

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. HANS JÜRGEN SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Evaluation von mTOR und STAT5b als potentielle
Zielstrukturen zur Behandlung des duktalem
Adenokarzinom des Pankreas**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Hedwig Stefanie Schenk

2013

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. HANS JÜRGEN SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Evaluation von mTOR und STAT5b als potentielle
Zielstrukturen zur Behandlung des duktalem
Adenokarzinom des Pankreas**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Hedwig Stefanie Schenk

2013

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

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven A. Lang

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas G. Schreyer

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 2014

GEWIDMET FAMILIE & FREUNDEN

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	7
1.1 Das Pankreaskarzinom	7
1.1.1 Epidemiologie.....	7
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	7
1.1.3 Pathogenese.....	7
1.1.4 Pathologie.....	8
1.1.5 Therapieoptionen.....	8
1.1.6 Prognose.....	9
1.2 Molekular zielgerichtete Therapie	9
1.3 “mammalian target of rapamycin” (mTOR).....	9
1.3.1 Struktur und Regulationsmechanismen.....	9
1.3.2 Rolle von mTOR bei Tumorerkrankungen.....	10
1.3.3 mTOR-Inhibition durch Rapamycin	11
1.4 „signal transducer and activator of transcription 5b“ (STAT5b).....	11
1.4.1 Struktur und Regulationsmechanismen.....	11
1.4.2 Rolle von STAT5b bei Tumorerkrankungen.....	13
2 Fragestellung und Zielsetzung.....	14
3 Material und Methoden.....	15
3.1 Geräte, Material und Reagenzien	15
3.2 Patientenkollektiv	17
3.3 Datensammlung	17
3.4 Fixation und histologische Standardfärbung.....	17
3.5 Immunhistochemie	17
3.5.1 (Strept)Avidin-Biotin-Methode	17
3.5.2 Immunhistochemische Detektion von phospho-mTOR.....	18

3.5.3	Immunhistochemische Detektion von STAT5b	19
3.5.4	Primärantikörper, Färbekits und Puffer	20
3.5.5	Auswertung	21
3.6	Zellkultur	22
3.6.1	Zellkulturreagenzien und Wachstumsfaktoren.....	23
3.7	Stabile Transfektion von HPAF-II-Zellen mittels STAT5b-shRNA-kodierender Plasmide	23
3.8	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	24
3.9	Westernblot	24
3.9.1	Antikörper, Gele und Puffer	25
3.10	Statistische Analyse.....	27
4	Ergebnisse	28
4.1	mTOR.....	28
4.1.1	Allgemeine Deskription des phospho-mTOR-Patientenkollektivs	28
4.1.2	phospho-mTOR-Expression im humanen dukalen Adenokarzinom des Pankreas.....	30
4.1.3	Korrelationsanalysen der zytoplasmatischen phospho-mTOR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern sowie Gesamtüberleben der Patienten.....	31
4.1.4	Rangkorrelationsanalyse zwischen zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression und nukleärer STAT5b-Expression.....	33
4.1.5	Inhibition von mTOR durch Rapamycin in Pankreaskarzinomzellen <i>in vitro</i>	34
4.2	STAT5b	35
4.2.1	Allgemeine Deskription des STAT5b-Patientenkollektivs	35
4.2.2	STAT5b-Expression im humanen dukalen Adenokarzinom des Pankreas.....	37
4.2.3	Korrelationsanalysen der nukleären STAT5b-Expression und klinisch-pathologischen Parametern sowie Gesamtüberleben der Patienten	38
4.2.4	Korrelationsanalysen der zytoplasmatischen STAT5b-Expression und klinisch-pathologischen Parametern der Patienten	41

4.2.5	Inhibition von STAT5b mittels shRNA-kodierender Plasmide in Pankreaskarzinomzellen <i>in vitro</i>	43
5	Diskussion.....	44
5.1	mTOR.....	44
5.1.1	phospho-mTOR-Expression	44
5.1.2	mTOR-Inhibition bei Pankreasadenokarzinomzellen <i>in vitro</i>	45
5.2	STAT5b	47
5.2.1	STAT5b-Expression	47
5.2.2	STAT5b-Inhibition bei Pankreasadenokarzinomzellen <i>in vitro</i>	48
6	Wertung und Ausblick.....	50
7	Zusammenfassung	51
7.1	mTOR.....	51
7.2	STAT5b	51
8	Anhang	52
8.1	Aktuelle TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung der „Union internationale contre le cancer“ (UICC)	52
8.2	Vergleich R0/R1 Klassifikation der UICC und „Royal College of Pathologists“ (RCP)	54
	Abkürzungsverzeichnis.....	55
	Literaturverzeichnis.....	59
	Danksagung	64
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	65

1 EINLEITUNG

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom macht mit weltweit geschätzten 277.000 Neuerkrankungen und 266.000 Todesfällen im Jahr 2008 ca. 2,5% aller Krebserkrankungen aus. Aufgrund seiner hohen Mortalitätsrate stellt es die viert- bzw. fünfthäufigste Krebs-bedingte Todesursache in Europa dar.^{1, 2} Laut Statistik des „European Cancer Observatory“ [<http://eu-cancer.iarc.fr>] lag in Deutschland die Inzidenz 2008 für beide Geschlechter bei 14.683 (11,2 pro 100.000) und die Mortalität bei 14.223 (10,6 pro 100.000). Durchschnittlich sind mehr Männer als Frauen betroffen (1,5:1) und das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen 65. und 85. Lebensjahr.³

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ursache der Pankreaskarzinomentstehung ist bisher nicht eindeutig geklärt.⁴ Dennoch gelten Nikotinabusus, Adipositas, Diabetes mellitus, chronische Pankreatitis und höheres Lebensalter als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms. Nur bei 5-10% aller Betroffenen tritt der Tumor im Alter von unter 50 Jahren auf. Das kumulative Lebenszeitrisiko für die Entstehung eines Pankreastumors beträgt ca. 1%.^{5, 6}

1.1.3 Pathogenese

Ein Modell zur Beschreibung der Pankreaskarzinomentwicklung ist das von Hruban beschriebene Tumorprogressionsmodell.⁷ Dabei erfolgt die Veränderung von histologisch normalem Pankreasepithelgewebe hin zum invasiven Karzinom erfolgt dabei über mehrere Stufen, die sog. intraepithelialen Neoplasien, auch bekannt als PanINs („pancreatic intraepithelial neoplasias“). Man unterteilt diese in PanIN-1, PanIN-2 und PanIN-3, abhängig vom Grad der Dysplasie. Die Tumorprogression ist bedingt durch Akkumulation spezifischer Genmutationen, die nach Zeitpunkt ihres Auftretens in unterschiedliche Klassen unterteilt werden können. Zu den frühen zählen *KRAS2*-Mutationen und die Verkürzung der Telomere, zu den intermediären gehören *p16*-Mutationen sowie der *CDKN2A*-Verlust und zu den späten zählen *DPC4*-, *TP53*- und *BRCA2*-Mutationen.^{7, 8} Real *et al.* hingegen veröffentlichten ein alternatives Modell, in dem PanIN-1 Läsionen nicht zwangsläufig in höhergradige Läsionen übergehen, sondern sogar zu einem Wachstumsstopp des duktales Pankreasepithels führen können.⁹

1.1.4 Pathologie

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas stellt mit über 90% den häufigsten malignen Pankreastumor dar.¹⁰ In 78% der Fälle ist das Karzinom im Pankreaskopf lokalisiert, jeweils 11% werden im Pankreaskorpus und Pankreasschwanz diagnostiziert.¹¹ Es zeichnet sich durch ein aggressives Wachstumsverhalten mit Infiltration angrenzender Strukturen und frühzeitiger Metastasierung aus.¹² Zum Diagnosezeitpunkt weist der Tumor meist eine Größe zwischen 2-5 cm auf. Makroskopisch betrachtet ist das Tumorgewebe in der Regel graugelbliche gefärbt und unscharf begrenzt. Histopathologisch findet man hauptsächlich atypische, glanduläre Strukturen umgeben von bindegewebigem Stroma.³ Metastasen treten vor allem in regionalen Lymphknoten, Leber und Lunge auf.¹³

1.1.5 Therapieoptionen

Mangels klinischer Frühsymptome wird das duktales Adenokarzinom des Pankreas meist erst in einem lokal fortgeschrittenen (T4, jedes N, M0) (ca. 40%) oder bereits metastasiertem und damit inoperablem Stadium (jedes T, jedes N, M1) (ca. 45%) diagnostiziert. Nur bei 15-20% der Patienten liegt zum Diagnosezeitpunkt ein operables Tumorstadium vor (T1-3, N0-N1, M0). Die chirurgische Therapie stellt die einzige kurative Form der Behandlung dar, doch selbst nach chirurgischer Resektion und adjuvanter Chemotherapie beträgt die mediane Überlebensdauer postoperativ nur 15-20 Monate und die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) steigt von 0% auf maximal 15-20%.¹⁴⁻¹⁶ Das klassische Verfahren bei operablen Pankreaskopftumoren stellt die Operation nach Kausch-Whipple dar, bei der sowohl Pankreaskopf, distaler Magen, Gallenblase, Ductus choledochus, Duodenum, proximales Jejunum, als auch sämtliche Lymphknoten entfernt werden. Eine häufig angewendete Abwandlung dieses Operationsverfahrens ist die pyloruserhaltende Pankreatikoduodenektomie.¹⁷ Die chirurgische Standardtherapie bei operablen Pankreasschwanzkarzinomen stellt die Pankreaslinksresektion mit Splenektomie dar.¹⁸ Die jeweilige Operation sollte, wie Studien belegen an einem entsprechenden Therapiezentrum mit hoher Patientenzahl und spezialisierten Chirurgen durchgeführt werden, um die perioperative Mortalität möglichst gering zu halten.^{19, 20} Randomisierte Studien zeigen einen signifikanten Überlebensvorteil bei Einsatz adjuvanter Chemotherapie.²¹⁻²³ Die am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika sind 5-Fluoruracil und Gemcitabin.²⁴ Bei fortgeschrittenen, nicht resektablen Pankreastumoren hat sich mittlerweile die Behandlung mittels Gemcitabin als palliative Therapie der Wahl etabliert.^{25, 26}

1.1.6 Prognose

Die Prognose für Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas über alle Krankheitsstadien hinweg ist mit einer 5-JÜR von < 5% und einer mittleren Überlebensdauer von 4-6 Monaten insgesamt sehr schlecht.¹⁵ Einer Untersuchung von Winter *et al.* zufolge liegt nach kompletter chirurgischer Resektion die 5-JÜR bei 18% und die mittlere Überlebenszeit beträgt 18 Monate.²⁷ Die meisten Patienten erleiden ein Rezidiv, das gewöhnlich 9-12 Monate postoperativ auftritt. Günstige prognostische Faktoren stellen neben einer Tumorgroße kleiner als 2cm ein negativer Lymphknotenbefall, eine Resektion im Gesunden (R0), sowie ein gut differenzierter Tumor dar.²⁸

1.2 Molekular zielgerichtete Therapie

Eine vielversprechende Alternative zur klassischen Tumorbehandlung mittels Chemo- oder Radiotherapie stellt die sog. zielgerichtete Therapie (*engl.* „targeted therapy“) dar. Sie ist speziell auf molekulare Strukturen ausgerichtet, die in der Tumorzellbiologie eine entscheidende Rolle spielen. Durch die zunehmende Kenntnis molekularer Signalwege in Karzinomzellen, eröffnet sich ein immer breiter werdendes Spektrum möglicher pharmakologischer Zielstrukturen in der Entwicklung antineoplastischer Substanzen.¹⁶ Mittlerweile existieren eine ganze Reihe für den klinischen Gebrauch zugelassene Medikamente dieser Substanzklasse, wie beispielsweise Bevacizumab (Avastin®), ein Anti-VEGF-Antikörper („vascular endothelial growth factor“), Cetuximab (Erbix®), ein Anti-EGFR-Antikörper („epidermal cell growth factor receptor“) oder Sorafenib (Nexavar®), ein kombinierter VEGFR/raf-Kinase Inhibitor.^{29, 30}

1.3 “mammalian target of rapamycin” (mTOR)

1.3.1 Struktur und Regulationsmechanismen

mTOR, auch bekannt als FRAP1 („FK506 binding protein-rapamycin-associated protein 1“) oder RAFT1 („rapamycin and FK506-binding protein-target 1“) ist eine ubiquitär vorkommende Serin-Threonin-Proteinkinase, bestehend aus 2549 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 289 kDa, die zur Familie der PIKKs („phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases“) gehört.³¹⁻³³ Sie ist unter anderem an Regulationsmechanismen des Zellwachstums, der Proliferation und des Zellzyklus beteiligt.³⁴ Durch extrazelluläre Stimuli, wie beispielsweise Insulin, Zytokine, Hormone oder Wachstumsfaktoren (IGF („insulin-like growth factor“)),

PDGF („platelet-derived growth factor“) oder VEGF („vascular endothelial growth factor“) wird neben anderen intrazellulären Vorgängen die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (Akt)/mTOR-Signalkaskade aktiviert.³⁵ Sie stimuliert einerseits die Ribosomenbiosynthese, andererseits die mRNA-Translation, was zur Synthese wichtiger Proteine führt, die für den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus verantwortlich sind.³⁶ mTOR ist in der Lage durch Bindung an andere Proteine zwei Komplexe (mTORCs) zu bilden, welche sich in ihrer molekularen Struktur, ihren Substraten und der Empfindlichkeit gegenüber Rapamycin, einem Proteinkinaseinhibitor unterscheiden. mTORC1 entsteht durch Bindung von mTOR an RAPTOR („regulatory associated protein of mTOR“), mLST8 („mTOR associated protein, LST8 homolog“), sowie andere Komponenten und ist Rapamycin-sensitiv. Durch Phosphorylierung aktiviert mTORC1 die ribosomale Kinase p70s6k1, inhibiert den eIF4E-Inhibitor („eukaryotic initiation factor 4E“) 4E-BP1 („4E binding protein 1“) und reguliert damit die Proteinbiosynthese und den Zellzyklus. Im Gegensatz dazu ist mTORC2, ein Komplex aus mTOR, RICTOR („rapamycin-insensitive companion of mTOR“), mLST8, mSIN1 („mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1“) und anderen Faktoren nicht empfindlich gegenüber Rapamycin und reguliert über das Aktin-Zytoskelett u.a. die Zellmotilität. Darüber hinaus moduliert mTORC2 mehrere intrazelluläre Signalkreisläufe durch Phosphorylierung von Akt an der Ser473 Position und Proteinkinase C.^{32, 37, 38}

1.3.2 Rolle von mTOR bei Tumorerkrankungen

Nicht nur seine Funktion bei Zellwachstum, Proliferation und Zellzyklus, sondern auch die Erkenntnis, dass mTOR als hemmender Faktor der zelleigenen Autophagozytose identifiziert wurde, machen deutlich, warum diese Serin-Threonin-Proteinkinase eine entscheidende Rolle bei Tumorerkrankungen spielen kann.³⁹ Eine aberrante Aktivierung der Akt/mTOR-Signalkaskade wurde u.a. bei Bronchialkarzinomzellen, hepatozellulären Karzinomzellen sowie Mammakarzinomzellen festgestellt.⁴⁰⁻⁴² Darüber hinaus zeigen immunhistochemische Ergebnisse von Murayama *et al.* und Lang *et al.* bei Magenkarzinomzellen eine erhöhte Expression von phosphoryliertem (aktiviertem) mTOR.^{43, 44} Mehrere Studien weisen darauf hin, dass Proteine wie beispielsweise PI3K, Akt, LKB1 („liver kinase B1“), TSC1 („tuberous sclerosis complex 1“) und TSC2 („tuberous sclerosis complex 2“), die in der Signalkaskade über mTOR stehen und dessen Expression steuern, genetisch verändert sein können und dadurch zur Tumorprogression beitragen können. Ein weiteres Beispiel hierfür ist PTEN

(„phosphatase and tensin homolog“), ein Tumorsuppressor, für den in vielen Tumorarten ein mutationsbedingter Funktionsverlust nachgewiesen werden konnte.^{31, 45-47} Darüber hinaus lassen sich Genveränderungen auch bei Proteinen feststellen, die der Regulation durch mTOR unterliegen. Ein solches „Target“-Protein ist beispielsweise eIF4E, ein Initiationsfaktor der Translation, der u.a. in soliden Tumoren des Gastrointestinaltraktes überexprimiert ist.⁴⁸ Gleiches zeigt sich für Cyclin D1, dessen Transkription, Translation und Stabilität durch mTORC1 positiv reguliert wird und wofür bei verschiedenen Tumorentitäten eine verstärkte Expression nachgewiesen werden konnte.³⁷ Durch die Expression in Tumorzellen und die pharmakologische Interventionsmöglichkeit stellt mTOR eine potentielle Zielstruktur (*engl.* „target“) einer molekularen zielgerichteten Tumorthherapie dar.

