

Aus dem Bereich Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchung der mTOR-mRNA- und Proteinexpression  
des duktaalen Pankreaskarzinoms, der chronischen Pankreatitis  
und des Pankreasadenoms**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES 2019

vorgelegt von: Dimitrios Avramis

geb. am: 03.05.1993 in München

*Für meine Familie*

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
1.1	Untersuchung der mTOR-mRNA- und Proteinexpression des duktales Pankreaskarzinoms, der chronischen Pankreatitis und des Pankreasadenoms .....	7
1.2	Analysis of the mTOR mRNA and protein expression in the ductal carcinoma of the pancreas, chronic pancreatitis and adenoma of the pancreas .....	7
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>8</b>
2.1	Das Pankreas.....	8
2.1.1	Allgemeines über das Pankreas .....	8
2.1.2	Pathologien des Pankreas .....	9
2.1.2.1	Tumoren des Pankreas .....	9
2.1.2.1.1	Duktales Adenokarzinom.....	9
2.1.2.1.2	Adenome des Pankreas .....	11
2.1.2.1.3	Weitere Tumoren .....	12
2.1.2.2	Pankreatitis.....	13
2.1.2.2.1	Akute Pankreatitis .....	13
2.1.2.2.2	Chronische Pankreatitis.....	13
2.1.2.3	Diabetes mellitus.....	15
2.2	mTOR .....	17
2.2.1	Der mTOR- Signalweg.....	17
2.2.1.1	Upstream-Targets.....	17
2.2.1.2	Downstream-Targets.....	18
2.3	Dysregulationen des mTOR-Signalwegs in Pankreopathologien .....	20
2.4	Ziele der Arbeit.....	21
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.1	Allgemeiner Ablauf .....	22
3.2	Material.....	22
3.2.1	Verbrauchsmaterialien.....	22
3.2.2	Instrumentarien.....	23
3.2.3	Chemikalien und Biochemikalien .....	24
3.2.1	Puffer und Diluenten .....	24
3.2.2	Enzyme und Kits .....	25
3.2.3	Assay on Demand.....	25
3.2.1	Weitere Reagenzien.....	25
3.2.2	Software.....	26
3.3	Methoden .....	26
3.3.1	Das Patientenkollektiv.....	26

3.3.2	Immunhistochemische Untersuchungen.....	30
3.3.2.1	HE-Färbung .....	30
3.3.2.2	IHC-Färbung.....	30
3.3.2.3	Auswertung.....	34
3.3.3	Untersuchung der Genexpression.....	35
3.3.3.1	Proteinisolation .....	35
3.3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	35
3.3.3.3	RNA-Isolation.....	35
3.3.3.4	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	36
3.3.3.5	cDNA-Synthese .....	37
3.3.3.6	PCR.....	37
3.3.3.7	Real-Time-PCR .....	38
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
4.1	Expressionsuntersuchung von mTOR .....	40
4.2	Pankreaskarzinom.....	40
4.2.1	Gesamtbetrachtung in IHC und PCR .....	40
4.2.2	Untersuchung der Zelltypen in der IHC .....	40
4.2.3	Untersuchung anhand klinischer Merkmale.....	43
4.2.3.1	Geschlecht.....	43
4.2.3.2	TNM und Grading .....	43
4.2.3.3	Diabetes mellitus.....	44
4.2.3.4	Adipositas .....	45
4.2.3.5	Hyperlipidämie .....	45
4.2.3.6	Arterielle Hypertonie .....	45
4.2.3.7	CRP .....	45
4.2.3.8	Alkoholabusus .....	46
4.2.3.9	Nikotinabusus .....	46
4.3	Pankreatitis .....	46
4.3.1	Gesamtbetrachtung in IHC und PCR .....	46
4.3.2	Untersuchung der Zelltypen .....	46
4.3.3	Untersuchung anhand klinischer Merkmale.....	47
4.3.3.1	Geschlecht.....	47
4.3.3.2	Diabetes mellitus.....	48
4.3.3.3	Adipositas und Hyperlipidämie .....	48
4.3.3.4	Arterielle Hypertonie .....	48
4.3.3.5	CRP .....	49
4.3.3.6	Alkohol- und Nikotinabusus .....	49

4.4	Adenom.....	49
4.4.1	Gesamtbetrachtung IHC und PCR .....	49
4.4.2	Untersuchung der Zelltypen in der IHC .....	49
4.4.3	Untersuchung anhand klinischer Merkmale.....	50
4.5	Vergleich zwischen PDAC, Pankreatitis und Adenom .....	51
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>52</b>
5.1	Hochregulierung von mTOR im Tumorgewebe.....	52
5.1.1	Genmutationen im duktalem Pankreaskarzinom und die Bedeutung mTORs in dysregulierten Tumorsignalwegen .....	52
5.1.2	Der mTOR-Signalweg als Mediator im Tumorgeschehen des duktalem Pankreaskarzinoms .....	53
5.2	Immunhistochemische Analyse der Zelltypen im duktalem Pankreaskarzinom .....	54
5.2.1	Inselzellen als Hauptträger des immunhistochemischen Signals in Gewebe des duktalem Pankreaskarzinoms .....	54
5.2.1.1	Grundsätzliche Überlegungen.....	54
5.2.1.2	Methodisch bedingte, verminderte Gewichtung duktalem Zellen in der Immunhistochemie.....	55
5.2.2	Die entzündliche Mikroumgebung des Tumors als Reiz für die Hochregulation von mTOR in benachbarten Inselzellen .....	56
5.2.3	Nährstoffentzug der Azinuszellen durch Tumorgewebe.....	56
5.3	Hochregulation ohne Überexpression von mTOR in der chronischen Pankreatitis .....	57
5.3.1	Die Störung der Autophagie und die Stimulation zur Fibrose als molekulare Mechanismen der Pankreatitis und ihre Vermittlung durch mTOR.....	57
5.3.2	Verminderte Wachstumsstimulation in der chronischen Pankreatitis im Vergleich zum duktalem Pankreaskarzinom.....	58
5.4	Keine Hochregulierung von mTOR in Adenomgewebe .....	58
5.5	Analyse der klinischen Merkmale .....	59
5.5.1	Geschlecht .....	59
5.5.2	TNM und Grading .....	59
5.5.3	Adipositas und Diabetes mellitus .....	60
5.5.4	Hyperlipidämie .....	60
5.5.5	Arterielle Hypertonie.....	61
5.5.6	CRP .....	61
5.5.7	Alkoholabusus .....	61
5.5.8	Nikotinabusus .....	62
5.6	Vorstellung eines Pathogenesemodells.....	62
5.7	Zusammenfassung .....	64

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Diagrammverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>76</b>

# 1 Abstract

## 1.1 Untersuchung der mTOR-mRNA- und Proteinexpression des duktales Pankreaskarzinoms, der chronischen Pankreatitis und des Pankreasadenoms

Das Pankreaskarzinom ist der dritthäufigste Tumor des Gastrointestinaltrakts, welcher oft Folge einer langjährigen chronischen Pankreatitis ist. Bei insgesamt schlechter Prognose bleibt als kurative Therapieoption nur die operative Resektion. Das Protein mTOR ist an zahlreichen intrazellulären physiologischen Prozessen wie Zellwachstum, Proteinsynthese und Zellzyklusprogression beteiligt und somit für das Überleben der Zelle wichtig. Allerdings steht seine Funktion auch mit der Ausbildung von Krankheiten in Verbindung. Aus früheren, am Pankreas durchgeführten Operationen wurde für diese Arbeit Gewebe des duktales Pankreaskarzinoms, der chronischen Pankreatitis sowie des Pankreasadenoms verwendet. Um der Frage nachzugehen, ob eine Änderung der Expression von mTOR in diesen Pathologien nachweisbar war, bediente man sich der Immunhistochemie und der Real-Time-PCR. Somit waren Aussagen über die Lokalisation des Proteins im Gewebe sowie quantitative Aufschlüsse möglich. In die Statistik miteinbezogen wurden außerdem verschiedene Begleiterkrankungen. Es zeigte sich schließlich eine Überexpression von mTOR auf RNA-Ebene im Pankreaskarzinom sowohl im Vergleich zu Normalgewebe als auch zu Pankreatitisgewebe. Als ein Grund dafür können Dysregulationen des mTOR-Signalwegs angenommen werden.

