loss is associated with poor prognosis. *Gut.* 2000 Jun;46(6):842-8.
- Sheng S, Carey J, Seftor EA, Dias L, Hendrix MJ, Sager R: Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15;93(21):11669-74
- Sood AK, Fletcher MS, Gruman LM, Coffin JE, Jabbari S, Khalkhali-Ellis Z, Arbour N, Seftor EA, Hendrix MJ: The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2002 Sep;8(9):2924-32
- Stolte M, Pscherer C: Adenoma-carcinoma sequence in the papilla of Vater. *Scand J Gastroenterol.* 1996 Apr;31(4):376-82
- Storojeva I, Boulay JL, Ballabeni P, Buess M, Terracciano L, Laffer U, Mild G, Herrmann R, Rochlitz C: Prognostic and predictive relevance of DNAM-1, SOCS6 and CADH-7 genes on chromosome 18q in colorectal cancer. *Oncology.* 2005;68(2-3):246-55.
- Su CH, Shyr YM, Lui WY, P'eng FK: Factors affecting morbidity, mortality and survival after pancreaticoduodenectomy for carcinoma of the ampulla of Vater. *Hepatogastroenterology.* 1999 May-Jun;46(27):1973-9.

- Sung JY, Kim GY, Lim SJ, Park YK, Kim YW: Expression of the GLUT1 glucose transporter and p53 in carcinomas of the pancreatobiliary tract. *Pathol Res Pract.* 2010 Jan 15;206(1):24-9. Epub 2009 Oct 12.
- Suto T, Habano W, Sugai T, Uesugi N, Kanno S, Saito K, Nakamura S: Infrequent microsatellite instability in biliary tract cancer. *J Surg Oncol.* 2001 Feb;76(2):121-6.
- Svrcek M, Jourdan F, Sebbagh N, Couvelard A, Chatelain D, Mourra N, Olschwang S, Wendum D, Fléjou JF: Immunohistochemical analysis of adenocarcinoma of the small intestine: a tissue microarray study. *J Clin Pathol.* 2003 Dec;56(12):898-903.
- Swerdlow H, Gesteland R: Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Research.* 1990; 18(6): 1415-1419
- Takashima M, Ueki T, Nagai E, Yao T, Yamaguchi K, Tanaka M, Tsuneyoshi M: Carcinoma of the ampulla of Vater associated with or without adenoma: a clinicopathologic analysis of 198 cases with reference to p53 and Ki-67 immunohistochemical expressions. *Mod Pathol.* 2000 Dec;13(12):1300-7
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993 May 7;260(5109):816-9
- Turunc T, Bal N, Dirim A, Kuzgunbay B, Gul U, Ozkardes H: Maspin expression in renal cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic parameters. *Urology.* 2010 Sep;76(3):765.e8-13.
- Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, Yoshida H: Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients. *Int J Cancer.* 2002 Aug 1;100(4):452-5.
- Wilentz RE, Su GH, Dai JL, Sparks AB, Argani P, Sohn TA, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH: Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas: a new marker of DPC4 inactivation. *Am J Pathol.* 2000 Jan;156(1):37-43.
- Wittekind C, Tannapfel A: Adenoma of the papilla and ampulla--pre-malignant lesions? *Langenbecks Arch Surg.* 2001 Apr;386(3):172-5
- Wittekind C, Meyer HJ: TNM-Klassifikation maligner Tumoren; Springer Verlag 7. Auflage 2010
- Woodford-Richens KL, Rowan AJ, Gorman P, Halford S, Bicknell DC, Wasan HS, Roylance RR, Bodmer WF, Tomlinson IP: SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 14;98(17):9719-23. Epub 2001 Jul 31.
- Wu JT, Kakar S, Nelson RL, Mihalov ML, Hayward B, Gilbert PB, Ghosh L: Prognostic significance of DCC and p27Kip1 in colorectal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005 Mar;13(1):45-54.

- Yamaguchi K, Enjoji M: Carcinoma of the ampulla of Vater. A clinicopathologic study and pathologic staging of 109 cases of carcinoma and 5 cases of adenoma. *Cancer*. 1987 Feb 1;59(3):506-15.
- Yashiro M, Carethers JM, Laghi L, Saito K, Slezak P, Jaramillo E, Rubio C, Koizumi K, Hirakawa K, Boland CR: Genetic pathways in the evolution of morphologically distinct colorectal neoplasms. *Cancer Res*. 2001 Mar 15;61(6):2676-83.
- Younes M, Riley S, Genta RM, Mosharaf M, Mody DR: p53 protein accumulation in tumors of the ampulla of Vater. *Cancer*. 1995 Oct 1;76(7):1150-4.
- Zhang M, Volpert O, Shi YH, Bouck N: Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med*. 2000 Feb;6(2):196-9.
- Zhang W, Shi HY, Zhang M: Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins. *BMC Cancer*. 2005 May 20;5:50
- Zhang W, Zhang M: Tissue microarray analysis of maspin expression and its reverse correlation with mutant p53 in various tumors. *Int J Oncol*. 2002 Jun;20(6):1145-50.
- Zhao B, Kimura W, Futakawa N, Muto T, Kubota K, Harihara Y, Takayama T, Makuuchi M: p53 and p21/Waf1 protein expression and K-ras codon 12 mutation in carcinoma of the papilla of Vater. *Am J Gastroenterol*. 1999 Aug;94(8):2128-34
- Zhou H, Schaefer N, Wolff M, Fischer HP. Carcinoma of the ampulla of Vater: comparative histologic/immunohistochemical classification and follow-up. *Am J Surg Pathol*. 2004 Jul;28(7):875-82.
- Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S, Rafidi K, Seftor E, Sager R: Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science*. 1994 Jan 28;263(5146):526-9
- Zou Z, Gao C, Nagaich AK, Connell T, Saito S, Moul JW, Seth P, Appella E, Srivastava S. p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin. *J Biol Chem*. 2000 Mar 3;275(9):6051-4
- Zou Z, Zhang W, Young D, Gleave MG, Rennie P, Connell T, Connelly R, Moul J, Srivastava S, Sesterhenn I: Maspin expression profile in human prostate cancer (CaP) and in vitro induction of Maspin expression by androgen ablation. *Clin Cancer Res*. 2002 May;8(5):1172-7

7. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Arndt Hartmann, der mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat und die Betreuung dieser Arbeit übernahm.

Außerdem gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie, geleitet von Prof. Hofstädter, insbesondere den MTAs Doris Gaag, Stefanie Götz, Kerstin Meier und Monika Kerscher. Für die gute Zusammenarbeit, die Hilfe im Labor und das nette Arbeitsklima bedanke ich mich. Auch Prof. Dr. Dietmaier danke ich sehr, denn er war mir in vielen Arbeitsphasen ein wertvoller Ansprechpartner und hatte immer ein offenes Ohr für meine Anliegen.

Besonders viel Spaß und Freude hat mir die Zusammenarbeit mit meiner Betreuerin PD Dr. Petra Rümmele gemacht, die mich in den wichtigen Arbeitsstadien tatkräftig unterstützt hat. Herzlichen Dank dafür.

Mein größter Dank geht an meine Eltern, deren Rückhalt ich all die Jahre meines Studiums hatte und die mir in dieser Zeit vieles ermöglicht haben - nicht nur die Durchführung dieser Arbeit.