1.3.3 mTOR-Inhibition durch Rapamycin

Rapamycin ($C_{51}H_{79}NO_{13}$), auch bekannt als Sirolimus (Handelsname: Rapamune®) ist ein makrozyklisches Lakton (cyclischer Ester), das erstmals aus dem Bakterienstamm *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde.^{49, 50} Durch Bindung an das intrazelluläre „FK506 binding protein 12“ (FKBP12) entsteht ein Komplex, der direkt an die Rapamycinbindedomäne von mTOR binden und damit dessen Proteinkinasefunktion inhibieren kann. Dadurch unterbleibt die nachfolgende Phosphorylierung von „Target“-Proteinen wie S6K1 und 4E-BP1, was zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese und einem Stillstand des Zellzyklus in der G1-Phase führt.⁴¹ Aufgrund seiner immunsuppressiven und antiproliferativen Wirkung wird es zu therapeutischen Zwecken als Immunsuppressivum, besonders bei organtransplantierten Patienten eingesetzt.⁵¹ Experimentelle Daten zeigen, dass Rapamycin das Wachstum vieler Tumore hemmen kann, weshalb es aktuell in mehreren klinischen Phase II- und III-Studien auf seine Effektivität als Chemotherapeutikum bei verschiedenen Tumorentitäten wie Nierenzell-, Prostata- oder Pankreaskarzinom untersucht wird.^{46, 52}

1.4 „signal transducer and activator of transcription 5b“ (STAT5b)

1.4.1 Struktur und Regulationsmechanismen

STAT-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation diverser biologischer Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Fetalentwicklung, Entzündungsvorgänge und Immunantwort beteiligt sind.⁵³ Bisher wurden insgesamt 7 verschiedenen STAT-Proteine (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) in menschlichen Zellen

identifiziert.⁵⁴ Eine große Anzahl extrazellulärer Liganden, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren (EGF („epidermal growth factor“), HGF („hepatocyte growth factor“), PDGF („platelet-derived growth factor“), CSF-1 („colony-stimulating factor-1“)) und Hormone können STAT-Proteine aktivieren, indem sie an Rezeptoren binden, die intrazelluläre JAK-Kinasen (Janus-Kinasen: JAK1, JAK2, JAK3, TYK2 (Tyrosinkinase 2)) aktivieren. Diese phosphorylieren spezifische Tyrosinreste der Rezeptoren und STAT-Monomere, woraufhin diese an den Rezeptor binden und mithilfe ihrer SH2 („Src-homology 2“) Domäne Homo- oder Heterodimere ausbilden können. Nach Dissoziation vom Rezeptor translozieren die STAT-Dimere in den Nukleus, wo sie an spezifische DNA-Sequenzen, sog. GAS („ γ -interferon-activated sequences“) binden und die Transkription bestimmter „Target“-Gene initiieren. Die JAK/STAT-Signalkaskade stellt demnach einen direkten Weg zwischen Zellmembran und Nukleus dar und ist auf keinen „second messenger“ angewiesen.^{53, 55-57}

STAT5 existiert in den zwei Isoformen STAT5a und STAT5b, die zu 96% in ihrer Aminosäure-Sequenz übereinstimmen und von unterschiedlichen Genen auf Chromosom 17 codiert werden.⁵⁸ Im Gegensatz zu STAT2, STAT4 und STAT6, die nur von einer kleinen Ligandenanzahl aktiviert werden, kann STAT5 durch eine Vielzahl an Cytokinen (PRL (Prolaktin), EPO (Erythropoetin), TPO (Thrombopoetin), GH („growth hormone“), GM-CSF („granulocyte-macrophage colony stimulating factor“)) und Interleukinen (IL) (IL2, IL3, IL5, IL7, IL9, IL15) aktiviert werden.⁵⁷ STAT5a setzt sich strukturell aus 793 Aminosäuren zusammen, besitzt eine Molekülmasse von 94 kDa und regt durch PRL-Stimulation die Brustdrüsenentwicklung an. Bei einem Funktionsverlust von STAT5a kommt es in Tierexperimenten zu einer beeinträchtigten Entwicklung und Differenzierung des Brustdrüsenkörpers während der Schwangerschaft.⁵⁷⁻⁵⁹ STAT5b, bestehend aus 786 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 92 kDa, wird vor allem durch GH aktiviert und reguliert das Körperwachstum sowie die Geschlechtsentwicklung.^{58, 59} Durch IL15-Stimulation ist STAT5b an der Entwicklung natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) des Immunsystems beteiligt.⁵⁵ Experimentelle Daten zeigen eine fehlerhafte und mengenmäßig reduzierte NK-Zellentwicklung bei STAT5b-Proteinmangel.⁵³ Durch IL2-Stimulation induziert STAT5b die Proliferation von T-Zell-Lymphozyten und reguliert die Expression von Cyclin D1 in hämatopoetischen Stammzellen.^{53, 55} Über die Stimulation durch GM-CSF aktiviert STAT5b die Granulozytenproliferation.⁵³ Bei einem kombinierten Funktionsverlust von STAT5a und STAT5b kommt es im Mausmodell zu Minderwuchs, weiblicher Infertilität und fetaler Anämie.^{53, 57}

1.4.2 Rolle von STAT5b bei Tumorerkrankungen

Bei vielen humanen Karzinomarten, darunter auch beim dukталen Adenokarzinom des Pankreas kann eine verstärkte Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren beobachtet werden.^{19, 60} Von den 7 STAT-Transkriptionsfaktoren wurde bisher hauptsächlich eine erhöhte Aktivierung von STAT3, STAT5a und STAT5b bei Tumorerkrankungen, darunter bei Leukämien (z.B. akute myeloische Leukämie) und Lymphomen (z.B. Non-Hodgkin Lymphom), sowie soliden Tumoren (z.B. Prostata-, Mamma- oder Ovarialkarzinom) festgestellt.⁶¹ In ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren können STAT-Proteine die Synthese von Apoptoseinhibitoren (Mcl-1, Bcl-x), Zellzyklusregulatoren (Cyclin D1/D2, c-Myc) und Wachstumsfaktoren der Angiogenese (z.B. VEGF) erhöhen und damit in entscheidender Weise zur Tumorprogression beitragen.⁵⁵ STAT3 stimuliert die Angiogenese, Metastasierung und das Tumorstadium bei verschiedenen Tumorentitäten, darunter auch beim dukталen Adenokarzinom des Pankreas.⁶²⁻⁶⁴ STAT5a reguliert u.a. die Apoptose in Mammakarzinomzellen und bei einem kompletten STAT5a-Funktionsverlust weisen Prostatakarzinomzellen eine verstärkte Apoptosetätigkeit auf.⁶⁵⁻⁶⁷ STAT5b stimuliert u.a. das Tumorzellwachstum von kolorektalen Karzinomzellen und Prostatakarzinomzellen.^{64, 68, 69} Lee *et al.* konnten zeigen, dass die STAT5b-Expression in hepatozellulären Karzinomzellen signifikant mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium korreliert.⁷⁰ Bei Ovarialkarzinomzellen konnten Jinawath *et al.* einen Zusammenhang zwischen STAT5b-Expression und gesteigerter Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Carboplatin aufzeigen.⁷¹ Darüber hinaus weisen experimentelle Daten darauf hin, dass STAT5b bei Apoptoseregulation und epithelial-mesenchymaler Transition eine wichtige Rolle spielt.^{70, 72} Durch die Beteiligung an der Immunsystem-Regulation, kann STAT5b zu einem Kontrollverlust des Immunsystems beitragen und damit eine ungehinderten Tumorzelltransformation möglich machen.⁷³ Zusammenfassend stellt STAT5b aufgrund der Expression in Tumorzellen ein mögliches „Target“ einer molekularen zielgerichteten Tumorthherapie dar.

2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die Rolle von mTOR und STAT5b beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas ist bislang nur unzureichend untersucht. Asano *et al.* vermuten anhand erhöhter Phosphorylierung von p70s6k, dass mTOR in Pankreaskarzinomzelllinien verstärkt aktiviert ist.⁷⁴ Des Weiteren zeigen experimentelle Daten von Glienke *et al.*, dass die Behandlung humaner Pankreaskarzinomzelllinien mittels NVP-BGT226, einem PI3K/mTOR-Inhibitor zu einem Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase führt.⁷⁵ Hinsichtlich STAT5b weisen Analysen von Kataoka *et al.* auf eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors in IPMNs („intraductal papillary mucinous neoplasms“) des Pankreas hin.⁵⁴ Aus den genannten Daten ergab sich für uns die Frage, ob mTOR und STAT5b im duktalem Adenokarzinom des Pankreas exprimiert und daher als mögliche Ansätze für zielgerichtete Therapien infrage kommen würden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte, Material und Reagenzien

Folgende Geräte, Materialien und Reagenzien wurden verwendet:

Geräte	Firma
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
„Microplate Reader“	MDS Analytical Technologies, CA, USA
Mikrotom Typ HM 400	Microm, Walldorf
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
“Power Supply” (“Power Pac 300”)	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Schlittenmikrotom	Mikron, Biel, Schweiz
sterile Reinraumwerkbank	Clean Air Engineering, IL, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Ventana Nexes Gerät	Ventana Medical Systems, Frankfurt
Zentrifuge	Heraeus, Hanau

Material	Firma
Deckgläser	Schubert & Weiss
Einmalküvetten 1,5 ml halbmikro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen	Corning / Sarstedt / StarLab
SuperFrostPlus-Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
96-Well-Platte	Corning Incorporated, NY, USA
Zellkulturflaschen 250 ml/75 cm ²	Corning Incorporated, NY, USA

Reagenzien	Firma
“Acrylamide 30% Solution”	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
“Bradford Reagent”	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAB-Tabletten (3,3`-Diaminobenzidin)	Merck, Darmstadt

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ECL-Kit	Amersham Biociences, Piscataway, NJ
Entellan	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	J.T. Baker
Glycin	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
„Laemmli Sample Buffer“	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Mayers Hämlaunlösung	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat 10%	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
“Precision Plus Protein Dual Color Standard”	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Proteininhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rapamycin (Rapamune®) (1 mg/ml)	Wyeth Pharmaceuticals, Madison, NJ, USA
“Sure Silencing short hairpin RNA Plasmid for human STAT5b”	TIB Molbiol, Berlin
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIS-Base	USB, Cleveland, Ohio, USA
Trockenmilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
„Trypan Blue Solution“	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid (30%) (H₂O₂)	Merck, Darmstadt
Zitronensäuremonohydrat (C₆H₈O₇, H₂O)	Merck, Darmstadt

3.2 Patientenkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden 77 bzw. 80 Patienten mit histologisch gesichertem Adenokarzinom des Pankreas untersucht. Bei 77 Patienten wurden Färbungen der Serin-Threonin-Kinase phospho-mTOR vorgenommen. 80 Patienten wurden hinsichtlich STAT5b-Expression untersucht. 68 Patienten waren in beiden Gruppen vertreten. Da nicht genügend Tumorgewebe zur Verfügung stand, wurden die Kollektive mit jeweils 9 bzw. 12 zusätzlichen Patienten erweitert. Alle Patienten wurden zwischen 2001 und 2007 im Universitätsklinikum Regensburg operiert.

3.3 Datensammlung

Für die statistische Datenauswertung wurden klinische und histopathologische Befunde aller Patienten gesichtet. Die Angaben bezüglich Patientenalter, Geschlecht, Tumorlokalisation (Pankreaskopf vs. Pankreasschwanz), Staging (TNM-Klassifikation), Grading (G), Lymphgefäßinvasion (L), Gefäßinfiltration (V), Perineuraler Infiltration (Pn) sowie Resektionsstatus (R) wurden daraus übernommen.

3.4 Fixation und histologische Standardfärbung

Alle Tumorsektate wurden in 4% gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Routinemäßig wurden davon 3 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt und zur histologischen Beurteilung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) angefärbt.

3.5 Immunhistochemie

3.5.1 (Strept)Avidin-Biotin-Methode

Die immunhistochemischen Färbungen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach der (Strept)Avidin-Biotin-Methode durchgeführt. Sie beruht auf der hohen Bindungsaffinität (*Michaeliskonstante* $K_m = 10^{-15} M$) von Streptavidin (Protein der Bakterienspezies *Streptomyces avidinii*) und Avidin (Hühnereiweiß) für das Vitamin Biotin. Beide besitzen vier Bindungsstellen für Biotin. Tatsächlich binden jedoch aufgrund der molekularen Ausrichtung dieser Bindungsstellen weniger als vier Biotinmoleküle. Die grundlegende Abfolge der Reagenzien umfasst: 1. unkonjugierten Primärantikörper, 2. biotinmarkierten Sekundärantikörper, 3. entweder ein (Strept)Avidin-Biotin-Enzymkomplex bei der sog. „Avidin-Biotin-Complex“-Methode (ABC-Methode) oder enzymmarkiertes Streptavidin bei der sog. „Labelled StreptAvidin-Biotin“-Methode (LSAB-Methode). Beide Wege werden durch eine

Substrat-Chromogen-Lösung komplettiert. Die gebräuchlichsten Enzymmarker sind Meerrettichperoxidase (engl. „horseradish peroxidase“, HRP) und Alkalische Phosphatase (AP).⁷⁶

3.5.2 Immunhistochemische Detektion von phospho-mTOR

Für die immunhistochemische Färbung von phospho-mTOR wurde die LSAB-Methode unter standardisierten Bedingungen in einem Ventana Nexes Gerät angewendet. Hierfür wurden von dem eingebetteten Gewebe 3 µm dicke Paraffinschnitte mit einem Schlittenmikrotom angefertigt, auf SuperFrostPlus-Objektträger aufgezogen und bei 80°C für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert, um das Paraffin herauszulösen (Schmelzpunkt Paraffin: ca. 56°C). Anschließend wurden die Schnitte durch 2 x 10-minütiges Spülen in Xylol vollständig entparaffiniert und mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100%-, 2 x 96%-, 2 x 70%-iges Ethanol, 2 x H₂O) rehydriert. Es folgte ein 5-minütiges Spülen der Schnitte mit destilliertem Wasser (Aqua dest.). Da es durch die Formalinfixierung des Gewebes zur Ausbildung chemischer Quervernetzungen und damit Konformitätsänderung des betreffenden Antigens kommt, musste mit einem partiellen oder vollständigen Verlust der Immunreaktivität gerechnet werden.⁷⁶ Um diese verloren gegangene Reaktivität wiederherzustellen war eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung notwendig. Hierfür wurden die Schnitte in einer „Epitop-Retrieval“-Lösung (Citratpuffer) mit pH-Wert 7,2 für 32 Minuten in der Mikrowelle bei 350 Watt gekocht. Nach Abkühlen bei Raumtemperatur (RT) und Spülen mit Aqua dest. erfolgten die weiteren Färbeschritte semiautomatisch im Ventana Nexes Färbeautomaten, um eine optimale Standardisierung zu erreichen. Dieser besteht aus vier Hauptelementen: dem Computer als Steuerungssystem, der Färbereinheit mit Objektträger- und Reagenzkarussell, dem Kompressor zum Druckaufbau in den Flüssigkeitsschläuchen und dem Abfall zum Sammeln der verwendeten Reagenzien. Pro Färbedurchgang wurde das Objektträgerkarussell mit jeweils 20 Objektträgern versehen, das Reagenzkarussell mit den im „I-View“-Kit enthaltenen Reagenzien ausgestattet und nach Eingabe des Protokolls in den Computer, der zweistündige Färbevorgang begonnen. In dem geschlossenen Automaten system wurden die Objektträgerkammern auf eine optimale Temperatur von 37°C erwärmt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten erfolgte jeweils ein automatischer Waschvorgang mittels „APK Wash 10 x Solution“ sowie das Auftragen eines „Liquid Coverslips“. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit „I-View-Inhibitor“ für 4 Minuten inkubiert. Anschließend

wurden pro Schnitt 100 µl des Primärantikörpers für 32 Minuten in einer 1:25-Verdünnung mit „Antibody Diluent“ per Hand aufgetragen. Als nächstes wurden die Schnitte für 8 Minuten mit einem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. In seiner Funktion als Brückenantikörper schafft er eine Verbindung zwischen dem Primärantikörper und dem Komplex aus Streptavidin und HRP, der im Anschluss für 8 Minuten dazugegeben wurde. Zum histochemischen Nachweis der Peroxidase wurden die Schnitte für 8 Minuten mit einer Lösung aus 3,3'-Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid (H₂O₂), dem „I-View-DAB“ versetzt. Die dabei freiwerdenden Protonen oxidierten das Chromogen zu einem braunen Endprodukt im Bereich des Antigens. Die Gegenfärbung wurde mittels Hämatoxylin und die Nach-Gegenfärbung mit „Bluing Reagent“ durchgeführt. Durch das anschließende Spülen mit Leitungswasser kommt es zur Blaufärbung der Kerne. Manuell wurden die Schnitte mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x H₂O, 2 x 70%, 2 x 96%, 2 x 100%-iges Ethanol) und Xylol dehydriert und mit Entellan eingedeckt.