## 1.2 Analysis of the mTOR mRNA and protein expression in the ductal carcinoma of the pancreas, chronic pancreatitis and adenoma of the pancreas

Pancreatic cancer is the third most common tumor in the gastrointestinal tract and is often a consequence of persisting chronic pancreatitis. Because of the bad prognosis, surgical resection remains the only curative therapy option. The protein mTOR is involved in numerous intracellular physiological processes such as cell growth, protein synthesis and cell-cycle progression and is, therefore, important for the normal survival of the cell. However, it also plays a role in the development of certain diseases. For the experimental studies of this thesis, tissues of the ductal carcinoma of the pancreas, chronic pancreatitis and adenoma of the pancreas obtained from previous operations performed on the pancreas were used. To answer the question whether a change of expression of mTOR was detectable in the above-mentioned pathologies, immunohistochemistry and real-time-PCR were applied. Thus, assertions about the localization of the protein in the tissue as well as quantitative information could be achieved. Furthermore, certain comorbidities were included in the statistical evaluation. The results showed an overexpression of mTOR at the RNA level in pancreatic cancer in comparison to both normal tissue and tissue of pancreatitis. The causes may lay in dysregulations of the mTOR signaling pathway.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Pankreas

#### 2.1.1 Allgemeines über das Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) ist ein sekundär retroperitoneal, an der hinteren Bauchwand liegendes Organ im Oberbauch. Makroskopisch lässt sich das Pankreas in einen Kopf (Caput), einen Körper (Corpus) und in einen sich nach schräg oben verjüngenden Pankreasschwanz (Cauda) unterteilen. Es ist physiologischerweise ca. 13-18 cm lang und 70-80 g schwer. Durch das gesamte Organ zieht der Hauptausführungsgang, der Ductus pancreaticus (Wirsung- Gang), welcher zusammen mit dem Ductus choledochus, dem extrahepatischen Gallengang, auf der Papilla duodeni major (Papilla Vateri) in den absteigenden Teil des Dünndarms mündet. Zusätzlich kann ein rudimentär ausgebildeter weiterer Gang in der Papilla duodeni minor enden. Als sowohl exokrine, als auch endokrine Drüse ergeben sich für das Pankreas seine wesentlichen Funktionen, nämlich der Produktion des Verdauungssekrets, sowie der hormonellen Regulation des Glukosestoffwechsels. Diese funktionelle Einteilung spiegelt sich auch im mikroskopischen Feinbau wider.

Drüsenläppchen, welche das exokrine Korrelat darstellen, werden von feinen Septen, die der dünnen Bindegewebskapsel des Organs entspringen, gebildet. Jedes einzelne enthält mehrere hundert sog. Azini, die Drüsenendstücke. Ihre Zellen, die Azinuszellen, sind pyramidenförmig und grenzen basal an die Basallamina, während ihr apikaler Pol in das Lumen des Endstücks ragt. Das Ausführungssystem des Organs entsteht durch den Zusammenschluss mehrerer Drüsenendstücke über Schaltstücke. Letztere vereinigen sich mit anderen Schaltstücken zu intra-lobulären Ausführungsgängen, die über die zwischen den Läppchen liegenden, bindegewebigen Septen zu interlobulären Ausführungsgängen werden und schließlich in den Ductus pancreaticus eintreten. Die Azinuszellen sezernieren inaktive Vorstufen von Enzymen, die für die Aufspaltung von Nahrungsbestandteilen im Duodenum essenziell sind. Erst dort wird die Reaktionskaskade mit der Aktivierung von Trypsin durch die darmständige Enterokinase eingeleitet. Aktive Enzyme des Pankreas sind neben Proteasen (Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Carboxypeptidase A und B und Aminopeptidasen), Glukosidasen ( $\alpha$ -Amylase), Nukleasen (Ribo- und Desoxyribonuklease) und Lipasen (Cholesterolesterase, Phospholipase A). Die Aktivierung dieser Enzyme im Pankreas selbst wären Teil des Pathomechanismus einer akuten Pankreatitis (s. u.). Zur Neutralisierung des sauren Chymus (Speisebrei) wird in den Ausführungsgängen und Schaltstücken Bikarbonat dazugegeben. Täglich werden 1,5-2 l Pankreassaft gebildet.

Der endokrine Teil des Pankreas besteht aus den sog. Langerhans-Inseln. Dies sind Zusammenschlüsse von Zellen, die sich durch ihre schwach eosinophile Färbung von den Azini abheben und Hormone in die Blutbahn über das sie durchsetzende Kapillarnetz abgeben. In den Inseln findet man mehrere Zelltypen. Die mit einem Anteil von ungefähr 70 % vertretenen B- (oder  $\beta$ -) Zellen sind über die Abgabe von Insulin für die Glukoseaufnahme in die Körperzellen verantwortlich und senken somit die Glukosekonzentration im Blut. Störungen in der Funktion der B-Zellen sind für die Entwicklung eines



Diabetes mellitus verantwortlich (s. u.). Ihr Gegenspieler sind die Glukagon-produzierenden A- (oder  $\alpha$ -) Zellen, die zu 20 % meist peripher in den Inseln vorkommen. Sie sind verantwortlich für die Anhebung des Blutzuckerspiegels durch Glukoseabgabe der Leber aus dem gespeicherten Glykogen und der Glukose-Neusynthese aus Aminosäuren. Die ebenfalls meist in der Inselperipherie aufzufindenden D- ( $\delta$ -) Zellen (5 %) produzieren Somatostatin, welches die Sekretion mehrerer anderer Hormone hemmt. Die PP- Zellen (5 %) produzieren pankreatisches Peptid, das die Motilität des Dünndarms steigert.

Arteriell gespeist wird das Pankreas über die sog. Pankreasarkade, die aus Anastomosen von Ästen der A. gastroduodenalis und der A. mesenterica superior gebildet wird und eine doppelte Gefäßschlinge, die sich um den Pankreaskopf windet, darstellt. Corpus und Cauda werden über Rami pancreatici der A. splenica versorgt. Der venöse Abfluss erfolgt letztendlich in die Pfortader. Aus Corpus und Cauda geschieht dies über die V. splenica. Das Blut des Pankreaskopfes wird über die Venae pancreaticoduodenales und die V. mesenterica superior geleitet [7].

## 2.1.2 Pathologien des Pankreas

Die Pathologien des Pankreas können in angeborene Fehlbildungen (Pankreasagenesie/ -hypoplasie, Pancreas divisum, Pancreas anulare und ektopes Pankreas), Pankreastumoren und entzündliche Veränderungen (Pankreatitis) eingeteilt werden. Insbesondere auf die letzten beiden soll im Folgenden eingegangen werden und außerdem ein Überblick über den Diabetes mellitus als endokrine Erkrankung des Organs gegeben werden.

### 2.1.2.1 Tumoren des Pankreas

Wie das Pankreas selbst, lassen sich auch seine Tumoren in exokrin und endokrin einteilen. Der bedeutendste und häufigste exokrine Tumor (92 %) ist das duktales Adenokarzinom [10]. Daneben existieren die Gruppe der Pankreasdenome sowie endokrine Tumoren (s. u.).

#### 2.1.2.1.1 Duktales Adenokarzinom

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist nach dem Kolon- und Magenkarzinom der dritthäufigste Tumor des Gastrointestinaltrakts. Das unter den Geschlechtern gleich verteilte Karzinom ist eine Erkrankung des älteren Menschen und betrifft Patienten zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Die Inzidenz (15/100 000 Einwohner jährlich) ist in westlichen Industrieländern steigend.

Während die Ätiologie der Erkrankung nicht genau bekannt ist, werden einige Risikofaktoren diskutiert. Neben genetischer Disposition bei Krankheiten, wie z. B. dem sporadischen und dem familiären Pankreaskarzinom, dem Peutz-Jeghers-Syndrom, dem familiären Mammakarzinom (BRCA1 und 2) und dem hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom, gelten vor allem das Rauchen, Adipositas, hoher

Alkoholkonsum, chronische Pankreatitis und ein langjähriger Diabetes mellitus Typ 2 als Risikofaktoren für duktales Pankreaskarzinome.

In den meisten Fällen ist die bevorzugte Lokalisation der Pankreaskopf, wobei sich der Tumor typischerweise unscharf begrenzt und eine feste Konsistenz aufweist. Die Zellen der Entartung sind die Epithelien der kleinen Gangstrukturen des Pankreas. Pathogenetisch wird die Progression des Tumors durch eine Anhäufung von Genmutationen verursacht. An erster Stelle stehen hierbei die Aktivierung des Onkogens K-ras sowie die Inaktivierung von p53, p16 und DPC4, den Tumorsuppressor-Genen (s. u.). Über präneoplastische Gangläsionen (pankreatische intraepitheliale Neoplasien PanIN Grad 1-3) schreiten Veränderungen des Normalgewebes zum Tumorgewebe voran [29]. Histologisch erkennt man dann eine Infiltration der gangartigen Drüsenstrukturen mit ungleichmäßigem, mehrschichtigem Epithel in das Pankreasgewebe sowie eine begleitende Fibrose (Desmoplasie). Varianten des Karzinoms sind das adenosquamöse Karzinom, welches sowohl Drüsen- als auch Plattenepitheltypen aufweist, als auch das anaplastische, also undifferenzierte, Karzinom [10]. Der Grad der Differenzierung wird in G-Stadien I-III angegeben (I = gut differenziert, II = mittel differenziert, III = schlecht differenziert).

Patienten mit PDAC sind im Anfangsstadium schwer zu identifizieren, da es keine Frühsymptome gibt. Hinweisend können ein gürtelförmig in den Rücken ausstrahlender Oberbauchschmerz, Übelkeit, Erbrechen, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und Schwäche sein. Bei Tumoren des Pankreaskopfes, wird in vielen Fällen ein Ikterus beobachtet. Außerdem können selten eine pathologische Glukosetoleranz bei Beeinträchtigung der endokrinen Funktion sowie eine Hyperkoagulabilität mit Thromboseneigung als paraneoplastisches Syndrom entstehen. Metastasen sind lymphogener und hämatogener Natur und treten früh im Verlauf auf. Letztere erfolgen gemäß venösem Abfluss (s. o.) über die Pfortader in die Leber. Selten sind Lungen- und Knochenmetastasen zu beobachten. Außerdem kann sich per continuitatem eine Peritonealkarzinose ausbilden.

In der Initialdiagnostik kommt der Bildgebung mittels Sonografie eine bedeutende Rolle zu. Zum Staging wird anschließend mittels Computertomographie (CT) sowie ggf. Magnetresonanztomographie (MRT) das Tumorausmaß und die Metastasierung bestimmt. Im Blut können die Tumormarker CA 19-9 und CEA herangezogen werden. Die TNM- Klassifikation sowie die Stadieneinteilung können folgender Tabelle entnommen werden.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des PDAC.

Stadium (UICC)	Primärtumor (T)	Lymphknotenstatus (N)	Fernmetastasen (M)
0	Tis (Carcinoma in situ)	N0	M0
IA	T1 (bis 2 cm Durchmesser, auf das Pankreas begrenzt)	N0	M0
IB	T2 (>2 cm Durchmesser, auf das Pankreas begrenzt)	N0	M0
IIA	T3 (organübergreifend)	N0	M0
IIB	T1-T3 (organübergreifend)	N1	M0
III	T4 (infiltriert Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior)	Jedes N	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

Die einzige potenziell kurative Therapie stellt die gesamte operative Entfernung (R0-Resektion) des Tumors mit Lymphadenektomie dar. Operabel (UICC-Stadium I-II) sind aber meist nur ca. 15% der Patienten, da sich die Früherkennung aufgrund mangelnder Symptome im Anfangsstadium (s. o.) als schwierig gestaltet. Operativ stehen bei vergleichbaren Ergebnissen zum einen die partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch-Whipple sowie die weniger radikale, und daher bevorzugte, pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie nach Traverso-Longmire zur Verfügung. Letztere beinhaltet mehrere Resektionen (Pankreaskopf, Duodenum, Gallenblase, Ductus choledochus und Lymphknoten), wobei die Organe am Ende neu miteinander anastomosiert werden (Pankreatiko- Jejunostomie, Hepatiko-Jejunostomie und Duodeno-Jejunostomie).

Tumoren des Pankreaskörpers und –schwanzes können mittels Pankreaslinksresektion und Splenektomie operiert werden. Adjuvant steht nach R0-Resektion in kurativer Intention eine Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5-Fluoruracil/Folinsäure an. Palliativ können bei Inoperabilität oder bei Metastasen ebenfalls Therapien mit Gemcitabin oder andere eingesetzt werden. Außerdem erfolgen Beschwerdelinderungen durch Analgesie sowie verschiedene endoskopische und operative Möglichkeiten bei tumorbedingter Cholestase oder Passagestörung des Gastrointestinaltrakts [29].

Die Prognose des Pankreaskarzinoms ist schlecht. Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) aller Pankreaskarzinome beträgt weniger als zwei Prozent. Nach R0-Resektion beläuft sich die mediane Überlebenszeit auf 17-28 Monate. Bei R0-Resektion im Stadium IA (T1, N0, M0) liegt die 5-JÜR bei ca. 40% [29,55].

#### 2.1.2.1.2 Adenome des Pankreas

Zu den benignen Tumoren gehören die serös-zystischen Tumoren, das muzinöse Zystadenom und das intraduktale papillär-muzinöse Adenom. Die serös-zystischen Tumoren lassen sich in weitere Untergruppen unterteilen (mikrozystisch, oligozystisch und Von-Hippel-Lindau-assoziiert) [42]. Sie unterscheiden sich, trotz zytologischer Gleichheit, in bevorzugter Lokalisation, Makroskopie,

Geschlechterverteilung und Genetik. Genannt sei, dass das seröse Zystadenom ein extrem geringes Malignitätspotenzial aufweist, weshalb es deshalb als Adenom bezeichnet wird [10,65]. Dennoch ist eine Wachstumstendenz vorhanden, welche nach zunächst abwartendem Verhalten bei symptomatischer Größe eine Resektion erforderlich macht. Es tritt häufiger bei Frauen auf, besitzt einen Altersgipfel von 70 Jahren und wird meist zufällig entdeckt [10].