3.5.3 Immunhistochemische Detektion von STAT5b

Zur immunhistochemischen Färbung von STAT5b kam die ABC-Methode mithilfe des „Vectastain Universal Elite ABC“-Kits und den darin enthaltenen Reagenzien zur Anwendung. Dafür wurden 3 µm dicke Paraffinschnitte von dem eingebetteten Gewebe angefertigt und auf SuperFrostPlus-Objektträger aufgezogen. Im Anschluss daran erfolgte zum Herauslösen des Paraffins (Schmelzpunkt Paraffin: ca. 56°C) eine 48-minütige Inkubation bei 70°C im Brutschrank. Durch 2 x 10-minütiges Spülen in Xylol wurden die Schnitte entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100%, 2 x 96%, 2 x 70%-iges Ethanol, 2 x H₂O) rehydriert und 5 Minuten lang mit Aqua dest. gespült. Da wegen der Formalinfixierung des Gewebes, wie zuvor beschrieben, mit einem Verlust der Antigen-Immunreaktivität zu rechnen ist, wurden die Schnitte zur hitzeinduzierten Epitop-Freilegung in der Mikrowelle bei 850 Watt in einer „Epitop-Retrieval“-Lösung (Citratpuffer) mit pH-Wert 6,0 für 24 Minuten gekocht.⁷⁶ Zum Abkühlen wurden die im Citratpuffer verbliebenen Schnitte für 30 Minuten in ein kaltes Wasserbad gestellt. Danach wurden sie jeweils 3 x 5 Minuten in Aqua dest., sowie 2 x 3 Minuten in Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl. „phosphate buffered saline“, PBS) gespült. Zur Blockierung der gewebeeigenen Peroxidase wurden die Schnitte für 10 Minuten mit 3%-igem H₂O₂ (Verdünnung 1:10 von 30%-igem H₂O₂ mit PBS) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten mit Aqua dest. und 2 x 5 Minuten mit PBS ge-

spült. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit „Blockingserum“ (1:100 Verdünnung von Stocklösung mit PBS) bei RT, um endogene Kollagene und unspezifische gewebeigene Proteine zu blockieren. Als nächstes wurden jeweils 100 µl des Primärantikörpers (1:25 Verdünnung mit „Blockingserum“) hinzugegeben und über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Tumorschnitte 5 Minuten mit Aqua dest. und 3 x 5 Minuten mit PBS gespült. Anschließend wurden jeweils 100 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers für 30 Minuten bei RT aufgetragen (1:50 Verdünnung von Stocklösung mit PBS und Zugabe von 100 µl „biotinylated Universal Antibody“). Nach 5-minütigem Spülen mit Aqua dest. und 3 x 5-minütigem Waschen mit PBS wurden die Schnitte bei RT für 30 Minuten mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, dem „Vectastain Elite ABC Reagent“ inkubiert. Das Ansetzen des „ABC-Reagent“ erfolgte 30 Minuten vor Gebrauch. Hierbei wurden 100 µl „Reagent A“ zu 5 ml PBS gegeben und mit 100 µl „Reagent B“ versetzt. Anschließend erfolgte ein Spülschritt mit Aqua dest. für 5 Minuten und mit PBS für 3 x 5 Minuten. Danach wurde ein Substrat-Chromogen-Gemisch aus 3,3'-Diaminobenzidin und H₂O₂ aufgetragen (1 Tablette DAB in 10 ml PBS lösen, davon 2 ml unmittelbar vor Gebrauch mit 1,5 µl 30%-igem H₂O₂ mischen). Nach 8 Minuten wurde die Reaktion bei ausreichender Braunfärbung mit Aqua dest. gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte mittels Hämatoxylin. Hierzu wurde jeder Schnitt für 2 Sekunden mit Mayers Hämalaulösung bedeckt und anschließend unter fließendem Leitungswasser abgespült. Dadurch kommt es zu einer Blaufärbung der Zellkerne, was die exakte Differenzierung der Zellstrukturen bei der pathologischen Auswertung erleichtert. Zuletzt wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x H₂O, 2 x 70%-, 2 x 96%-, 2 x 100%-iges Ethanol) und Xylol dehydriert und mit Entellan eingedeckt.

3.5.4 Primärantikörper, Färbekits und Puffer

Folgende Primärantikörper, Färbekits und Puffer wurden bei den immunhistochemischen Färbungen eingesetzt:

Primärantikörper	Firma
“Monoclonal Rabbit Anti-Human phospho-mTOR”	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
“Monoclonal Mouse Anti-Human STAT5b”	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Färbekits	Komponenten	Firma
„I-View-Kit“	“Antibody Diluent” “APK Wash 10 x Solution” “Bluing Reagent” Hämatoxylin “I-View-DAB” “I-View-Inhibitor” “Liquid Coverslip”	Ventana Medical Systems, Frankfurt
“Vectastain Universal Elite ABC Kit”	“Biotinylated Universal Antibody” “Reagent A” “Reagent B” Stocklösung	Vector Laboratories, Burlingame, CA

Puffer	Rezept
Citratpuffer (phospho- mTOR)	Stammlösung A: 2,1 g Zitronensäure 0,1 M ($C_6H_8O_7$, H_2O) auf 100 ml Aqua dest. Stammlösung B: 29,41 g Natriumcitrat ($C_6H_5O_7Na_3$, 2 H_2O) auf 1000 ml Aqua dest. zur Gebrauchslösung 1 ml Stammlösung A + 49 ml Stammlösung B auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen
Citratpuffer (STAT5b)	2,1 g Zitronensäuremonohydrat ($C_6H_8O_7$, H_2O) in 500 ml Aqua dest. lösen im pH-Meter auf pH-Wert 6,0 einstellen zur Gebrauchslösung auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen
PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4 , 2,4 g KH_2PO_4 in 500 ml Aqua dest. lösen im pH-Meter auf pH 7,4 einstellen zur Gebrauchslösung auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

3.5.5 Auswertung

Bei beiden immunhistochemischen Färbungen wurde jeweils ein repräsentativer Tumorge-
webeschnitt durch eine erfahrene Pathologin ausgewählt und bei jedem Färbedurchgang als
Positivkontrolle mitgeführt. Bei der Negativkontrolle wurde auf die Inkubation mit dem Pri-
märantikörper verzichtet. Die gefärbten Tumorschnitte wurden von einer erfahrenen Patho-
login (PD Dr. med. Petra Rümmele) ohne Kenntnis der klinischen Daten ausgewertet.

Bei der Analyse von phospho-mTOR wurde die Intensität der zytoplasmatischen Färbung mit Werten von 0 bis +++ (0 für keine Färbung, + für schwache Intensität, ++ für moderate Intensität, +++ für starke Intensität) angegeben und der Prozentsatz der angefärbten Tumorzellen bestimmt. Für phospho-mTOR wurde eine zytoplasmatische Färbung von mindestens 10% der Tumorzellen als positive Immunreaktion festgelegt.

Bei der Untersuchung von STAT5b wurde die Intensität der nukleären Färbung mit Werten von 0 bis ++ (0 für keine Färbung, + für schwache Intensität, ++ für starke Intensität) angegeben und der Prozentsatz der angefärbten Tumorzellen ermittelt. Die Intensität der zytoplasmatischen Färbung für STAT5b wurde entweder mit 0 für keine Färbung oder + für stattgehabte Färbung bewertet. Hierbei wurde kein Prozentsatz bestimmt. In Anlehnung an ein von Kataoka *et al.* veröffentlichtes Klassifizierungssystem für die STAT5b-Expression wurde eine nukleäre Immunreaktion von mindestens 10% der Tumorzellen als positiv und <10% als negativ definiert.⁵⁴ Da sich unter Verwendung dieses Klassifizierungssystems keine signifikante Korrelation zwischen STAT5b-Expression und klinisch-pathologischen Parametern ergab, wurde zusätzlich eine Unterteilung in negativ (<10%), schwache Expression (10-30%) und starke Expression (>30%) vorgenommen. Bei der Beurteilung des Zytoplasmas wurde eine einfach positive Intensität für STAT5b als positive zytoplasmatische Reaktion gewertet.

3.6 Zellkultur

Um Effekte der mTOR- und STAT5b-Inhibition *in vitro* zu untersuchen, wurden drei Pankreaskarzinomzelllinien kultiviert. Die humanen Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-II und BxPc3 bezogen wir von der „American Type Culture Collection“ (Manassas, VA, USA), während die Zelllinie L3.6pl von Dr. I. J. Fidler (The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Eine sterile Reinraumwerkbank diente als Arbeitsplatz für alle Zellkulturarbeiten. Sämtliche Geräte und Materialien wurden vor Gebrauch gereinigt, desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert. Die HPAF-II- und L3.6pl-Tumorzellen wurden in „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM) kultiviert. Für BxPc3-Tumorzellen wurde als Nährmedium „Roswell Park Memorial Institute Medium“ (RPMI 1640) verwendet. Alle drei Tumorzelllinien wurden bei 5% CO₂ und 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.6.1 Zellkulturreagenzien und Wachstumsfaktoren

Folgende Zellkulturreagenzien und Wachstumsfaktoren kamen bei den Zellkulturarbeiten zum Einsatz:

Medien	Zusätzliche Bestandteile	Firma
DMEM	15% Fetales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1% Vitamine, 1% Antibiotika/Antimykotika (ABAM) 1% Aminosäuren	PAA Laboratories GmbH, Österreich
RPMI 1640	10% Fetales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1% Vitamine, 1% ABAM	PAA Laboratories GmbH, Österreich

Medienzusätze	Firma
ABAM	Gibco, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
MEM-Vitamine	Gibco, Karlsruhe
MEM-Nichtessentielle Aminosäuren	Gibco, Karlsruhe

Reagenzien	Firma
PBS	PAA Laboratories GmbH, Österreich
„Trypsin-EDTA-Solution“ 10x	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.7 Stabile Transfektion von HPAF-II-Zellen mittels STAT5b-shRNA-kodierender Plasmide

Ein spezifischer pharmakologischer Inhibitor für STAT5b ist derzeit nicht kommerziell erhältlich. Daher wurde die Technik der RNA-Interferenz (RNAi) zur spezifischen Blockade der STAT5b-Expression in Pankreaskarzinomzellen *in vitro* verwandt. Hierbei wird mithilfe STAT5b-shRNA-kodierender Plasmide („Sure Silencing short hairpin RNA Plasmid for human

STAT5b“), die mittels stabiler Transfektion in die Tumorzellen eingebracht werden, die STAT5b-Genexpression posttranskriptionell stillgelegt. In Vorarbeiten wurden HPAF-II-Tumorzellen mithilfe STAT5b-shRNA-kodierender Plasmide unter Zuhilfenahme des Transfektionsreagens Lipofectamin 2000 entsprechend den Herstellerangaben stabil transfiziert und standen daher für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

3.8 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)

Um den Effekt der mTOR- und STAT5b-Blockade auf das Wachstum von Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro* darzustellen, wurden MTT-Tests durchgeführt. Hierbei handelt es sich um Zytotoxizitätstests, bei denen das gelbe Tetrazoliumsalz MTT in vitalen Zellen zu violetten Formazankristallen reduziert wird.⁷⁷ Es wurden HPAF-II-, BxPc3- und L3.6pl-Tumorzellen in 96-Well-Platten (1 x 10³ Zellen pro Vertiefung) ausplattiert. Im Falle der mTOR-Blockade erfolgte am darauffolgenden Tag die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Rapamycin (1 nM, 10 nM, 100 nM) (Rapamune®, 1 mg/ml) für 24, 48 und 72 Stunden. Nach dem jeweiligen Behandlungszeitraum erfolgt die Zugabe von je 40 µl MTT-Lösung (125 mg MTT in 50 ml PBS, ergibt 2,5 g/l) bei 37°C. Nach einer Stunde wird die Reaktion mit jeweils 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) abgestoppt. Die Messung der Absorption erfolgt anschließend bei einer Wellenlänge von 590 nm mit einem „Microplate Reader“. Im Fall der STAT5b-Blockade durch shRNA Plasmide wurden ebenfalls 1 x 10³ stabil transfizierte HPAF-II-Tumorzellen (Klon 1 und 2) sowie entsprechende Kontrollen in 96-Well-Platten (1 x 10³ Zellen pro Vertiefung) ausplattiert und für 24, 48 und 72 Stunden in DMEM (ohne Penicillin/Streptomycin und ABAM) kultiviert. Nach der jeweiligen Zeitdauer erfolgte auch hier die Zugabe von je 40 µl MTT-Lösung bei 37°C. Die Reaktion wurde nach einer Stunde mit je 100 µl DMSO gestoppt. Die anschließende Absorptionsmessung erfolgte ebenfalls bei einer Wellenlänge von 590 nm mit einem „Microplate Reader“.

3.9 Westernblot

Zur Verifizierung des STAT5b „knock-downs“ durch RNAi wurden Westernblots angewandt. Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen mit DMEM erfolgte die Lyse der Zellen mittels Lysepuffer. Anschließend wurde die Suspension 15 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Zelllysate erfolgte mithilfe des „Bradford Reagent“ (500 µl „Bradford Reagent“, 500 µl Aqua dest., 1 µl Probe) im Photometer. Dabei kommt es zur Komplexbildung zwischen Proteinen und dem Farbstoff Coomassie-

Brillantblau. Mit Hilfe des gemessenen Absorptionsmaximums bei 595 nm können die Proteine photometrisch quantifiziert werden.⁷⁸ Über eine Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin kann schließlich der Proteingehalt errechnet werden. Dies ermöglicht das Auftragen gleicher Mengen Protein für die Westernblot-Analyse. Zur Auftrennung der Proteine ihrer Größe nach wurde daraufhin mit den Lysaten (40 µg) eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit 10%-igen Laufgelen und 5%-igen Sammelgelen durchgeführt. Die Proben wurden mit 5 µl Laemmli-Puffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C im Thermomixer erhitzt, 5 Sekunden bei 5000 rpm zentrifugiert, kurz im Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Daraufhin wurde der „Power Supply“ angeschlossen und das Gel lief bei 100 V bis zum gewünschten Punkt. Nach der gel-elektrophoretischen Auftrennung erfolgte nun der Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran. Hierzu wurde das Gel zusammen mit „Whatman“-Papier und einer Nitrozellulosemembran in einem Elektromodul unter Anlage eines elektrischen Feldes mit vorgekühltem (4°C) Transferpuffer bei 100 V geblottet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen anschließend für 1 Stunde mit 5% Trockenmilch in „Tris-Buffered-Saline-Tween-20“ (TBS-T) (5 g Trockenmilch auf 100 ml mit TBS-T auffüllen) blockiert. Als nächster Schritt folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (1:1000 Verdünnung in 5% Trockenmilch und TBS-T) gegen STAT5b und β-Actin über Nacht bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen für 15 Minuten mit TBS-T wurden HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (1:2500 Verdünnung in 5% Trockenmilch und TBS-T) für 1 Stunde bei RT dazugegeben, die spezifisch an die Primärantikörper binden. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit TBS-T wurden mithilfe eines ECL-Kits, das eine Chemilumineszenzreaktion hervorruft die Proteinbanden sichtbar gemacht.