Im Gegensatz dazu können muzinös-zystische (MZN) sowie intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) im Sinne einer Adenom-Karzinom-Sequenz entarten und sind daher in sowohl benignen, Borderline-, als auch malignen Ausprägung vertreten (z. B. muzinöses Zystadenom und – adenokarzinom) [10]. Die MZN finden sich eher im Körper-/Schwanz-Bereich des Pankreas, betreffen nahezu nur Frauen (Alter 40-60 Jahre) und weisen eine ovarähnliche Struktur auf, was wohl embryologisch begründet ist [10,42]. Bei Fehlen von Invasivität ist die Prognose gut, ansonsten ähnelt sie der des duktales Adenokarzinoms (s. o.).

Die IPMN zeichnen sich durch Proliferation des Pankreasgangepithels und einer exzessiven Muzinproduktion aus, welche bei Sekretstau das klinische Bild einer akuten Pankreatitis hervorrufen können. Sie liegen gehäuft im Pankreaskopf, treten eher bei Männern mit einem Alter zwischen 60 und 70 Jahren auf und haben als differenzialdiagnostisches Merkmal im Gegensatz zu den anderen genannten Pathologien eine Verbindung zum Gangsystem [42]. Die insgesamt heterogene Gruppe der IPMN unterteilt sich in den intestinalen, den pankreatobiliären, den onkozytären und den gastrischen Phänotyp, welche hier jedoch nicht weiter ausgeführt werden sollen [10]. Insgesamt zeichnen sich alle durch die Ausbildung von Zysten aus, welche sich je nach Untergruppe unterschiedlich ausprägen. Die Therapie der Wahl ist meist eine Resektion.

#### 2.1.2.1.3 Weitere Tumoren

Neben den oben genannten Tumoren existieren noch weitere Neoplasien des Pankreas. Zu den malignen Tumoren des exokrinen Pankreas zählt das Azinuszellkarzinom. Es tritt häufiger bei Männern auf und gibt sich oft erst nach bereits erfolgter Lebermetastasierung zu erkennen. Trotz Ansprache auf Chemotherapie ist die Prognose schlecht [10].

Die (neuro-) endokrinen Pankreastumoren erhalten je nach dem von ihnen produzierten Hormon ihren Namen. Insgesamt betrachtet sind diese Pankreastumoren sehr selten, am häufigsten unter ihnen ist jedoch das Insulinom. Wie auch bei den anderen Unterarten gehen die Tumoren von den Langerhans-Zellen aus. In mehr als 90% sind sie benigne. Als therapeutische Maßnahme ist die chirurgische Resektion die Methode der Wahl. Weitere neuroendokrine Tumoren, wie das Gastrinom, das VIPom und das Glukagonom sind häufig maligne [29].

## 2.1.2.2 Pankreatitis

### 2.1.2.2.1 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse, welche durch Selbstverdau des Organs zustande kommt und mit Funktionseinbußen des exo- und endokrinen Teils einhergehen kann. Ungefähr 15 bis 20 Einwohner von 100 000 sind pro Jahr betroffen, wobei der Altersgipfel bei den Männern zwischen 20 und 40 Jahren und bei den Frauen zwischen 50 und 60 Jahren liegt. Im Gegensatz zur chronischen Pankreatitis ist der häufigste Grund (55 %) für die Erkrankung ein Gallensteinleiden (Cholzysto-/Choledocholithiasis) und wird daher auch als akute biliäre Pankreatitis bezeichnet. Erst an zweiter Stelle mit ca. 35 % ist Alkohol als auslösende Noxe zu nennen. Andere Ursachen sind neben verschiedenen Medikamenten, genetischen Aberrationen (siehe chronische Pankreatitis) weitere seltene wie Virusinfektionen oder Hyperkalzämien.

Über eine Aktivierung der Pankreasenzyme bereits im Organ selbst schreitet die akute Pankreatitis durch die Ausbildung eines Ödems und Entstehung von Zellschäden voran. Proteolyse, Blutungen und Vasodilatation mit einhergehendem Volumenmangel sind die Folge. Dehnt sich die Entzündung auf das peripankreatische Fettgewebe aus, bewirkt die Lipase die Freisetzung von Fettsäuren und deren Verseifung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die interstitiell ödematöse Pankreatitis beschreibt den Schweregrad I und tritt mit 80-85 % am häufigsten auf, während Teilnekrosen (Schweregrad II) und Totalnekrosen (Schweregrad III) dementsprechend seltener sind, aber eine umso höhere Letalität aufweisen.

Intensive Oberbauchschmerzen mit Rückenausstrahlung, Übelkeit und Erbrechen, Meteorismus und Darmparese, eine prallelastische Bauchdeckenspannung, die Ausbildung von Aszites, Fieber und lokalen Hautverfärbungen sind einige der charakteristischen Leitbefunde. In schweren Fällen kann sich ein Kreislaufchock oder ein septischer Schock bei Infektion der Nekrosen ausbilden. Komplikationen sind weiterhin Milzvenen- und Pfortaderthrombosen, Pankreasabszesse und postakute Pankreas-Pseudozysten.

Diagnostisch sind Laboruntersuchungen und radiologische Bildgebungen wegweisend. Therapeutisch stehen die Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution an erster Stelle. Des Weiteren sind eine Analgesie und ggf. eine Antibiotikatherapie notwendig. Je nach Krankheitsverlauf kann ein operatives und/oder ein interventionelles Vorgehen erforderlich werden.

Die Prognose orientiert sich am Schweregrad der Erkrankung sowie der Tatsache, ob die Nekrosen infiziert sind oder nicht. (Letalität im Schweregrad I beträgt 0 %, im Schweregrad III > 50 %). Prophylaktisch ist das Meiden der auslösenden Noxen von Bedeutung [29].

### 2.1.2.2.2 Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis ist eine chronisch-rezidivierend oder chronisch-progredient verlaufende Entzündung des Pankreas, welche mit fortschreitender Krankheitsaktivität sowohl exokrine, als auch endokrine irreversible Organschäden hervorruft.

Die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland liegt bei ca. 20/100 000 Einwohnern. Hauptursache der Erkrankung ist chronischer Alkoholismus (80 %). Zu 15 % wird keine Ursache gefunden (idiopathisch) und zu 5 % werden andere Ursachen zusammengefasst. Darunter fallen, wie auch beim Pankreaskarzinom, der Nikotinabusus. Des Weiteren können auch Medikamente, eine Hypertriglyzeridämie und ein Hyperparathyreoidismus Ursache sein. Die hereditäre Pankreatitis basiert auf Genmutationen, wie für PRSS1 (kationisches Trypsinogen), CTRC (Chymotrypsinogen C), SPINK1 (Serinprotease-Inhibitor) und CFTR (Cystische Fibrose). Außerdem existiert auch eine autoimmune Variante der Pankreatitis (AIP) [29].

Die Pathogenese der alkoholtoxisch-induzierten chronischen Pankreatitis lässt sich durch die Nekrose-Fibrose-Sequenz beschreiben. Wiederholt auftretende akute Pankreatitiden mit Nekrosen lassen vermehrt Entzündungszellen in das Gewebe einwandern, welche die Sternzellen des Pankreas zur Kollagensynthese stimulieren und so das Bindeglied zwischen akuter und chronischer Pankreatitis schaffen [76]. Die Sternzellen, welche eng mit denen der Leber verwandt sind, speichern in inaktivem Zustand Fett und Vitamin A [4]. Bei Aktivierung durch Zytokine wie TGF- $\beta$ 1 werden sie zur Bindegewebs-synthese angeregt und sind wesentlich für die Fibrose verantwortlich [79]. Hinzu kommt die direkt schädliche Wirkung des Alkohols auf die Azinuszellen, welche durch eine Zunahme der Bauchspeicheldrüsenssekretion zu einer Ausbildung von verkalkenden Proteinplaques im Gangsystem führt und somit einen Sekretstau provoziert [5]. Des Weiteren wird auch die durch Alkohol hervorgerufene, vorzeitige Aktivierung von Pankreasenzymen diskutiert, die in Tierversuchen nachgewiesen wurde [3]. Vermutet wird jedoch ein Zusammenspiel aus Alkoholeinwirkung und oben genannten Genmutationen, da nur etwa 5 % der Alkoholiker eine chronische Pankreasentzündung entwickeln [76].

Histologisch findet sich zunächst eine perilobuläre, später auch eine intralobuläre Fibrose, welche sich so sehr ausdehnt, dass sie nur noch Gänge, Inseln, Nerven und Lymphozytenaggregate enthält [10].

Leitsymptom einer chronischen Pankreatitis ist ein Oberbauchschmerz, der gürtelförmig in Seiten und Rücken ausstrahlt, wobei der Schmerz in fortgeschrittenem Stadium fehlen kann. Weitere klinische Ausprägungen sind Übelkeit, Erbrechen, Gewichtsverlust und evtl. Ikterus. Die exokrine Insuffizienz, die sich bei 90%iger Zerstörung des Gewebes einstellt, äußert sich in Diarrhö, Steatorrhö und damit einhergehendem Mangel an fettlöslichen Vitaminen mit all seinen Folgen. Bei einem Drittel der Patienten ist auch die endokrine Funktion beeinträchtigt, was sich als pankreoptiver Diabetes mellitus manifestiert, welcher durch häufige Hypoglykämien charakterisiert ist, da sowohl Insulin- als auch Glukagon-produzierende Zellen zerstört werden.

Komplikationen sind neben Stenosingen des Pankreasgangsystems, des Ductus choledochus und des Duodenums Milz- und Pfortaderthrombosen mit portaler Hypertension sowie die Ausbildung von Pankreaspseudozysten. Eine wichtige weitere Spätkomplikation stellt das Pankreaskarzinom dar, welches insbesondere bei hereditärer Pankreatitis und Rauchern auftreten kann.

Zur Diagnose kann zunächst eine Untersuchung der Pankreasenzyme Lipase, Elastase-1 und Amylase (weniger spezifisch) im Serum erfolgen. Zur Einschätzung der exokrinen Pankreasfunktion wird darüber

hinaus die Elastase-1-Konzentration im Stuhl bestimmt. Als bildgebende Verfahren können Verkalkungen des Pankreas in der Sonografie gut nachgewiesen werden, was bereits beweisend für die chronische Pankreatitis ist. Des Weiteren können MRCP und CT mit Kontrastmittel zum Einsatz kommen. Interventionell besteht die Möglichkeit der Endosonografie und der ERCP.

Allgemeine therapeutische Maßnahmen sind neben strikter Nikotin- und Alkoholabstinenz das Einhalten einer speziellen Diät, welche aus kleinen und häufigen kohlenhydratreichen und fettarmen Mahlzeiten besteht und zudem Pankreasenzyme und ggf. mittelkettige Fettsäuren substituiert. Medikamentös orientiert sich die Therapie im akuten Schub an die der akuten Pankreatitis (s. o.). Bedarfsgerechte Insulingaben und die Substitution fettlöslicher Vitamine sollten erfolgen. Endoskopisch können Stenosen des Pankreasgangs dilatiert werden und blockierende Konkremente beseitigt werden. Operativ können Drainageoperationen, wie z. B. bei Obstruktionen des Pankreasgangs (Pankreatiko-Jejunostomie), oder bei bestehender Indikation Pankreasteilresektionen nach o. g. Methoden durchgeführt werden.

Prognostisch ist keine Ausheilung zu erwarten, wobei die genannten Risikofaktoren für die Erkrankung die Prognose verschlechtern und die Gefahr der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms bergen [29,55].

### 2.1.2.3 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus beschreibt eine metabolische Erkrankung, deren Ursache in einer Funktionsstörung des endokrinen Pankreas liegt. Gemeinsames Kennzeichen der verschiedenen Untergruppen des Diabetes mellitus ist eine erhöhte Glukosekonzentration im Blut (Hyperglykämie), die in einer Störung des blutzuckersenkenden Hormons Insulin begründet liegt. Die daraus resultierenden Folgen schlagen sich u. a. in metabolischen, vaskulären, okulären und neurologischen Pathologien nieder. Die beiden bedeutendsten Vertreter stellen der Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 dar.

Die Insulinausschüttung wird physiologischerweise abhängig von der Glukosekonzentration gesteuert, wobei erhöhte Spiegel den Hauptreiz zur Ausschüttung des Hormons darstellen. Metabolische Auswirkungen eines Insulinmangels sind eine gesteigerte Glukoneogenese und Glykogenolyse sowie eine verminderte Aufnahme der Glukose in die Zellen. Eine gesteigerte Lipolyse (mit Bildung von Ketonkörpern) sowie Proteolyse sind Mechanismen des Körpers alternative Wege der Energiegewinnung zu mobilisieren.

Der Diabetes mellitus Typ 1 wird durch einen autoimmunen Zerstörungsprozess der  $\beta$ -Zellen in den Langerhans-Inseln ausgelöst und besitzt eine genetische HLA-Assoziation. Erst bei ca. 80%igem Untergang der  $\beta$ -Zellen resultiert der symptomauslösende, absolute Insulinmangel. Da er angeboren ist, manifestiert er sich meist schon in jungen Jahren (Alter: 15-25) und verursacht typische Symptome wie Polyurie, Polydipsie, Gewichtsabnahme und Leistungsschwäche. Ferner kann er auch erstmals als akutes Ereignis in Form einer ketoazidotischen Entgleisung des Stoffwechsels (Coma diabeticum) in Erscheinung treten.

Im Gegensatz dazu ist der Typ 2 Diabetes durch eine fortschreitende Insulinresistenz der peripheren Gewebe charakterisiert. Für diese besteht eine genetische Prädisposition, die zusätzlich durch Überernährung (Adipositas) verstärkt wird und deshalb oft in Wohlstandsgesellschaften zu beobachten ist. Folge ist eine verminderte Versorgung von Muskel- und Fettzellen mit Glukose, da in diesen Geweben Glukose insulinabhängig aufgenommen wird, obwohl im Blut kompensatorisch erhöhte Glukose- und Insulinspiegel vorhanden sind. Außerdem ist insbesondere postprandial die Insulinsekretion im Pankreas abnorm vermindert. Im Verlauf nimmt auch insgesamt die Insulinproduktion der  $\beta$ -Zellen ab, da eine Erschöpfung der endokrinen Pankreasfunktion eintritt. Eine HLA-Assoziation ist bei dieser Diabetesform nicht vorhanden, allerdings ist eine familiäre Häufung öfter zu beobachten als beim Diabetes mellitus Typ 1.