3.9.1 Antikörper, Gele und Puffer

Folgende Antikörper, Gele und Puffer kamen beim Westernblot zum Einsatz:

Primärantikörper	Firma
“Monoclonal Mouse Anti-Human STAT5b”	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
β-Actin	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA

Sekundärantikörper	Firma
“Goat-anti-mouse IgG-HRP”	Amersham Biociences, Piscataway, NJ, USA
“Rabbit-anti-goat IgG-HRP”	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Gele	Bestandteile
10%-ige Laufgele	3,6 ml Aqua dest. 3 ml Acrylamid 30% 2,25 ml 1,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (pH 8,8) 60 µl Ammoniumpersulfat 10% 90 µl Natriumdodecylsulfat 10% 20 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)
5%-ige Sammelgele	2,06 ml Aqua dest. 500 µl Acrylamid 30% 380 µl 0,5 M TRIS (pH 6,8) 32 µl Ammoniumpersulfat 10% 32 µl Natriumdodecylsulfat 10% 6 µl TEMED

Puffer	Rezept
Laemmli-Puffer	950 µl “Laemmli Sample Buffer” 50 µl 2-Mercaptoethanol
Lysepuffer	795 µl RIPA-B-Puffer 100 µl Proteininhibitor 10 x 5 µl Natriumorthovanadat 0,1 M 100 µl Phenylmethylsulfonylfluorid 20 mM
TBS-T	24,2 g TRIS-Base und 80 g NaCl auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen, davon 100 ml auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen, dazu 1 ml Tween 20
Transferpuffer	144 g Glycin und 30 g TRIS-Base auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen, davon 100 ml auf 800 ml mit Aqua dest. auffüllen, dazu 200 ml Methanol

3.10 Statistische Analyse

Alle neu ermittelten Ergebnisse, sowie die bekannten klinisch-pathologischen Daten wurden mit dem Statistikprogramm „SPSS Statistics for Windows“, Version 19.0 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath) ausgewertet.

Korrelationen zwischen den immunhistochemischen Ergebnissen für phospho-mTOR, sowie STAT5b und den klinisch-pathologischen Parametern der Patienten wurden mithilfe des „Fischer’s exact test“ analysiert. Zur Korrelationsanalyse zwischen phospho-mTOR-Expression und nukleärer STAT5b-Expression wurde die Rangkorrelation nach Kendall angewandt. Hierfür wurden die Daten der 68 Patienten analysiert, die sowohl im phospho-mTOR-Patientenkollektiv, als auch im STAT5b-Patientenkollektiv vertreten waren. Das Patientenüberleben wurde mittels Cox-Regression ermittelt. Überlebenskurven wurden mithilfe der Kaplan-Meier Methode erstellt und statistische Signifikanzen mittels „log-rank-test“ bestimmt. Zur Analyse der *in vitro* Daten wurde der zweiseitige t-Test herangezogen. Sämtliche Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Für alle Tests wurde ein Signifikanzniveau von $P < 0,05$ festgelegt. Alle erhaltenen P’s wurden durch zweiseitige Tests ermittelt.

4 ERGEBNISSE

4.1 mTOR

4.1.1 Allgemeine Deskription des phospho-mTOR-Patientenkollektivs

Im Rahmen dieser Dissertation wurden insgesamt 77 Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas hinsichtlich phospho-mTOR-Expression untersucht. Davon waren 51 Patienten (66%) männlich und 26 (34%) weiblich. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung lag bei 64 Jahren. Die diesbezügliche Altersspanne erstreckte sich von 33 bis 82 Jahren. Bei 59 Patienten (77%) wurde ein Pankreaskopfkarzinom diagnostiziert und mittels Pankreaskopfresektion behandelt. Bei 18 (23%) Patienten lag ein Pankreasschwanzkarzinom vor, welches mittels Pankreaslinksresektion und Splenektomie therapiert wird. Alle Patienten wurden zwischen 2001 und 2007 am Universitätsklinikum Regensburg operiert. Der postoperative Beobachtungszeitraum reichte bis Juli 2009. Zu diesem Zeitpunkt waren 61 Patienten (79%) bereits verstorben. Bei 3 Patienten (4%) wurde zum Diagnosezeitpunkt ein T1-Stadium mit einer Primärtumorgröße von ≤ 2 cm Durchmesser festgestellt. Bei 8 Patienten (10%) lag ein T2-Stadium mit einer Primärtumorgröße von über > 2 cm Durchmesser vor.⁷⁹ Bei 63 Patienten (82%) war ein T3-Stadium, bei 3 Patienten (4%) ein T4-Stadium diagnostiziert worden. 56 Patienten (73%) wiesen regionäre Lymphknotenmetastasen (N1) auf. In 5 Fällen (6%) wurden Fernmetastasen (M1) festgestellt. 56 Patienten (73%) waren frei von residualem Tumorgewebe (R0), bei 17 Patienten (22%) hingegen wurde ein mikroskopischer Residualtumor (R1) nachgewiesen und 1 Patient (1%) wies einen makroskopischen Tumorrest (R2) an den Schnitträndern auf. Bei 3 Patienten (4%) lag kein Befund zum Resektionsstatus vor. Im Zuge der postoperativen histopathologischen Beurteilung wiesen 7 Patienten (9%) gut differenziertes (G1), 40 Patienten (52%) mäßig differenziertes (G2) und 30 Patienten (39%) schlecht differenziertes (G3) Tumorgewebe auf. Bei 42 Patienten (55%) war der Tumor bereits in Lymphgefäße eingebrochen (L1). In 20 Fällen (26%) waren diese noch tumorfrei (L0), wobei insgesamt von 62 Patienten (81%) hierzu ein Befund vorlag. Bei 20 Patienten (26%) infiltrierte der Tumor angrenzende Gefäße (V1), in 36 Fällen (47%) waren diese noch frei von Tumorgewebe (V0). Für 21 Patienten (27%) lag dazu kein Befund vor. In 46 Fällen (60%) wurde eine Tumordinfiltration der Perineuralscheide (Pn1) festgestellt, wobei insgesamt für 47 Patienten (61%) diesbezüglich ein Befund dokumentiert war. Sämtliche

klinisch-pathologische Daten des phospho-mTOR-Patientenkollektivs sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Variable	Patientenzahl		Variable	Patientenzahl
Anzahl				
Total	77			
Durchschnittsalter	64			
Geschlecht			Tumorlokalisation	
Männlich	51 (66%)		Pankreaskopfkarzinom	59 (77%)
Weiblich	26 (34%)		Pankreasschwanzkarzinom	18 (23%)
Tumorausdehnung			Resektionsstatus	
T1	3 (4%)		R0	56 (73%)
T2	8 (10%)		R1	17 (22%)
T3	63 (82%)		R2	1 (1%)
T4	3 (4%)		Rx	3 (4%)
Lymphknotenstatus			Fernmetastasierung	
N0	21 (27%)		M0	72 (94%)
N1	56 (73%)		M1	5 (6%)
Grading			Lymphgefäßinfiltration	
G1	7 (9%)		L0	20 (26%)
G2	40 (52%)		L1	42 (55%)
G3	30 (39%)		Lx	15 (19%)
Gefäßinfiltration			Perineurale Infiltration	
V0	36 (47%)		Pn0	1 (1%)
V1	20 (26%)		Pn1	46 (60%)
Vx	21 (27%)		Pnx	30 (39%)

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Daten des phospho-mTOR-Patientenkollektivs

4.1.2 phospho-mTOR-Expression im humanen duktaalen Adenokarzinom des Pankreas

Die phospho-mTOR-Expression wurde in den immunhistochemischen Färbungen anhand eines intensiv braunen, zytoplasmatisch lokalisierten Präzipitats detektiert. Dieses zeigte sich in den Pankreasadenokarzinomzellen mit Akzentuierung der Tumorzellmembran. In den peritumoralen Azini- und Duktalzellen des Pankreas war keine phospho-mTOR-Expression festzustellen. Nebenbefundlich wurde eine verstärkte phospho-mTOR-Immunreaktion innerhalb der Tumordinfiltrationszone beobachtet, sofern diese angeschnitten war. Insgesamt war phospho-mTOR in 62/77 (81%) Pankreastumoren exprimiert (Expression >10%). Davon wiesen 14 (18%) eine schwache, 39 (51%) eine moderate und 9 (12%) eine starke Intensität auf (siehe Tabelle 2). In Abbildung 1 sind repräsentativ immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte dargestellt.

Auswertbare Fälle	phospho-mTOR zytoplasmatisch positiv			phospho-mTOR zytoplasmatisch negativ
77 (100%)	62 (81%)			15 (19%)
	Schwache Intensität	Moderate Intensität	Starke Intensität	
	14 (18%)	39 (51%)	9 (12%)	

Tabelle 2: Zytoplasmatische phospho-mTOR-Expression in immunhistochemischen Färbungen

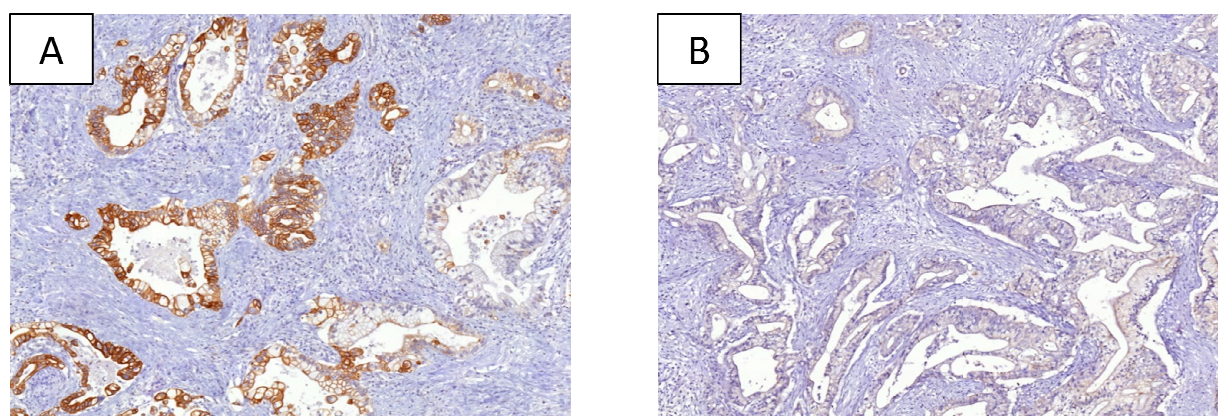


Abbildung 1: (A) zytoplasmatisch positive phospho-mTOR-Expression in Pankreasadenokarzinomzellen, Vergrößerung: 64-fach
(B) zytoplasmatisch negative phospho-mTOR-Expression in Pankreasadenokarzinomzellen, Vergrößerung: 64-fach

4.1.3 Korrelationsanalysen der zytoplasmatischen phospho-mTOR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern sowie Gesamtüberleben der Patienten

In Korrelationsanalysen bezüglich zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression und klinisch-pathologischen Parameter, die in Tabelle 3 dargestellt sind, zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Patientenalter (jünger vs. älter 50 Jahre), Geschlecht (männlich, weiblich), Tumorlokalisation (Pankreaskopf vs. Pankreasschwanz), lokaler Tumorausdehnung (T-Stadium), Lymphknotenmetastasierung (N-Stadium), Fernmetastasierung (M-Stadium), histologischem Tumordifferenzierungsgrad (Grading), sowie Resektionsstatus (R) und zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression. Die Korrelationsanalyse bezüglich Gesamtüberlebens der Patienten und zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression erbrachte ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang.

Auswertbare Fälle	Variable	Anzahl	phospho-mTOR zytoplasmatisch negativ	phospho-mTOR zytoplasmatisch positiv	P-Wert
77 (100%)	Total	77	15	62	
77 (100%)	Altersgruppe ≤ 50 Jahre > 50 Jahre	7 70	3 12	4 58	0,1295
77 (100%)	Geschlecht Männlich Weiblich	51 26	12 3	39 23	0,2427
77 (100%)	Tumorlokalisation Pankreaskopf Pankreasschwanz	59 18	11 4	48 14	0,7411
77 (100%)	Tumorausdehnung T1 - T2 T3 - T4	11 66	2 13	9 53	1,000
77 (100%)	Lymphknotenstatus N0 N1	21 56	3 12	18 44	0,7474
77 (100%)	Fernmetastasierung M0 M1	72 5	13 1	59 4	1,000
77 (100%)	Grading G1 – G2 G3	47 30	9 6	38 24	1,000
74 (96%)	Resektionsstatus R0 R1 – R2	56 18	11 3	45 15	1,000

Tabelle 3: Korrelationsanalysen der zytoplasmatischen phospho-mTOR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

4.1.4 Rangkorrelationsanalyse zwischen zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression und nukleärer STAT5b-Expression

In einer Studie von Yokogami *et al.* zeigte sich, dass mTOR den Transkriptionsfaktor STAT3 an der Position Ser727 phosphoryliert, welcher dadurch verstärkt die Transkription bestimmter „Target“-Genen initiiert.⁸⁰ Im Zuge dieser Erkenntnis konnten Zhang *et al.* feststellen, dass eine kombinierte Behandlung von hepatozellulären Karzinomzellen mittels Rapamycin, einem mTOR-Inhibitor und shRNA-kodierender Plasmide zur STAT3-Inhibition, zu einer höheren Tumorzellapoptoserate führt, als die jeweilige Behandlung mit nur einem Therapeutikum.⁴¹ Um einen möglichen Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression und nukleärer STAT5b-Expression nachzuweisen, wurde in der vorliegenden Untersuchung die Rangkorrelationsanalyse nach Kendall angewandt. Dabei zeigte sich bei einem Korrelationskoeffizienten $\tau = 0,112$ ($P = 0,246$) kein signifikanter Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression und nukleärer STAT5b-Expression. In Abbildung 2 ist mithilfe eines Streudiagramms die zytoplasmatische phospho-mTOR-Expression und die nukleäre STAT5b-Expression dargestellt.

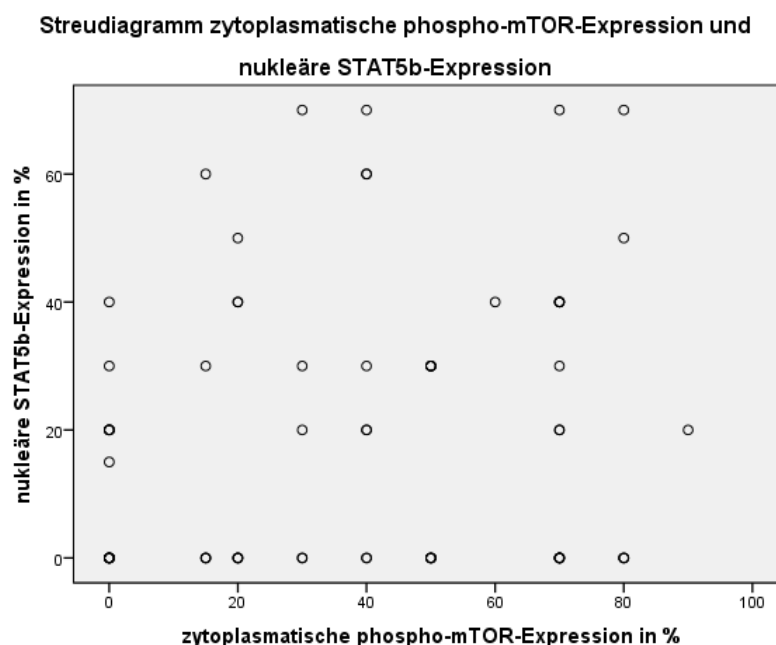


Abbildung 2: Streudiagramm der zytoplasmatischen phospho-mTOR-Expression und der nukleären STAT5b-Expression. Tumorschnitte mit geringer zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression weisen sowohl schwache, als auch starke nukleäre STAT5b-Expressionen auf, ebenso wie Tumorschnitte mit hoher zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression.

4.1.5 Inhibition von mTOR durch Rapamycin in Pankreaskarzinomzellen *in vitro*

Um den Effekt einer mTOR-Inhibition auf das Wachstum von Pankreasadenokarzinomzellen *in vitro* zu untersuchen wurden MTT-Tests für die drei Pankreastumorzelllinien L3.6pl, HPAF-II und BxPc3 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rapamycin (1 nM, 10 nM und 100 nM), einem pharmakologischen mTOR-Inhibitor für jeweils drei Behandlungszeiträume (24, 48 und 72 Stunden) durchgeführt. Hierbei zeigte sich für alle drei Tumorzelllinien, dass bereits eine Rapamycin-Konzentration von 1 nM nach 72 Stunden zu einer signifikanten Hemmung des Tumorzellwachstums führt (jeweils $P < 0,05$). Für L3.6pl-Tumorzellen konnte darüber hinaus bei einer Rapamycin-Konzentration von 1 nM schon nach 24 Stunden ($P = 0,0058$) und 48 Stunden ($P = 0,0007$) eine signifikante Wachstumshemmung festgestellt werden (Abb. 3). Eine Dosiserhöhung von Rapamycin auf 10 nM und 100 nM brachte für alle drei Tumorzelllinien keine signifikante Verbesserung der Wachstumshemmung. Es zeigte sich, dass eine Behandlung mittels Rapamycin von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* zu einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums führt und damit mTOR als Angriffspunkt in der Tumorthherapie des duktaalen Adenokarzinom des Pankreas eine wichtige Rolle spielen könnte.