Das typische Erkrankungsalter des Diabetes mellitus Typ 2 beläuft sich auf älter als 40 Jahre. Der Diabetes entwickelt sich meist schleichend, sodass die Patienten oft asymptomatisch sind und die Erkrankung erst als Zufallsbefund diagnostiziert wird. Wenn der Diabetes lange unerkannt bleibt, ist bereits mit Folgeerkrankungen zu rechnen (s. u.). Häufig sind Nebendiagnosen wie Adipositas, arterielle Hypertonie und Dyslipoproteinämie (metabolisches Syndrom) zu finden.

Die Diagnose stützt sich auf der Bestimmung der Glukosekonzentration unter nüchternen Bedingungen ( $\geq 126$  mg/dl), des HbA<sub>1c</sub>- Werts ( $\geq 6,5$  %) und des Zwei-Stunden-Werts im oralen Glukosetoleranztest ( $\geq 200$  mg/dl). Darüber hinaus können sich noch weitere Untersuchungen anschließen.

Therapeutisch muss beim Typ 1 Diabetes immer eine Insulinsubstitution erfolgen, während sie beim Typ 2 Diabetes als letzte Instanz einer Eskalationstherapie steht. Bis dahin werden mit Hilfe von Gewichtsnormalisierung, körperlicher Aktivität, Ernährungsoptimierung und Antidiabetika (1. Wahl Metformin) versucht, Hyperglykämien zu vermeiden. Zusätzlich sollen Selbstmessungen des Patienten zur Kontrolle durchgeführt werden.

Die Komplikationen und Spätfolgen des Diabetes mellitus liegen v. a. in vaskulären Veränderungen begründet. Sie lassen sich unter den Gesichtspunkten Mikro- und Makroangiopathien aufgliedern. Aus ersteren ergeben sich Erkrankungen wie die diabetische Retinopathie und Makulopathie, eine Nierenschädigung (diabetische Nephropathie), die diabetische Neuropathie und das diabetische Fußsyndrom. Zur Makroangiopathie werden Komplikationen wie die koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), Schlaganfälle sowie Aortenaneurysmen und –dissektionen gezählt. Entscheidend für die Prognose ist deshalb eine adäquate Einstellung und ständige Kontrolle der Glukosekonzentrationen [5,29].



## 2.2 mTOR

In den 1970er Jahren wurde in Erdproben der Osterinseln das Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* entdeckt. Es produziert ein potentes Mittel gegen Pilze, welches das Interesse der Wissenschaft weckte und deshalb Grund zur genaueren Untersuchung und Isolation gab. Es wurde Rapamycin genannt, stellte sich später als Proliferationsinhibitor von Säugetierzellen heraus und wies immunsuppressive Eigenschaften auf. Durch diesen Wirkstoff wurden intrazelluläre, bedeutende Signalwege bekannt, die durch ein Protein vermittelt werden, welches nach seinem Hemmstoff benannt wurde: mTOR, *mammalian target of rapamycin* [78].

Das Protein TOR ist ca. 280 kDa schwer und ist in mehrere Untereinheiten unterteilt. Am N-terminalen Ende enthält es mehr als 20 sog. HEAT-Repeats. Sie sind verantwortlich für Wechselwirkungen mit anderen, dem mTOR-Komplex assoziierten, Proteinen und weisen eine helikale Sekundärstruktur auf. Das C-terminale Ende enthält zwei sog. FAT-Domänen (FAT und FATC), die für die katalytische Funktion des Proteins notwendig sind. Zwischen ihnen liegt die FKBP-12-Rapamycin-bindende Domäne (FRB) und die Serin/Threonin-Kinase. FKBP-12 ist ein intrazellulärer Cofaktor, den Rapamycin benötigt, um an mTOR zu binden. Die Kinase gehört zur Phosphatidylinositol-verwandten Kinasefamilie (PIKK) [30].

Es existieren die zwei TOR-Phänotypen TOR1 und TOR2 in der Zelle. In Abhängigkeit der sich anlagernden Proteine kommen die Komplexe mTORC1 und mTORC2 vor, wobei mTORC1 aus TOR1 oder TOR2 gebildet werden kann, während mTORC2 aus nur aus TOR2 entstehen kann. Ersterem zugehörig sind die Proteine Raptor und mLST8 (auch GβL genannt). Es kann durch Rapamycin gehemmt werden und ist zuständig für das Wachstum der Zelle. mTORC2 ist unempfindlich für Rapamycin und enthält Rictor, hSIN1 und mLST8. Durch ihn werden räumliche Aspekte des Zellwachstums reguliert, wie die Organisation des Aktins im Zytoskelett [78].

### 2.2.1 Der mTOR- Signalweg

#### 2.2.1.1 Upstream-Targets

Übergeordnete Regulatoren des TOR-Signalwegs, die das Zellwachstum beeinflussen, sind Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, Energie und Stress (siehe Abbildung 1). Wachstumsfaktoren wie Insulin oder *insulin-like growth factors* (IGFs) binden an ihren an der Zellmembran sitzenden Rezeptor, was zu einer Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrats (IRS) führt und die PI3K aktiviert (Phosphoinosid-3-Kinase). Sie sorgt für die nachfolgende Konvertierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>). Diesem Prozess kann über die Lipidphosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) entgegengewirkt werden. Über PIP<sub>3</sub> aktiviert und phosphoryliert die PDK1 (*phosphoinositide-dependent-kinase-1*) die Proteinkinase B (Akt). Über die als Heterodimer komplexierten Tuberöse-Sklerose-Proteine TSC1 (Hamartin) und TSC2 (Tuberin) ist mTOR mit dem PI3K-Signalweg verschaltet. Akt phosphoryliert und inaktiviert

TSC2 als Antwort auf einen Wachstumsreiz. Es stellt also eine negative Regulation von mTOR dar. Dadurch kann Rheb, eine kleine GTPase, ungehindert an die Kinase-Domäne von mTOR binden und durch Konformationsänderung mTORC1 aktivieren [78].

Ein weiterer Aktivator von mTORC1 ist das Vorhandensein von Nährstoffen, v. a. Aminosäuren. Diese stimulieren die Rag-GTPasen, welche dann durch das Protein p62 gebunden werden, das sich daraufhin an seine Bindestelle von mTORC1 anlagert und dieses aktiviert [18].

Wachstumsvorgänge in der Zelle benötigen viel Energie. Von daher ist es für mTOR essentiell, sich an den aktuellen Energiestatus anzupassen. Dies geschieht über die AMPK (AMP-aktivierte-Proteinkinase), welche bei Energiemangel durch das erhöhte AMP/ATP-Verhältnis aktiviert wird. Nachfolgend werden ATP-produzierende Wege angeschaltet und ATP-verbrauchende (wie die Proteinbiosynthese) abgeschaltet. AMPK phosphoryliert TSC2 und steigert dadurch seine GAP-Aktivität (GTPase-aktivierendes Protein), was zu einer Inhibition von mTORC1 führt. Analog dazu dreht sich bei Vorhandensein von Energie dieser Mechanismus um [78].

Ebenfalls regulierend auf mTOR-Signalwege wirkt sich intrazellulärer Stress aus. Hypoxie beispielsweise wird mTORC1 durch REDD übermittelt, welches durch den Transkriptionsfaktor HIF1 (Hypoxie-induzierter Faktor) hochreguliert ist. REDD ist dabei zwischen Akt und TSC1-TSC2 geschaltet, um mTORC1 zu hemmen. Außerdem wird derselbe Effekt über den AMPK-Pfad erreicht [78]. DNA-Schäden, welche ebenfalls Stress darstellen, werden durch das aktivierte p53-Protein vermittelt und hemmen über AMPK-TSC2 die mTOR- Aktivität [21].