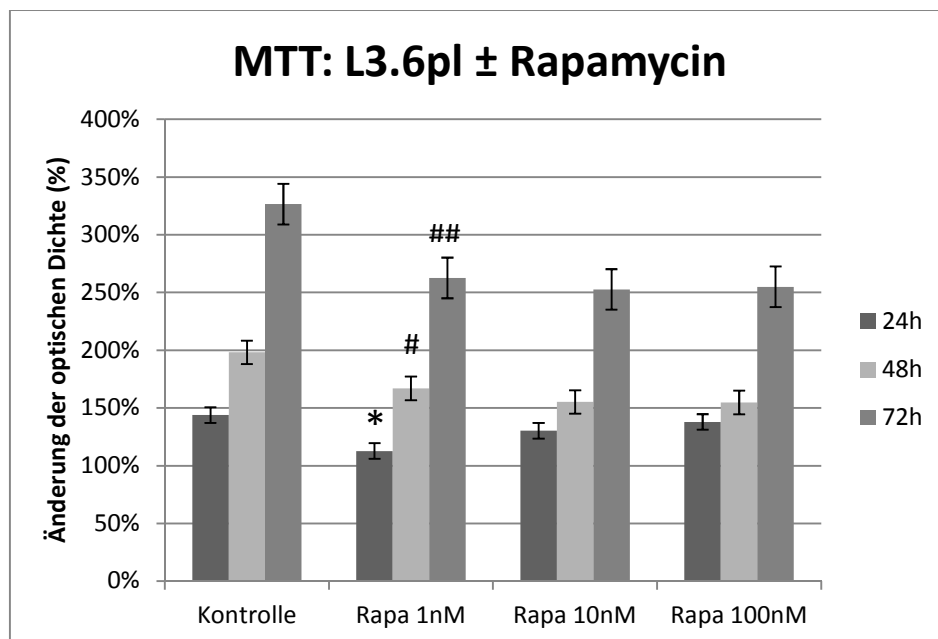


Abbildung 3: MTT-Test zur Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf das Tumorzellwachstum von L3.6pl-Pankreaskarzinomzellen *in vitro*. Bei einer Konzentration von 1 nM führt Rapamycin sowohl nach 24 Stunden (*, $P = 0,0058$), 48 Stunden (#, $P = 0,0007$), als auch nach 72 Stunden (##, $P = 0,0044$) zu einer signifikanten Hemmung des Pankreastumorzellwachstums *in vitro*. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.2 STAT5b

4.2.1 Allgemeine Deskription des STAT5b-Patientenkollektivs

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden 80 Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas hinsichtlich STAT5b-Expression untersucht. 52 Patienten (65%) waren männlich, 28 (35%) weiblich mit einem Durchschnittsalter von 63 Jahren. Die Altersspanne reichte von 35 bis 82 Jahre. 58 Patienten (72,5%) wiesen ein Pankreaskopfkarzinom auf, welches operativ mittels Pankreaskopfresektion therapiert wurde. Bei 22 Patienten (27,5%) lag ein Pankreaschwanzkarzinom vor, das mittels Pankreaslinksresektion sowie Splenektomie behandelt wurde. Alle Patienten wurden zwischen 2001 und 2007 am Universitätsklinikum Regensburg operiert. Der postoperative Beobachtungszeitraum erstreckte sich bis Juli 2009. 64 Patienten (80%) waren zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben. Bei Diagnosestellung wiesen 2 Patienten (2,5%) ein T1-Stadium, 6 Patienten (7,5%) ein T2-Stadium, 69 Patienten (86%) ein T3-Stadium und 3 Patienten (4%) ein T4-Stadium auf. In 58 Fällen (72,5%) waren regionäre Lymphknotenmetastasen (N1) vorhanden. Bei 5 Patienten (6%) lagen Fernmetastasen vor. 58 Patienten (72,5%) waren frei von residualem Tumorgewebe (R0). Bei 19 Patienten (24%) zeigte sich ein mikroskopischer Residualtumor (R1) an den Schnitträndern und 1 Patient (1%) wies einen makroskopischen Tumorrest (R2) auf. In 2 Fällen (2,5%) war diesbezüglich kein Befund dokumentiert. Bei der histopathologischen Begutachtung wiesen 5 Patienten (6%) gut differenziertes (G1), 39 Patienten (49%) mäßig differenziertes (G2) und 35 Patienten (44%) schlecht differenziertem Tumorgewebe (G3) auf. Für 1 Patienten (1%) war hierzu kein Befund vorhanden. Bei 42 Patienten (52,5%) wurde eine Lymphgefäßinfiltration durch den Tumor (L1) diagnostiziert. In 20 Fällen (25%) waren diese noch tumorfrei, wobei insgesamt für 62 Patienten (77,5%) diesbezüglich ein Befund vorlag. In 21 Fällen (26%) infiltrierte der Tumor bereits angrenzende Gefäße (V1), bei 34 Patienten (43%) waren diese noch tumorfrei (V0). Für 25 Patienten (31%) war hierzu kein Befund dokumentiert. In 45 Fällen (56%) wurde eine perineurale Tumorerkrankung (Pn1) festgestellt. 2 Patienten (3%) hatten diesbezüglich einen negativen Befund (Pn0), wobei insgesamt von 47 Patienten (41%) dazu ein Ergebnis vorlag. Sämtliche klinisch-pathologische Daten des STAT5b-Patientenkollektivs sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Variable	Patientenzahl		Variable	Patientenzahl
Anzahl				
Total	80			
Durchschnittsalter	63			
Geschlecht			Tumorlokalisation	
Männlich	52 (65%)		Pankreaskopfkarzinom	58 (72,5%)
Weiblich	28 (35%)		Pankreasschwanzkarzinom	22 (27,5%)
Tumorausdehnung			Resektionsstatus	
T1	2 (2,5%)		R0	58 (72,5%)
T2	6 (7,5%)		R1	19 (24%)
T3	69 (86%)		R2	1 (1%)
T4	3 (4%)		Rx	2 (2,5%)
Lymphknotenstatus			Fernmetastasierung	
N0	22 (72,5%)		M0	75 (94%)
N1	58 (27,5%)		M1	5 (6%)
Grading			Lymphgefäßinfiltration	
G1	5 (6%)		L0	20 (25%)
G2	39 (49%)		L1	42 (52,5%)
G3	35 (44%)		Lx	18 (22,5%)
Gx	1 (1%)			
Gefäßinfiltration			Perineurale Infiltration	
V0	34 (43%)		Pn0	2 (3%)
V1	21 (26%)		Pn1	45 (56%)
Vx	25 (31%)		Pnx	33 (41%)

Tabelle 4: Klinisch-pathologische Daten des STAT5b-Patientenkollektivs

4.2.2 STAT5b-Expression im humanen dukталen Adenokarzinom des Pankreas

Die STAT5b-Expression wurde in den immunhistochemischen Färbungen anhand eines braunen Präzipitats lokalisiert. Dieses konnte sowohl nukleär, als auch zytoplasmatisch in den Pankreasadenokarzinomzellen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ließ sich in den tumorumgebenden Azini- und Duktalzellen des Pankreas nur bei wenigen Tumorschnitten eine geringe STAT5b-Expression detektieren. Insgesamt zeigten 43/80 (54%) Tumorschnitte eine positive nukleäre STAT5b-Expression (>10%). Davon wiesen 27 (34%) eine schwache und 16 (20%) eine starke Intensität auf. Zusätzlich erfolgte eine weitere Unterteilung der nukleär positiven Fälle in schwache Expression (10-30%) und starke Expression (>30%). Dabei zeigten 24/80 Tumorschnitte (30%) eine schwache Expression und 19/80 Schnitte (24%) eine starke Expression von STAT5b (vgl. Tabelle 5). Eine zytoplasmatische STAT5b-Expression wurde bei insgesamt 40/80 (50%) Tumorschnitten festgestellt (siehe Tabelle 6). In Abbildung 4 sind exemplarisch immunhistochemisch gefärbte Tumorschnitte abgebildet.

Auswertbare Fälle	STAT5b nukleär positiv		STAT5b nukleär negativ
	Schwache Intensität	Starke Intensität	
80 (100%)	43 (54%)		37 (46%)
	27 (34%)	16 (20%)	
	Schwache Expression (10-30%)	Starke Expression (>30%)	
	24 (30%)	19 (24%)	

Tabelle 5: Nukleäre STAT5b-Expression in immunhistochemischen Färbungen

Auswertbare Fälle	STAT5b zytoplasmatisch positiv	STAT5b zytoplasmatisch negativ
	40 (50%)	40 (50%)

Tabelle 6: Zytoplasmatische STAT5b-Expression in immunhistochemischen Färbungen

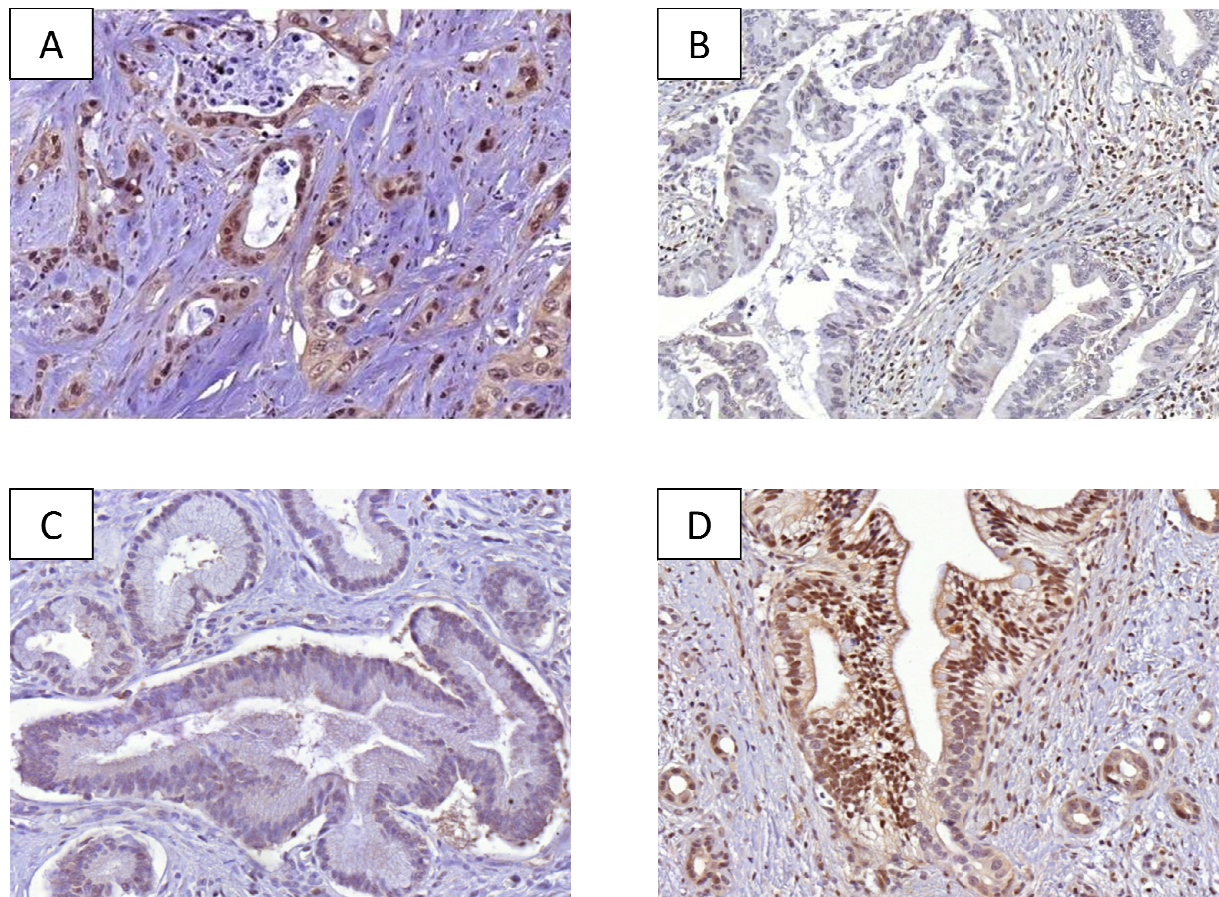


Abbildung 4: (A) nukleär positive starke STAT5b-Expression (>30%) in Pankreasadenokarzinomzellen, Vergrößerung: 210-fach
 (B) nukleär negative STAT5b-Expression in Pankreasadenokarzinomzellen, Vergrößerung: 210-fach
 (C) nukleär positive schwache STAT5b-Expression (10-30%) in Pankreasadenokarzinomzellen, Vergrößerung: 210-fach
 (D) zytoplasmatisch positive STAT5b-Expression in Pankreasadenokarzinomzellen, Vergrößerung: 180-fach

4.2.3 Korrelationsanalysen der nukleären STAT5b-Expression und klinisch-pathologischen Parametern sowie Gesamtüberleben der Patienten

Die Korrelationsanalysen der nukleären STAT5b-Expression und klinisch-pathologischen Parametern sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Dabei zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Patientenalter (jünger vs. älter 50 Jahre), Geschlecht (männlich, weiblich), Tumorlokalisation (Pankreaskopf vs. Pankreasschwanz), lokaler Tumorausdehnung

(T-Stadium), Lymphknotenmetastasierung (N-Stadium), Fernmetastasierung (M-Stadium), histologischem Tumordifferenzierungsgrad (Grading) sowie Resektionsstatus (R) und nukleärer STAT5b-Expression.

Auswertbare Fälle	Variable	Anzahl	STAT5b nukleär negativ	STAT5b nukleär positiv	P-Wert
80 (100%)	Total	80	37	43	
80 (100%)	Altersgruppe				
	≤ 50 Jahre	7	3	4	1,000
	> 50 Jahre	73	34	39	
80 (100%)	Geschlecht				
	Männlich	52	24	28	1,000
	Weiblich	28	13	15	
80 (100%)	Tumorlokalisation				
	Pankreaskopf	58	29	29	0,3221
	Pankreasschwanz	22	8	14	
80 (100%)	Tumorausdehnung				
	T1 - T2	8	5	3	0,4608
	T3 - T4	72	32	40	
80 (100%)	Lymphknotenstatus				
	N0	22	10	12	1,000
	N1	58	27	31	
49 (61%)	Fernmetastasierung				
	M0	44	22	22	0,3532
	M1	5	1	4	
79 (99%)	Grading				
	G1 – G2	44	22	22	0,6506
	G3	35	15	20	
78 (98%)	Resektionsstatus				
	R0	58	30	28	0,2990
	R1 – R2	20	7	13	

Tabelle 7: Korrelationsanalysen der nukleären STAT5b-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

Nachdem in o.a. Aufstellung kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden konnte, erfolgte eine weitere Korrelationsanalyse der nukleären STAT5b-Expression, unterteilt in nukleär negativ (<10%), nukleär schwache Expression (10-30%), sowie nukleär starke Expression (>30%) und klinisch-pathologischen Parametern, wo sich ebenfalls keine signifikante Korrelation zeigte.

In einer weiteren Analyse wurde die nukleäre STAT5b-Expression hinsichtlich Gesamtüberlebensdauer der Patienten untersucht. Dabei zeigte sich der Trend (statistisch nicht signifikant, $P = 0,276$), dass Patienten mit positiver nukleärer STAT5b-Expression (>10%) im Vergleich zu Patienten mit negativer nukleärer STAT5b-Expression (<10%) eine reduzierte Gesamtüberlebensdauer aufweisen (Abb. 5).