Insgesamt sind übergeordnete regulatorische Einheiten für mTORC1 besser erforscht als für mTORC2. Für letzteres werden hauptsächlich Wachstumsfaktoren identifiziert [81]. Untergeordnete Signalwege der TOR-Kinase sollen im Folgenden besprochen werden und beziehen sich auf Translation, Ribosombiogenese, Autophagozytose, Transkription, Aktinorganisation und Stoffwechsel.

#### 2.2.1.2 Downstream-Targets

Die am besten untersuchten Aktivierungs- und Phosphorylierungsziele von mTORC1 sind S6K1 (ribosomale Protein-S6-Kinase  $\beta$ -1) und 4E-BPs (eukaryontische Initiationsfaktor-4 bindende Proteine). Über die aktivierte S6K1 wird das Protein S6 aus der ribosomalen 40S Untereinheit phosphoryliert und ist dadurch dem Translationsprozess zugänglich. Durch mTORC1 phosphoryliertes 4E-BP1 setzt eIF4E frei, welches sich daraufhin mit eIF4G verbinden kann, um so die Translation zu initiieren [78].

Die Biosynthese von Ribosomen, welche eine große Menge an Energie verbraucht, muss ebenfalls gut reguliert sein. Es hat sich herausgestellt, dass mTOR auch hierbei eine fundamentale Rolle spielt, in dem es die RNA-Polymerase I (Pol I) über den Transkriptionsfaktor RRN3/TIF1A reguliert, welcher für die Transkription von rRNA-Genen verantwortlich ist. Des Weiteren ist es auch in andere Mechanismen, die mit der Ribosombiogenese in Verbindung stehen, eingebunden [71,78].

Der Energiehaushalt und die Einbindung von mTOR wurde teilweise bereits angesprochen (s. o.). Eine weitere Funktion von mTORC1 ist aber seine Kontrolle von nährstoffaufnehmenden Transportern, die für die Einschleusung von Glukose, Aminosäuren, Lipoproteinen und Eisen zuständig sind [20].

Des Weiteren ist mTOR im Prozess der Autophagozytose (Autophagie) eingebunden. Dabei werden Zellbestandteile einem Recyclingmechanismus zugeführt, um in Zeiten des Nährstoffmangels weiterhin Energie zu gewinnen. Außerdem stellt eine Grundaktivität von Autophagie einen Qualitätskontrollmechanismus dar, weil hierdurch fehlgefaltete Proteine oder beschädigte Organellen eliminiert werden. Den aktuellen Nährstoffstatus erkennt mTOR über p62 (s. o.). Dieses Protein ist auch dafür verantwortlich, mTORC1 an die Oberfläche des Lysosoms zu bewegen. mTORC1 hemmt daraufhin die Autophagozytose, was wiederum zu einem Anstieg von p62 führt, da dieses selbst über Autophagie abgebaut wird. Es resultiert ein positives Feedback, dessen Sinn es ist, bei Vorhandensein von wenig Aminosäuren die mTORC1-Aktivität zu reduzieren und die Autophagozytose hochzuregulieren [51].

In diesem Zusammenhang soll auch der Fettstoffwechsel angesprochen werden. Es hat sich gezeigt, dass mTORC1 über den nuklearen Rezeptor PPAR $\gamma$  für die Anreicherung von Fettgewebe durch Differenzierung von Präadipozyten entscheidend ist [39]. So erfüllt der mTOR-Signalweg auch energiespeichernde Funktionen [78].

Im Prozess der Transkription ist mTORC1 in metabolische und biosynthetische Signalwege involviert. Dabei ist es durch URI (*unconventional prefoldin RPB5 interactor*) reguliert. Dieses Protein interagiert nährstoffabhängig mit den RNA-Polymerasen I-III und wird TOR-abhängig phosphoryliert [25].

Neben den bereits angesprochenen Aufgaben von mTORC1 wurde auch für mTORC2 eine wichtige Aufgabe identifiziert. Es vermittelt nämlich Signale an das Zytoskelett, welche seine Organisation in der Zelle regulieren und somit Einfluss auf die Zellpolarisation nehmen [81]. Außerdem wird mTORC2 durch seine direkte Phosphorylierung und Aktivierung von Akt, SGK und PKC eine Schlüsselaufgabe in Zellzyklusprogression, Zellüberleben und anabolischen Stoffwechselvorgängen zugesprochen [81].

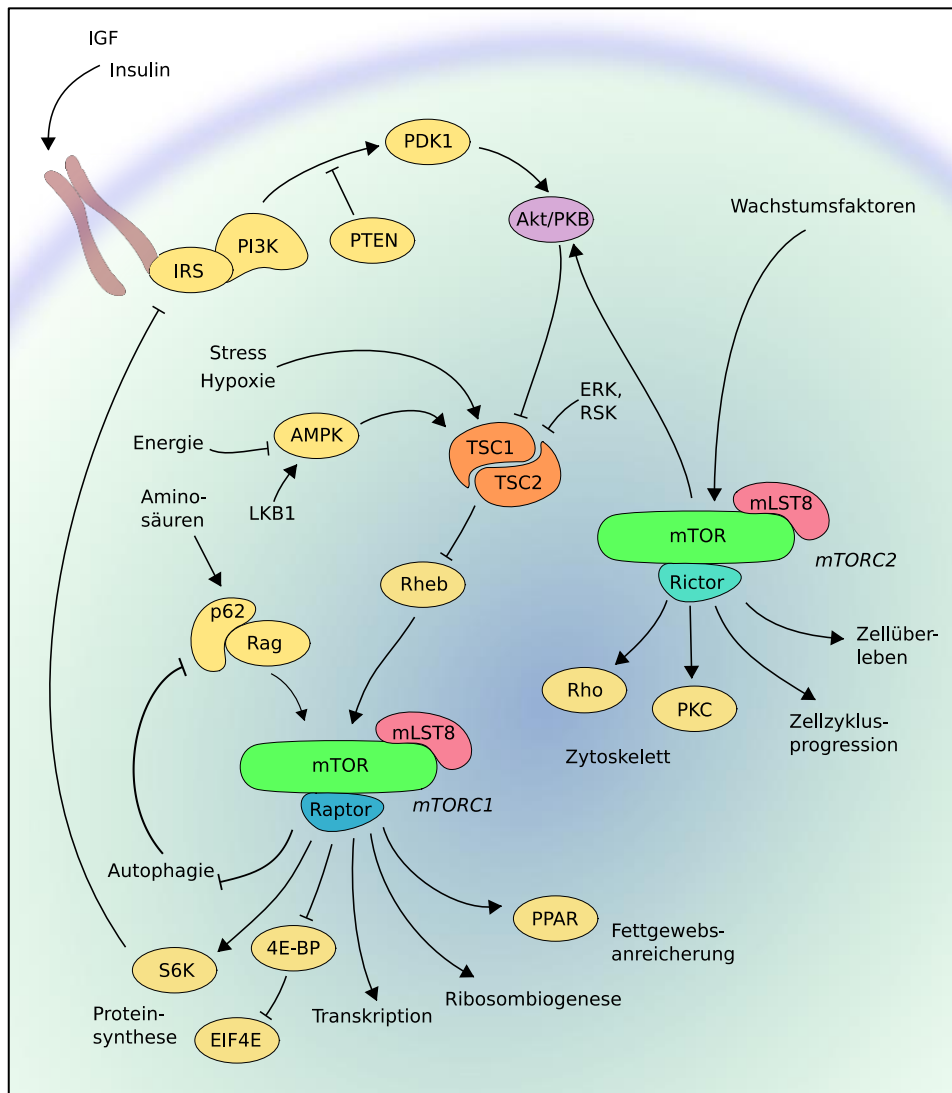


Abbildung 1: Der mTOR-Signalweg und seine Einbindung in Zellfunktionen (eigene Darstellung).