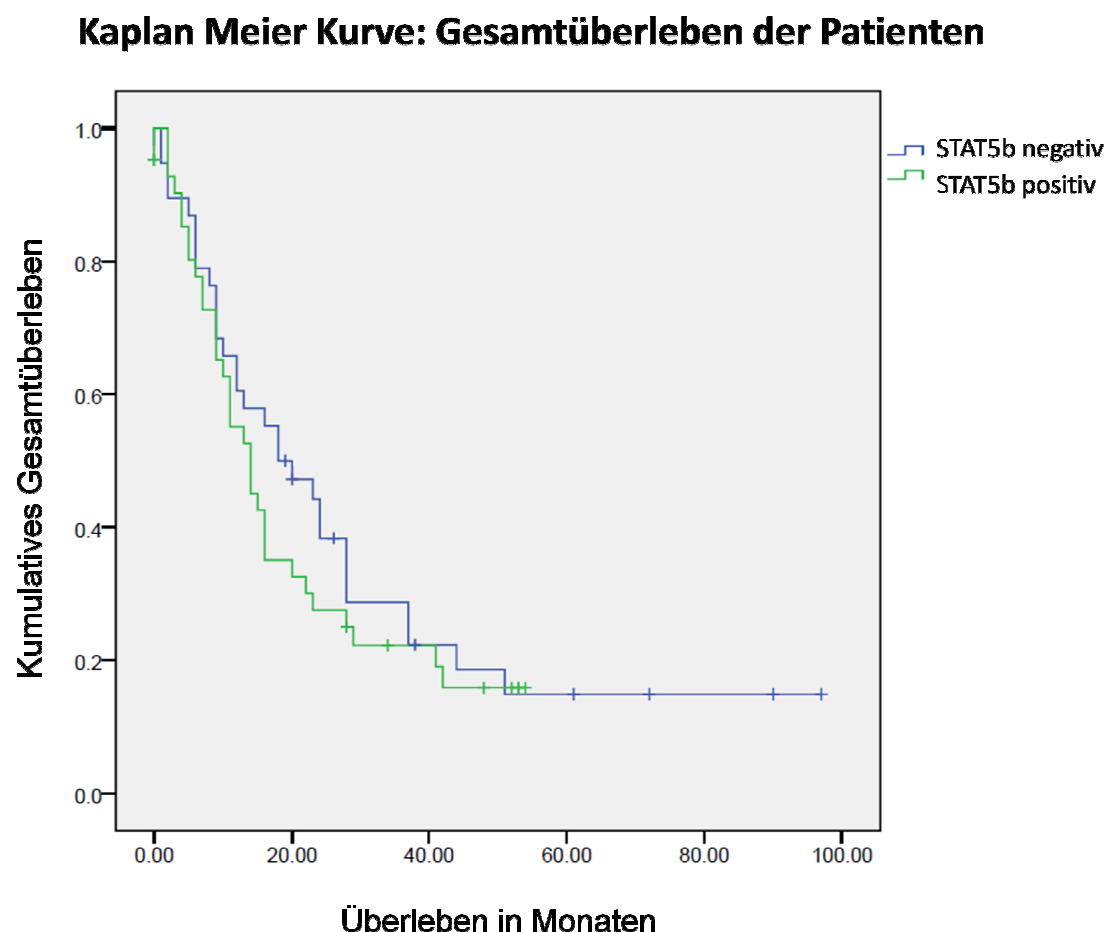


Abbildung 5: Kaplan Meier Kurve: Gesamtüberleben der Patienten.

Patienten mit positiver nukleärer STAT5b-Expression zeigen einen Trend (statistisch nicht signifikant, $P = 0,276$) hin zu kürzerer Gesamtüberlebensdauer im Vergleich zu Patienten mit negativer nukleärer STAT5b-Expression.

4.2.4 Korrelationsanalysen der zytoplasmatischen STAT5b-Expression und klinisch-pathologischen Parametern der Patienten

Zusätzlich wurde eine Korrelationsanalyse der zytoplasmatischen STAT5b-Expression und klinisch-pathologischen Parametern durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 8 zusammengefasst sind. Dabei steht zwar die zytoplasmatische STAT5b-Expression in keinem Zusammenhang mit Patientenalter (jünger vs. älter 50 Jahre), Geschlecht (männlich, weiblich), Tumorlokalisierung (Pankreaskopf vs. Pankreasschwanz), Lymphknotenmetastasierung (N-Stadium), Fernmetastasierung (M-Stadium), histologischem Tumordifferenzierungsgrad (Grading) sowie Resektionsstatus (R), aber die Tumorausdehnung (T-Stadium) korreliert nahezu signifikant ($P = 0,0568$) mit der zytoplasmatischen STAT5b-Expression. Somit zeigen fast alle T1- und T2-Tumore (7/8, entspricht 87,5%) zytoplasmatisch keine STAT5b-Expression, wohingegen die Mehrheit aller T3- und T4-Tumore (39/72, entspricht 54%) zytoplasmatisch eine positive STAT5b-Expression aufweisen.

Auswertbare Fälle	Variable	Anzahl	STAT5b zytoplasmatisch negativ	STAT5b zytoplasmatisch positiv	P-Wert
80 (100%)	Total	80	40	40	
80 (100%)	Altersgruppe				
	≤ 50 Jahre	7	3	4	1,000
	> 50 Jahre	73	37	36	
80 (100%)	Geschlecht				
	Männlich	52	27	25	0,8149
	Weiblich	28	13	15	
80 (100%)	Tumorlokalisation				
	Pankreaskopf	58	31	27	0,4531
	Pankreasschwanz	22	9	13	
80 (100%)	Tumorausdehnung				
	T1 - T2	8	7	1	0,0568
	T3 - T4	72	33	39	
80 (100%)	Lymphknotenstatus				
	N0	22	11	11	1,000
	N1	58	29	29	
49 (61%)	Fernmetastasierung				
	M0	44	20	24	0,6550
	M1	5	3	2	
79 (99%)	Grading				
	G1 – G2	44	23	21	0,8224
	G3	35	17	19	
78 (98%)	Resektionsstatus				
	R0	58	31	27	0,4531
	R1 – R2	20	9	13	

Tabelle 8: Korrelationsanalysen der zytoplasmatischen STAT5b-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

4.2.5 Inhibition von STAT5b mittels shRNA-kodierender Plasmide in Pankreaskarzinomzellen *in vitro*

Um den Effekt einer STAT5b-Inhibition auf das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* zu untersuchen, wurden stabil transfizierte HPAF-II-Tumorzellen verwendet. Die spezifische Herabregulierung, der sog. „knock-down“ von STAT5b wurde zunächst mithilfe eines Westernblots auf Proteinebene verifiziert (Abb. 6). Dabei zeigte sich eine deutlich reduzierte STAT5b-Proteinexpression bei beiden stabil transfizierten STAT5b Klonen 1 und 2 im Vergleich zu untransfizierten und Kontrollvektor-transfizierten HPAF-II-Zellen.

Westernblot: stabil transfizierte HPAF-II-Tumorzellen

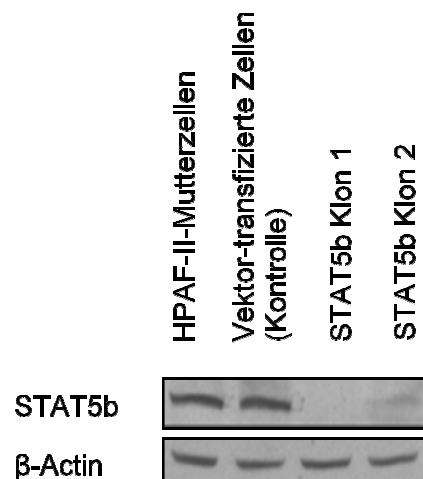


Abbildung 6: Westernblot zur Verifizierung des STAT5b-„knock-down“ stabil transfizierter HPAF-II-Tumorzellen. Die Klone 1 und 2 weisen eine deutlich reduzierte STAT5b-Proteinexpression im Vergleich zu untransfizierten und Kontrollvektor-transfizierten HPAF-II-Zellen auf. β-Actin dient als interne Ladekontrolle.

Analysen der Tumorzellen zeigten, dass der STAT5b-„knock-down“ bei stabil transfizierten HPAF-II- und L3.6pl-Tumorzellen im Vergleich zu untransfizierten und Kontrollvektor-transfizierten HPAF-II-Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden keinen signifikanten Effekt auf das Tumorzellwachstum *in vitro* hat.

5 DISKUSSION

5.1 mTOR

5.1.1 phospho-mTOR-Expression

Bisherige Studien weisen bei vielen verschiedenen Tumorentitäten wie Bronchial-, Mamma-, Magen-, oder hepatozellulärem Karzinom auf eine verstärkte Aktivierung von mTOR hin.⁴⁰⁻⁴⁴ Bezüglich maligner Entartungen des Pankreas konnten Asano *et al.* eine erhöhte mTOR-Aktivierung bei Pankreasadenokarzinomzelllinien nachweisen.⁷⁴ In Übereinstimmung dazu zeigt auch die vorliegende Studie, dass phospho-mTOR in vier Fünftel (62/77, entspricht 81%) der untersuchten duktaalen Pankreasadenokarzinome exprimiert ist, wodurch dessen Rolle als mögliches „Target“ einer spezifischen molekularen zielgerichteten Therapie bekräftigt wird. Unterschiede fallen dagegen beim Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit anderen Studien hinsichtlich der Angaben zur phospho-mTOR-Expression in Bezug auf Gesamtüberleben und klinisch-pathologische Parameter der Patienten auf. Während Kennedy *et al.* auf eine signifikante Korrelation zwischen verstärkter mTOR-Aktivierung und geringerer Gesamtüberlebensdauer bei Patienten mit duktaalem Adenokarzinom des Pankreas hinweisen, ergibt sich in der vorliegenden Analyse kein Anhalt für eine mögliche Korrelation zwischen zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression und Gesamtüberleben der Patienten.⁸¹ Ebenso unterscheiden sich die Untersuchungsergebnisse von Murayama *et al.*, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression und fortgeschrittenem Tumorstadium sowie Lymphknotenmetastasierung bei Magenkarzinompatienten postulieren von den vorliegenden Daten, die auf keine Korrelation zwischen zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern hindeuten.⁴⁴ Allerdings konnten Zhou *et al.* bei Untersuchungen mit Mammakarzinompatienten ebenfalls keine Korrelationen zwischen phospho-mTOR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern wie Tumorstadium, Lymphknotenmetastasierung oder histologischem Differenzierungsgrad nachweisen.⁴⁰ Boone *et al.* fanden in Analysen bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus lediglich einen signifikanten Zusammenhang zwischen phospho-mTOR-Expression und histologischem Tumordifferenzierungsgrad.⁸² Somit stellt sich die Frage, ob ein mögliches „Target“ wie mTOR zwingend mit klinisch-pathologischen Erkrankungsparametern sowie dem Gesamtüberleben der Patienten korrelieren muss, oder stattdessen unabhängig davon, allein durch verstärkte Expression in Tu-

morzellen, seinen Zweck als Angriffspunkt einer molekularen zielgerichteten Therapie erfüllt. Dennoch sollten die möglichen Ursachen für die Diskrepanz der vorliegenden Untersuchungsergebnisse zu denen der Studien mit signifikanten Korrelationsergebnissen diskutiert werden. So kommen einerseits oft unterschiedliche Antikörper, Gewebepräparationen und Färbemethoden zum Einsatz, andererseits spielt die vom auswertenden Pathologen abhängige und damit subjektive Interpretation der immunhistochemischen Färbungen eine wichtige Rolle hinsichtlich der teilweise eingeschränkten Vergleichbarkeit vieler Studien. Darüber hinaus werden meist differierende Positivitätskriterien bzw. Grenzwerte bei den immunhistochemischen Auswertungen angewendet. Diesbezüglich wird die Notwendigkeit standardisierter Färbe- und Auswerteverfahren deutlich, um immunhistochemische Ergebnisse verschiedener Studien besser miteinander vergleichen zu können. Kritisch muss an dieser Stelle auch die kleine Fallzahl des untersuchten Patientenkollektivs betrachtet werden, wodurch ebenfalls von der Literatur abweichende Ergebnisse denkbar sind. Orientiert man sich an der Patientenzahl der Studie von Murayama *et al.*, liegt diese mit 109 untersuchten Patienten deutlich über der von 77 untersuchten Patienten in der vorliegenden Studie.⁴⁴ Die Analyse eines größeren Patientenkollektivs hinsichtlich phospho-mTOR-Expression sollte deshalb Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

5.1.2 mTOR-Inhibition bei Pankreasadenokarzinomzellen *in vitro*

Um das Potential einer mTOR-Inhibition auf das Pankreastumorzellwachstum *in vitro* zu evaluieren, wurde in dieser Studie der pharmakologische mTOR-Inhibitor Rapamycin in MTT-Tests bei drei verschiedenen Pankreastumorzelllinien (L3.6pl, HPAF-II, BxPc3) eingesetzt, für den bereits bei mehreren Tumorentitäten eine signifikante Hemmung des Tumorzellwachstums nachgewiesen werden konnte. In einer Studie der Arbeitsgruppe Zhang *et al.* aus dem Jahr 2007 zeigte sich bei hepatozellulären Karzinomzellen *in vitro* einerseits eine signifikante zeit- und dosisabhängig Tumorzellwachstumshemmung unter Rapamycin, andererseits stellten die Autoren eine Rapamycin-abhängige Apoptoseinduktion durch Aktivierung der Cysteinprotease Caspase 3 sowie eine Beeinträchtigung des mitochondrialen Membranpotentials fest.⁸³ Bei Untersuchungen mit Blasenkarzinomzellen konnten Fechner *et al.* in einer 2009 veröffentlichten Studie ebenfalls unter Rapamycin-Behandlung eine signifikante Hemmung des Tumorzellwachstums *in vitro* nachweisen.⁸⁴ In einer 2010 publizierten Studie von Xu *et al.* stellten die Autoren bei der Behandlung von Magenkarzinomzellen mit-

tels Everolimus, einem Rapamycin-Derivat, eine signifikante dosisabhängige Hemmung des Tumorzellwachstums *in vitro* durch Herabregulation der Expression von phospho-p70s6k, c-Myc, Cyclin D1 und Bcl-2 sowie Hochregulation von p53 fest.⁸⁵ Lang *et al.* konnten bei Untersuchungen mit Magenkarzinomzellen zwar nur einen geringen Effekt von Rapamycin auf das Tumorzellwachstum *in vitro* nachweisen, in einem subkutanen Tumormodell bei Mäusen zeigte sich jedoch eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums sowie der Tumervaskularisation *in vivo*.⁴³ In Bezug auf Pankreaskarzinomzellen untersuchten Shen *et al.* in einer 2008 veröffentlichten Studie anhand von MTT-Tests, den Effekt einer Rapamycin-Behandlung alleine, sowie in Kombination mit dem Immunsuppressivum FTY720 (Fingolimod) auf das Tumorzellwachstum *in vitro*. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der Tumorzellproliferation für beide Wirkstoffe alleine, sowie in Kombination, wobei eine kombinierte Behandlung zusätzlich einen überadditiven Effekt aufwies. Darüber hinaus stieg die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber einer Rapamycin-Therapie unter FTY720-Behandlung in signifikantem Maße an.⁸⁶ Bruns *et al.* gelang es im Rahmen einer experimentellen Studie ebenfalls eine signifikante Wachstumshemmung von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* bei Behandlung mittels Rapamycin alleine oder in Kombination mit Gemcitabin festzustellen.⁸⁷ In einer Untersuchung mit Pankreaskarzinomzellen aus dem Jahr 2007 von Wang *et al.* zeigte sich neben einer signifikanten dosisabhängigen Wachstumsinhibition der Tumorzellen *in vitro* eine signifikante Reduktion der HIF-1 α -und VEGF-Protein-Expression bei der Behandlung mittels Rapamycin.⁸⁸ In Übereinstimmung dazu kann in der vorliegenden Studie eine signifikante Hemmung des Tumorzellwachstums *in vitro* bei einer Rapamycin-Konzentration von 1 nM nach 72 Stunden für alle drei untersuchten Pankreastumorzelllinien beobachtet werden. Bei einer Tumorzelllinie (L3.6pl) führt dieselbe Rapamycin-Konzentration von 1 nM bereits nach 24 und 48 Stunden zu einer signifikanten Wachstumsinhibition der Tumorzellen. Diese Resultate untermauern die These, dass mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin zu einer signifikanten Hemmung des Tumorzellwachstums von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* führen können und damit eine potentielle Therapiemöglichkeit bei Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas darstellen. Weitere klinische Studien sind notwendig, um das kurative Potential sowie die möglichen Risiken einer solchen Therapie exakter zu evaluieren. Diesbezüglich konnten Bruns *et al.* anhand eines Tiermodells bei Mäusen mit Pankreastumoren nach Behandlung mittels Rapamycin eine signifikante Reduktion

des Tumorstadiums *in vivo* feststellen, die eine ebenfalls signifikante Tumorstadiumsenkung nach Behandlung mittels Gemcitabin um mehr als das Zweifache überstieg.⁸⁷

5.2 STAT5b

5.2.1 STAT5b-Expression

Durch wachsendes Interesse an der Gruppe der STAT-Transkriptionsfaktoren, nicht zuletzt vor dem Hintergrund möglicher innovativer Tumortherapiestrategien mehren sich wissenschaftliche Publikationen zur Bedeutung von STAT5b bezüglich unterschiedlicher Tumorentitäten. Der Arbeitsgruppe von Lee *et al.* gelang in einer 2006 veröffentlichten Studie mit hepatozellulären Karzinomen der Nachweis einer gesteigerten nukleären STAT5b-Expression in 34/50 (68%) untersuchten Tumorschnitten.⁷⁰ Bei Analysen von 46 Patienten mit Colonadenom und 38 Patienten mit Colonkarzinom stellten Xiong *et al.* eine signifikant höhere zytoplasmatische Expression von STAT5 im Vergleich zu histologisch normaler Colonmukosa fest.⁶⁹ In einer 2011 publizierten Studie mit vergleichsweise hoher Fallzahl (n = 169 Patienten mit Adenokarzinom des Colon) konnten Mao *et al.* in 81/169 Fällen (47,9%) ebenfalls eine verstärkte zytoplasmatische Expression von aktiviertem STAT5 nachweisen, wobei in keiner von beiden Studien eine Differenzierung zwischen STAT5a und STAT5b vorgenommen wurde.⁶⁸ In Bezug auf maligne Entartungen des Pankreas stellten Kataoka *et al.* in einer 2007 veröffentlichten Studie eine gesteigerte nukleäre Expression von STAT5b bei 14/21 (67%) untersuchten IPMCs („intraductal papillary mucinous carcinomas“), im Vergleich zu 0/11 (0%) analysierten IPMAs („intraductal papillary mucinous adenomas“) sowie nicht pathologisch verändertem duktalem Pankreasparenchym fest.⁵⁴ Diese Angaben sind gut vereinbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Hierbei zeigen immunhistochemische Färbungen in 43/80 (54%) Fällen eine nukleäre STAT5b-Expression und in 40/80 (50%) Fällen eine zytoplasmatische STAT5b-Expression, wodurch eine mögliche „Target“-Funktion von STAT5b bei spezifischen molekularen zielgerichteten Therapien positiv bekräftigt wird.

Entgegen den Erkenntnissen anderer Autoren, dass die STAT5b-Expression in Zusammenhang mit fortgeschrittenem Tumorstadium oder schlechter Krankheitsprognose bei Tumorentitäten wie hepatozellulärem Karzinom oder kolorektalem Karzinom steht,⁶⁸⁻⁷⁰ kann in der vorliegenden Studie lediglich ein statistisch nicht signifikanter Trend nachgewiesen werden, dass Patienten mit positiver nukleärer STAT5b-Expression eine geringere Gesamtüberle-

bensdauer aufweisen, als Patienten mit negativer nukleärer STAT5b-Expression. In Bezug auf klinisch-pathologische Parameter zeigen die vorliegenden Untersuchungsergebnisse lediglich eine nahezu signifikante Korrelation zwischen zytoplasmatischer STAT5b-Expression und Pankreaskarzinomausdehnung (T-Stadium). Diese Varianz der Ergebnisse könnte u.a. auf die Auswahl der untersuchten Tumorproben zurückzuführen sein, denn in die vorliegende Studie sind ausschließlich Patienten eingeschlossen, welche mit kurativer Intention therapiert wurden. Da insgesamt nur ca. 20% aller Pankreaskarzinompatienten einer chirurgischen Behandlung mit kurativem Therapieziel zugeführt werden können, ist das vorliegende Patientenkollektiv möglicherweise als nicht repräsentativ für die Gesamtheit aller Pankreaskarzinompatienten anzusehen.¹⁵ Inwieweit die STAT5b-Expression bei weiter fortgeschrittenen Tumorstadien, von den bestehenden Untersuchungsergebnissen abweichen und gegebenenfalls Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern oder der Gesamtüberlebensdauer von Patienten aufweisen würde, sollte anhand weiterer wissenschaftlicher Arbeiten eruiert werden. Darüber hinaus könnte auch die geringe Fallzahl des analysierten Patientenkollektivs ein Grund für die Diskrepanz der Untersuchungsergebnisse sein, denn mit 80 untersuchten Patienten umfasst diese Studie beispielsweise im Vergleich zur Studie von Mao *et al.* mit 169 analysierten Patienten ein nur halb so großes Patientenkollektiv.⁶⁸ Auf mögliche Differenzen der Ergebnisse durch unterschiedliche Färbemethoden, Verwendung von Antikörpern unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität sowie individueller Definitionen von Grenzwerten und Positivitätskriterien bei immunhistochemischen Färbungen wurde bereits unter 5.1.1. hingewiesen.

5.2.2 STAT5b-Inhibition bei Pankreasadenokarzinomzellen *in vitro*

Um den Einfluss einer STAT5b-Inhibition auf das Tumorzellwachstum von Pankreasadenokarzinomzellen *in vitro* zu analysieren, wurden in dieser Studie HPAF-II-Tumorzellen mithilfe STAT5b-shRNA-kodierender Plasmide stabil transfiziert. Zur Verifizierung des STAT5b-„knock-down“ auf Proteinebene wurde ein Westernblot durchgeführt, der eine deutlich reduzierte STAT5b-Proteinexpression bei beiden stabil transfizierten STAT5b-Klonen im Vergleich zu untransfizierten und Kontrollvektor-transfizierten HPAF-II-Zellen zeigt. Anhand von Tumorzellanalysen konnte jedoch kein signifikanter Effekt des STAT5b-„knock-down“ auf das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* nachgewiesen werden. Demgegenüber postulierten Wang *et al.* in einer 2011 veröffentlichten Studie, dass bei

humane Leukämiezellen, die mittels „STAT5b decoy oligodeoxynucleotides“ behandelt wurden, eine dosisabhängige Wachstumshemmung der Tumorzellen *in vitro* sowie eine Induktion der zelleigenen Apoptose nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus registrierten die Autoren eine Herabregulation der Expression von STAT5-„Target“-Proteinen wie Bcl-xL, Cyclin D1 und c-Myc sowohl auf mRNA-Niveau, als auch auf Protein-Ebene.⁸⁹ In Übereinstimmung dazu stellten Xiong *et al.* bei Untersuchungen mit STAT5b-siRNA-transfizierten kolorektalen Karzinomzellen eine Suppression des Tumorzellwachstums *in vitro* fest. Die niedrigste Anzahl an Tumorzellen ermittelten die Autoren 72 Stunden nach Transfektion. Zusätzlich war in dieser Studie ein Anstieg des Anteils an Tumorzellen, die sich in der G0/G1-Phase des Zellzyklus befanden von 38,6% in unbehandeltem Zustand auf 64,1% 72 Stunden nach Transfektion zu verzeichnen. Die Ergebnisse zeigten darüber hinaus eine Expressionssteigerung der Proteine p16^{ink4a}, p21^{waf1/cip1} und p27^{kip1}, was die Annahme der Autoren bekräftigte, dass STAT5b eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation einnimmt.⁶⁹ In einer 2010 publizierten Studie wiesen Gu *et al.* bei STAT5b-siRNAs-transfizierten Prostatakarzinomzellen ebenfalls 72 Stunden nach Transfektion eine signifikante Wachstumshemmung der Tumorzellen *in vitro* nach. Anhand morphologischer Tumorzellanalysen stellten die Autoren darüber hinaus einen deutlichen Anstieg an STAT5b-siRNA-transfizierten Tumorzellen fest, die histologische Korrelate einer Apoptose, wie beispielsweise Zellrundung und Zellschrumpfung aufwiesen.⁶⁴ Wenngleich in der vorliegenden Studie keine signifikante Wachstumshemmung von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* unter Behandlung mittels STAT5b-shRNA-kodierender Plasmide nachzuweisen ist, sollte aufgrund oben genannter Studienergebnisse anderer Autoren eine STAT5b-Inhibition dennoch als potentielle Therapiemöglichkeit bei Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas im Rahmen klinischer Studien eingehender untersucht werden. Möglicherweise beeinflusst der Transkriptionsfaktor STAT5b aber auch andere tumorassoziierte Mechanismen wie beispielsweise Angiogenese und Motilität von Pankreastumoren. In einer 2012 veröffentlichten Studie von Moser *et al.* konnte bezüglich Angiogenese, welche selbst bei Pankreastumoren, die typischerweise durch eine eher geringe Vaskularisierung charakterisiert sind, essenziell für das Tumorwachstum ist, eine signifikante Reduktion der VEGF-A-Produktion in STAT5b-shRNA-transfizierten Pankreaskarzinomzellen *in vitro* nachgewiesen werden. Die Autoren stellten deshalb die These auf, dass eine Inhibition von STAT5b durch Herabregulation der VEGF-A-Produktion und damit Beeinflussung der Angiogenese potenziell zu einer Tumorwachstumshemmung führen kann.⁹⁰

Gestützt werden diese Daten durch Studienergebnisse von Xiong *et al.*, die ebenfalls eine signifikante Reduktion der VEGF-Sekretion bei STAT5-siRNA-transfizierten kolorektalen Karzinomzellen *in vitro* 48 Stunden nach Transfektion feststellen konnten, wobei keine Differenzierung zwischen STAT5a und STAT5b erfolgte.⁶⁹ Bei Untersuchungen bezüglich Tumorzellmotilität gelang es Moser *et al.* mithilfe der Boyden-Kammer Methode nachzuweisen, dass eine Inhibition von STAT5b sowohl konstitutiv, als auch IL-6/EGF-induziert zu einer signifikanten Reduktion der Motilität von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* führt.⁹⁰ Lee *et al.* konnten in einer 2006 veröffentlichten Studie mit hepatozellulären Karzinomzellen darlegen, dass STAT5b ein Mediator der epithelial-mesenchymalen Transition ist, welche unter anderem in Bezug zu Tumorinvasivität und Metastasierung steht.⁷⁰ Das breite Einflusspektrum des Transkriptionsfaktors STAT5b auf tumorassoziierte Mechanismen sollte deshalb Gegenstand weiterführender wissenschaftlicher Studien sein.

6 WERTUNG UND AUSBLICK

In Bezug auf die eingangs gestellte Frage, ob mTOR und STAT5b in duktalem Adenokarzinomen des Pankreas exprimiert werden, ließ sich im Rahmen dieser Untersuchung für mTOR ein hoher Expressionsanteil von 81% der analysierten Pankreastumore verzeichnen. Der Transkriptionsfaktor STAT5b war immerhin in mindestens der Hälfte der untersuchten Pankreaskarzinome exprimiert. Aufgrund dessen kommen beide als potentielle Zielstrukturen zur Behandlung des duktalem Adenokarzinom des Pankreas infrage.

7 ZUSAMMENFASSUNG

7.1 mTOR

Im Rahmen dieser Dissertation wurden 77 Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas hinsichtlich ihrer phospho-mTOR-Expression analysiert. In immunhistochemischen Färbungen zeigten 62/77 (81%) Tumorschnitte eine zytoplasmatische phospho-mTOR-Expression. Korrelationsanalysen wiesen auf keinen signifikanten Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern sowie Gesamtüberleben der Patienten hin. Darüber hinaus wurde keine signifikante Korrelation zwischen zytoplasmatischer phospho-mTOR-Expression und nukleärer STAT5b-Expression festgestellt. Eine pharmakologische mTOR-Inhibition mittels Rapamycin führte in Analysen zu einer signifikanten Wachstumshemmung von Pankreasadenokarzinomzellen *in vitro*. Somit stellt mTOR angesichts der hohen Expression in Pankreastumoren und der signifikanten Tumorzellwachstumshemmung durch Rapamycin eine vielversprechende potentielle Zielstruktur zukünftiger Pankreaskarzinomtherapien dar.

7.2 STAT5b

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden zudem Proben von 80 Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas hinsichtlich ihrer STAT5b-Expression untersucht. Immunhistochemische Färbungen zeigten in 43/80 (54%) Fällen eine nukleäre STAT5b-Expression und in 40/80 (50%) Fällen eine zytoplasmatische STAT5b-Expression. Anhand von Korrelationsanalysen wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen nukleärer STAT5b-Expression und klinisch-pathologischen Parametern der Patienten festgestellt. Es zeigte sich hingegen ein statistisch nicht signifikanter Trend zu reduziertem Gesamtüberleben bei Patienten mit positiver nukleärer STAT5b-Expression. Zudem korrelierte die zytoplasmatische STAT5b-Expression nahezu signifikant mit der Pankreastumorausdehnung (T-Stadium), wohingegen kein Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer STAT5b-Expression und anderen klinisch-pathologischen Parametern festgestellt werden konnte. shRNA vermittelte Blockade von STAT5b zeigte jedoch keinen Effekt auf das Wachstum von Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro*. Aufgrund der Expression in mindestens 50% der untersuchten Pankreastumore und des breiten Einflusspektrums auf tumorassoziierte Mechanismen kommt STAT5b als mögliche Zielstruktur zukünftiger Pankreaskarzinomtherapien in Betracht.

8 ANHANG

8.1 Aktuelle TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung der „Union internationale contre le cancer“ (UICC)

Die Art der Tumorthherapie richtet sich neben Entität und Lokalisation eines Karzinoms vor allem nach dem jeweiligen Tumorstadium. Deshalb ist eine präzise Klassifikation der Tumoreigenschaften von entscheidender Bedeutung. Hierzu dient die TNM-Klassifikation maligner Tumoren der UICC, auf deren Grundlage die Einteilung in unterschiedliche Stadien erfolgt. Die folgenden Klassifikationen gelten für Karzinome des exokrinen Pankreas sowie neuroendokrine Tumore eingeschlossen Karzinoide (Tab. 9 und Tab. 10).⁷⁹

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ (schließt auch Läsionen nach der „PanIN-III“ Klassifikation ein)
T1	Tumor begrenzt auf Pankreas, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor begrenzt auf Pankreas, mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich jenseits des Pankreas aus, jedoch ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der A. mesenterica superior
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior

Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen

Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Gx	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Rx	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Tabelle 9: Aktuelle Klassifikation maligner Tumoren des exokrinen Pankreas sowie neuroendokriner Tumoren eingeschlossen Karzinoide, herausgegeben im Jahr 2010. Verändert nach [79]

Tumorstadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium III	T4	Jedes N	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 10: Aktuelle Stadieneinteilung maligner Tumoren des exokrinen Pankreas sowie neuroendokriner Tumoren eingeschlossen Karzinoide, herausgegeben im Jahr 2010. Verändert nach [79]

8.2 Vergleich R0/R1 Klassifikation der UICC und „Royal College of Pathologists“ (RCP)

Die R-Klassifikation beschreibt das Fehlen oder Vorhandensein von Residualtumorgewebe nach chirurgischer Therapie und hat wichtige prognostische Bedeutung.⁷⁹ In der aktuellen UICC Klassifikation wird R1 als Nachweis von Karzinomzellen innerhalb des Resektionsrandes definiert, wohingegen die RCP das Vorhandensein von Karzinomzellen innerhalb 0,1 cm als R1-Status wertet. Aufgrund dieser Basis wurde in einer Studie von Janot *et al.* der Einfluss des Resektionsrandes auf das Gesamtüberleben von 62 Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreaskopfes für beide Klassifikationen analysiert. Hierbei zeigte sich nach UICC-Kriterien eine signifikante Korrelation zwischen N-Status, Grading sowie R-Status und Gesamtüberleben, demgegenüber nach RCP-Kriterien nur ein signifikanter Zusammenhang zwischen N-Status sowie Grading und Gesamtüberleben nachweisbar war. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die R-Klassifikation der RCP keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten hat, weshalb sie den Beibehalt der UICC-Klassifikation empfehlen.⁹¹ In der vorliegenden Studie sind alle Tumoren nach UICC-Kriterien klassifiziert.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arterie
ABAM	Antibiotika/Antimykotika
Abb.	Abbildung
ABC	„Avidin-Biotin-Complex“
Akt	Proteinkinase B
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
Bcl-x(L)	Genprodukt des „ <i>B-cell lymphoma/leukemia-extra (large) gene</i> “
Bcl-2	Genprodukt des „ <i>B-cell lymphoma/leukemia-2 gene</i> “
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
cm	Zentimeter
c-Myc	Genprodukt des „ <i>c-myelocytomatosis gene</i> “
CSF-1	„colony-stimulating factor-1“
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	„epidermal growth factor“
EGFR	„endothelial cell growth factor receptor“
eIF4E	„eukaryotic initiation factor 4E“
EPO	Erythropoetin
et al.	et alteri (und andere)
4E-BP1	„4E binding protein-1“
FKBP12	„FK506 binding protein 12“
FRAP1	„FK506 binding protein-rapamycin-associated protein 1“
G	Grading
g	Gramm
GAS	„γ-interferon-activated sequences“
GH	„growth hormone“
GM-CSF	„granulocyte-macrophage colony stimulating factor“

G0-Phase	Gap0-Phase (Ruhephase im Zellzyklus)
G1-Phase	Gap1-Phase (Präsynthesephase im Zellzyklus)
HE	Hämatoxylin und Eosin
HER2	„human epidermal growth factor receptor 2“
HGF	„hepatocyte growth factor“
HIF-1α	„hypoxia inducible factor 1 alpha“
HRP	„horseradish peroxidase“
IGF	„insulin-like growth factor“
IGF-1R	“insulin-like growth factor 1 receptor“
IL	Interleukin
IPMA	„intraductal papillary mucinous adenoma“
IPMC	„intraductal papillary mucinous carcinoma“
IPMN	„intraductal papillary mucinous neoplasm“
JAK-Kinasen	Janus-Kinasen
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
kDa	Kilodalton
L	Lymphgefäßinvasion
l	Liter
LKB1	„liver kinase B1“
LSAB	„Labelled StreptAvidin-Biotin“
M	Fernmetastasen
M	Molar (Stoffmengenkonzentration)
Mcl-1	Genprodukt des „ <i>Myeloid cell leukemia-1 gene</i> “
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mLST8	„mTOR associated protein, LST8 homolog“
mM	Millimolar
mRNA	„messenger ribonucleic acid“ (Boten-Ribonukleinsäure)
mSIN1	“mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1”
mTOR	“mammalian target of rapamycin”
mTORC1	“mammalian target of rapamycin complex 1”
mTORC2	“mammalian target of rapamycin complex 2”
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N	regionäre Lymphknotenmetastasen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
P	“p-value” (Signifikanzwert)
PanIN	“pancreatic intraepithelial neoplasia”
PBS	„phosphate buffered saline“
PDGF	„platelet-derived growth factor“
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIKKS	„phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases“
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
Pn	Perineurale Infiltration
PRL	Prolaktin
PTEN	„phosphatase and tensin homolog“
P53	„protein 53“
R	Resektionsstatus
RAFT1	„rapamycin and FK506-binding protein-target 1“
Rapa	Rapamycin
RAPTOR	„regulatory associated protein of mTOR“
RCP	„Royal College of Pathologists“
RICTOR	“rapamycin-insensitive companion of mTOR“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„revolutions per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute Medium“
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	“standard error of the mean”
shRNA	“ short hairpin RNA”
siRNA	„small interfering RNA“
SH2	„Src-homology 2“

sog.	sogenannt
SPSS	„Statistical Package for the Social Sciences“
S-Phase	Synthesephase im Zellzyklus
STAT5b	“signal transducer and activator of transcription 5b”
T	Lokale Ausbreitung des Primärtumors
TBS-T	„Tris-Buffered-Saline-Tween-20“
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tis	Carcinoma in situ
TKI	„tyrosine kinase inhibitor“
TNM	„tumor, node, metastasis“
TPO	Thrombopoetin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC1	„tuberous sclerosis complex 1“
TSC2	„tuberous sclerosis complex 2“
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
TYK2	Tyrosinkinase 2
u.a.	unter anderem
UICC	„Union internationale contre le cancer“
USA	United States of America
V	Gefäßinfiltration
V	Volt
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-917.
2. Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Dig Dis* 2010;28:645-56.
3. Böcker W, Heitz PU. *Pathologie*: Elsevier, Urban&FischerVerlag; 2008.
4. Andreotti G, Silverman DT. Occupational risk factors and pancreatic cancer: a review of recent findings. *Mol Carcinog* 2012;51:98-108.
5. Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:699-708.
6. Pandol S, Gukovskaya A, Edderkoui M, Dawson D, Eibl G, Lugea A. Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: Role of the stellate cell. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27 Suppl 2:127-34.
7. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 2008;3:157-88.
8. Ott C, Heinmoller E, Gaumann A, Scholmerich J, Klebl F. [Intraepithelial neoplasms (PanIN) and intraductal papillary-mucinous neoplasms (IPMN) of the pancreas as precursor lesions of pancreatic carcinoma]. *Med Klin (Munich)* 2007;102:127-35.
9. Real FX, Cibrian-Uhalte E, Martinelli P. Pancreatic cancer development and progression: remodeling the model. *Gastroenterology* 2008;135:724-8.
10. Galvin A, Sutherland T, Little AF. Part 1: CT characterisation of pancreatic neoplasms: a pictorial essay. *Insights Imaging* 2011;2:379-88.
11. Sener SF, Fremgen A, Menck HR, Winchester DP. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* 1999;189:1-7.
12. Grenacher L, Klaus M. [Computed tomography of pancreatic tumors]. *Radiologe* 2009;49:107-23.
13. Boysen AK, Haahr V, Soendergaard G, Yilmaz MK. Metastasis from pancreatic cancer located at the incision line of a mastectomy: a case report and review of literature. *Gastrointest Cancer Res* 2011;4:194-6.
14. Eguia V, Gonda TA, Saif MW. Early detection of pancreatic cancer. *JOP* 2012;13:131-4.
15. Dodson LF, Hawkins WG, Goedegebuure P. Potential targets for pancreatic cancer immunotherapeutics. *Immunotherapy* 2011;3:517-37.
16. Dietel M, Harrison TR, Universitätsklinikum C. *Harrisons Innere Medizin: ABW Wissenschaftsverlag*; 2009.
17. Badger SA, Brant JL, Jones C, et al. The role of surgery for pancreatic cancer: a 12-year review of patient outcome. *Ulster Med J* 2010;79:70-5.
18. Friess H, Kleeff J, Fischer L, Muller M, Buchler MW. [Surgical standard therapy for cancer of the pancreas]. *Chirurg* 2003;74:183-90.
19. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011;378:607-20.
20. Fong Y, Gonen M, Rubin D, Radzyner M, Brennan MF. Long-term survival is superior after resection for cancer in high-volume centers. *Ann Surg* 2005;242:540-4; discussion 4-7.
21. Sharma C, Horowitz D, Chabot J, Saif MW. Adjuvant Therapy of Pancreatic Cancer. Highlights from the "2011 ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA; June 3-7, 2011. *JOP* 2011;12:343-6.
22. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004;350:1200-10.
23. Oettle H, Post S, Neuhaus P, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007;297:267-77.

24. Herreros-Villanueva M, Hijona E, Cosme A, Bujanda L. Adjuvant and neoadjuvant treatment in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2012;18:1565-72.
25. Choi M, Kim R, Saif MW. What options are available for refractory pancreatic cancer? *JOP* 2012;13:163-5.
26. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15:2403-13.
27. Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, et al. 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *J Gastrointest Surg* 2006;10:1199-210; discussion 210-1.
28. Garcea G, Dennison AR, Pattenden CJ, Neal CP, Sutton CD, Berry DP. Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature. *JOP* 2008;9:99-132.
29. He K, Cui B, Li G, Wang H, Jin K, Teng L. The effect of anti-VEGF drugs (bevacizumab and aflibercept) on the survival of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Oncotargets Ther* 2012;5:59-65.
30. Cho IC, Chung J. Current status of targeted therapy for advanced renal cell carcinoma. *Korean J Urol* 2012;53:217-28.
31. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004;18:1926-45.
32. Nguyen SA, Walker D, Gillespie MB, Gutkind JS, Day TA. mTOR Inhibitors and its Role in the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 2012.
33. Loewith R, Jacinto E, Wulschleger S, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 2002;10:457-68.
34. Wang L, Rhodes CJ, Lawrence JC, Jr. Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) by insulin is associated with stimulation of 4EBP1 binding to dimeric mTOR complex 1. *J Biol Chem* 2006;281:24293-303.
35. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 2006;25:6416-22.
36. Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther* 2003;2:S169-77.
37. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 2006;6:729-34.
38. Dancey JE. Therapeutic targets: MTOR and related pathways. *Cancer Biol Ther* 2006;5:1065-73.
39. Holt SV, Logie A, Davies BR, et al. Enhanced apoptosis and tumor growth suppression elicited by combination of MEK and mTOR kinase inhibitors. *Cancer Res* 2012.
40. Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, et al. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin Cancer Res* 2004;10:6779-88.
41. Zhang Y, Zhang JW, Lv GY, Xie SL, Wang GY. Effects of STAT3 Gene Silencing and Rapamycin on Apoptosis in Hepatocarcinoma Cells. *Int J Med Sci* 2012;9:216-24.
42. Ekman S, Wynes MW, Hirsch FR. The mTOR Pathway in Lung Cancer and Implications for Therapy and Biomarker Analysis. *J Thorac Oncol* 2012;7:947-53.
43. Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, et al. Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. *Int J Cancer* 2007;120:1803-10.
44. Murayama T, Inokuchi M, Takagi Y, et al. Relation between outcomes and localisation of p-mTOR expression in gastric cancer. *Br J Cancer* 2009;100:782-8.
45. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489-501.
46. Petroulakis E, Mamane Y, Le Bacquer O, Shahbazian D, Sonenberg N. mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. *Br J Cancer* 2006;94:195-9.

47. Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001;264:29-41.
48. Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N. eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene* 2004;23:3172-9.
49. Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 1996;14:483-510.
50. Varma S, Khandelwal RL. Effects of rapamycin on cell proliferation and phosphorylation of mTOR and p70(S6K) in HepG2 and HepG2 cells overexpressing constitutively active Akt/PKB. *Biochim Biophys Acta* 2007;1770:71-8.
51. Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney Int* 2001;59:3-16.
52. Sun SY, Rosenberg LM, Wang X, et al. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res* 2005;65:7052-8.
53. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 2003;101:2940-54.
54. Kataoka TR, Ioka T, Tsukamoto Y, Matsumura M, Ishiguro S, Nishizawa Y. Nuclear expression of STAT5 in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Int J Surg Pathol* 2007;15:277-81.
55. Calo V, Migliavacca M, Bazan V, et al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2003;197:157-68.
56. Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:211-7.
57. Takeda K, Akira S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:199-207.
58. Hennighausen L, Robinson GW. Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes Dev* 2008;22:711-21.
59. Dagvadorj A, Tan SH, Liao Z, et al. N-terminal truncation of Stat5a/b circumvents PIAS3-mediated transcriptional inhibition of Stat5 in prostate cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:2037-46.
60. Cree IA. Cancer biology. *Methods Mol Biol* 2011;731:1-11.
61. Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004;4:97-105.
62. Johnston PA, Grandis JR. STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges. *Mol Interv* 2011;11:18-26.
63. Wei D, Le X, Zheng L, et al. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 2003;22:319-29.
64. Gu L, Dagvadorj A, Lutz J, et al. Transcription factor Stat3 stimulates metastatic behavior of human prostate cancer cells in vivo, whereas Stat5b has a preferential role in the promotion of prostate cancer cell viability and tumor growth. *Am J Pathol* 2010;176:1959-72.
65. Tran TH, Utama FE, Lin J, et al. Prolactin inhibits BCL6 expression in breast cancer through a Stat5a-dependent mechanism. *Cancer Res* 2010;70:1711-21.
66. Peck AR, Witkiewicz AK, Liu C, et al. Loss of nuclear localized and tyrosine phosphorylated Stat5 in breast cancer predicts poor clinical outcome and increased risk of antiestrogen therapy failure. *J Clin Oncol* 2011;29:2448-58.
67. Ahonen TJ, Xie J, LeBaron MJ, et al. Inhibition of transcription factor Stat5 induces cell death of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278:27287-92.
68. Mao Y, Li Z, Lou C, Zhang Y. Expression of phosphorylated Stat5 predicts expression of cyclin D1 and correlates with poor prognosis of colonic adenocarcinoma. *Int J Colorectal Dis* 2011;26:29-35.
69. Xiong H, Su WY, Liang QC, et al. Inhibition of STAT5 induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human colorectal cancer cells. *Lab Invest* 2009;89:717-25.

70. Lee TK, Man K, Poon RT, et al. Signal transducers and activators of transcription 5b activation enhances hepatocellular carcinoma aggressiveness through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2006;66:9948-56.
71. Jinawath N, Vasoontara C, Jinawath A, et al. Oncoproteomic analysis reveals co-upregulation of RELA and STAT5 in carboplatin resistant ovarian carcinoma. *PLoS One* 2010;5:e11198.
72. Koppikar P, Lui VW, Man D, et al. Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 5 contributes to tumor growth, epithelial-mesenchymal transition, and resistance to epidermal growth factor receptor targeting. *Clin Cancer Res* 2008;14:7682-90.
73. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002;109:1139-42.
74. Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SA. The rapamycin analog CCI-779 is a potent inhibitor of pancreatic cancer cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:295-302.
75. Glienke W, Maute L, Wicht J, Bergmann L. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BGT226 induces cell cycle arrest and regulates Survivin gene expression in human pancreatic cancer cell lines. *Tumour Biol* 2012;33:757-65.
76. Boenisch T. Antikörper. Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden Dako Cytomation Corp, Carpinteria, Ca, USA u Dako Cytomation Hamburg 2003;3:5-13.
77. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
78. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
79. Wittekind C, Meyer HJ. TNM: Klassifikation maligner Tumoren: VCH; 2010.
80. Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol* 2000;10:47-50.
81. Kennedy AL, Morton JP, Manoharan I, et al. Activation of the PIK3CA/AKT pathway suppresses senescence induced by an activated RAS oncogene to promote tumorigenesis. *Mol Cell* 2011;42:36-49.
82. Boone J, Ten Kate FJ, Offerhaus GJ, van Diest PJ, Rinkes IH, van Hillegersberg R. mTOR in squamous cell carcinoma of the oesophagus: a potential target for molecular therapy? *J Clin Pathol* 2008;61:909-13.
83. Zhang JF, Liu JJ, Lu MQ, et al. Rapamycin inhibits cell growth by induction of apoptosis on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Transpl Immunol* 2007;17:162-8.
84. Fechner G, Classen K, Schmidt D, Hauser S, Muller SC. Rapamycin inhibits in vitro growth and release of angiogenetic factors in human bladder cancer. *Urology* 2009;73:665-8; discussion 8-9.
85. Xu DZ, Geng QR, Tian Y, et al. Activated mammalian target of rapamycin is a potential therapeutic target in gastric cancer. *BMC Cancer* 2010;10:536.
86. Shen Y, Wang X, Xia W, et al. Antiproliferative and overadditive effects of rapamycin and FTY720 in pancreatic cancer cells in vitro. *Transplant Proc* 2008;40:1727-33.
87. Bruns CJ, Koehl GE, Guba M, et al. Rapamycin-induced endothelial cell death and tumor vessel thrombosis potentiate cytotoxic therapy against pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:2109-19.
88. Wang Y, Zhao Q, Ma S, Yang F, Gong Y, Ke C. Sirolimus inhibits human pancreatic carcinoma cell proliferation by a mechanism linked to the targeting of mTOR/HIF-1 alpha/VEGF signaling. *IUBMB Life* 2007;59:717-21.
89. Wang X, Zeng J, Shi M, et al. Targeted blockage of signal transducer and activator of transcription 5 signaling pathway with decoy oligodeoxynucleotides suppresses leukemic K562 cell growth. *DNA Cell Biol* 2011;30:71-8.
90. Moser C, Ruemmele P, Gehmert S, et al. STAT5b as molecular target in pancreatic cancer--inhibition of tumor growth, angiogenesis, and metastases. *Neoplasia* 2012;14:915-25.

-
91. Janot MS, Kersting S, Belyaev O, et al. Can the new RCP R0/R1 classification predict the clinical outcome in ductal adenocarcinoma of the pancreatic head? *Langenbecks Arch Surg* 2012.

Webseite:

<http://eu-cancer.iarc.fr>

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. H. J. Schlitt und Prof. E.K. Geissler für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg anfertigen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. S. A. Lang für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas sowie die hervorragende Betreuung. Nur mithilfe seiner hoch geschätzten fachlichen Kompetenz und seinem großen Engagement konnte diese Arbeit entstehen. Er hatte stets ein offenes Ohr für alle Fragen und Probleme und der regelmäßige Austausch sowie die zuverlässige Kommunikation trugen wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. med. P. Rümmele für die Bereitstellung der Tumorproben sowie die exzellente Hilfe bei allen immunhistochemischen Auswertungen bedanken.

Außerdem möchte ich mich sehr herzlich bei D. Gaag bedanken, die mir fachlich außerordentlich engagiert zur Seite stand und auch freundschaftlich stets Rückhalt bot.

Darüber hinaus bedanke ich mich besonders bei C. Wagner, E. Scheiffert und K. Enderle für die professionelle Unterstützung bei allen Versuchsdurchführungen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Institute für Chirurgie und Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg für die gute Arbeitsatmosphäre in den Laboratorien.

Schließlich gilt ein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, deren langjährige und vielseitige Unterstützung meine Ausbildung erst möglich gemacht haben und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.