Neben den über Downstream-Targets vermittelten Effekten existiert darüber hinaus ein negativer Rückkopplungsmechanismus zum Anfang der Kaskade. Die von mTOR stromabwärts stehende S6K1 hemmt sowohl über Phosphorylierung als auch auf Transkriptionsebene das IRS, welches eine der ersten Instanzen der Signalübertragung darstellt. So wird eine überhöhte Reaktion auf Trigger verhindert [78]. Eine weitere Phosphorylierung im mTOR-Signalweg stellt die Aktivierung von Akt/PKB durch mTORC2 dar [78].

### 2.3 Dysregulationen des mTOR-Signalwegs in Pankreopathologien

Da mTOR eine Bandbreite an Funktionen für die Zelle übernimmt, spielt es auch unter dem Gesichtspunkt gewisser Pathologien eine wichtige Rolle. Von Interesse sollen hier Neoplasien im Pankreas und die chronische Pankreatitis sein.

Tumoren entstehen durch unkontrollierte Zellproliferation, wobei der Prozess einer Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle als Transformation bezeichnet wird. Damit eine Zelle ihren

physiologischen Wachstustriggern sowie Wachstumsinhibitoren unterlegen bleibt und nicht dereguliert proliferiert, ist der Zellzyklus durch sog. Protoonkogene und Tumorsuppressorgene kontrolliert. Genprodukte (Onkoproteine) von Protoonkogenen stimulieren Wachstum und Differenzierung. Bei somatischen Mutationen in diesen Genen zeigen die Onkoproteine eine überhöhte Aktivität oder werden übermäßig exprimiert. Das führt dazu, dass sich die Zelle unabhängig von externen Wachstumsreizen fortwährend teilt. Die mit mTOR vernetzten Protoonkogene sind PI3K, PKB/Akt, Rheb, Ras, eIF4E und S6K1 [78]. Tumorsuppressorgene haben im Gegensatz dazu den gegenteiligen Effekt, nämlich die Wachstumshemmung. Damit eine Tumorzelle entsteht, müssen diese also deaktiviert werden. Mit mTOR in Zusammenhang stehen dabei PTEN, TSC1 und -2, NF1, LKB1, p53, 4E-BP1 sowie beclin-1 [78].

In beiden Fällen würden Genmutationen mit dem Effekt eines Wachstumsantriebs zu einer Hochregulation von mTOR führen. Ob diese Hochregulation auch in Neoplasien des Pankreas zu finden ist, soll in dieser Arbeit erforscht werden.

Die chronische Pankreatitis hingegen ist durch Entzündung und Fibrose charakterisiert. Ob mTOR auch in diese Bereiche eingebunden ist, kann sich durch Untersuchung seiner Expression feststellen lassen.

## 2.4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die mTOR-Expression in den Krankheitsbildern des duktaalen Pankreaskarzinoms, der chronischen Pankreatitis und des Pankreasadenoms explorativ zu untersuchen. Durch Vergleich der mTOR-Expression auf Gen- und Proteinebene in betroffenem und nicht betroffenem Gewebe soll auf eine Hoch- oder Herunterregulierung des Signalwegs geschlossen werden. Die Methode der Immunhistochemie dient dabei der Markierung mTOR-exprimierender Zellen. Eine Real-Time-PCR soll den quantitativen Aufschluss über die Genexpression erbringen.

Da häufige Begleitpathologien der Erkrankten wie Diabetes mellitus, chronischer Alkohol- oder Nikotinabusus als Risikofaktoren eines PDAC bzw. einer Pankreatitis gelten, ist es von Interesse, auch nach Zusammenhängen in diesen Bereichen mit mTOR zu fahnden. Des Weiteren fließen auch die Merkmale Geschlecht, TNM-Stadium, Adipositas, Dyslipidämie, arterielle Hypertonie und die Blutkonzentration eines Entzündungsmarkers in die Auswertung mit ein. In Zusammenführung mit pathogenetischen Modellen sollen sich schließlich die Ergebnisse der Arbeit in Erkenntnisse aus der aktuellen Literatur einfügen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Allgemeiner Ablauf

Der allgemeine Ablauf der Arbeit lässt sich in die Untersuchung von mTOR auf Proteinebene mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC) und auf Genebene durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) untergliedern.

Für die IHC wurde zunächst eine Vorauswahl an in Frage kommenden Präparaten getroffen. Diese wurden zunächst mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) gefärbt und vom Pathologen begutachtet. Erst nach der Bestimmung geeigneter Schnittpräparate erfolgte die Färbung mittels IHC. Für die Auswertung wurden alle Objektträger digital eingescannt und im Hinblick auf verschiedene Gesichtspunkte am Computer analysiert.

Für die PCR wurden als erstes geeignete Organproben ausgesucht, welche sich zum Teil mit denen der IHC deckten. Um mit ihnen eine Untersuchung auf Genebene durchführen zu können, bedurfte es der Isolation der RNA aus dem Gewebe und deren Umschreibung in cDNA. Diese wurde später mit Hilfe der Real-Time-PCR-Technologie untersucht. Im letzten Schritt wurden die erhobenen Daten mit klinischen Merkmalen der Patienten zusammengeführt und die statistische Auswertung erstellt.

### 3.2 Material

#### 3.2.1 Verbrauchsmaterialien

*Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
BCA-Platten, Microplate 96 Well, PS, F-Bottom (chimney well)	Greiner Bio One
Corning Costar Stripette® (5ml; 10 ml; 25 ml)	Sigma-Aldrich (Thermo Fisher Scientific)
Deckgläser (24x50 mm; 24x24 mm)	Roth
Färbegestell (Schiffchen)	Roth
Färbekasten (Küvette)	Roth
Filterpapier	Schleicher & Schuell
Küvette UVette®	Eppendorf
MicroAmp™, Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
MicroAmp™, Optical Adhesive Film	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)

Objektträger SuperFrost™ Plus	VWR
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pipetten (verschiedene Größen); Eppendorf Reference®; Eppendorf Research®	Eppendorf
Pipettenspitzen	VWR
Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen Falcon®	VWR

### 3.2.2 Instrumentarien

Tabelle 3: Instrumentarien

Produkt	Hersteller
Dispersiergerät Ultra-Turrax® T8	IKA®-Werke
Gene AMP System 2700	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
Inkubator Incu-Line	VWR
Kühlschränke	Heraeus Liebherr
Mikroplatten-Reader ELx800	BioTek Instruments
Mikroskop	Leica Biosystems
Mikrotom RM2165	Leica Biosystems
Mikrowelle	Clatronic
pH-Meter	inoLab
Photometer	Eppendorf
Slide Scanner Axio Scan.Z1	Zeiss
TaqMan™ 7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
Trocknerbank u. Wasserbad Histo Bath HIR-3	Kunz Instruments
Vortex Labdancer S40	VWR
Vortex REAX 2000	Heidolph
Waage	Sartorius AG
Zentrifugen	Eppendorf

### 3.2.3 Chemikalien und Biochemikalien

Tabelle 4: Chemikalien und Biochemikalien

Produkt	Hersteller
25x Stock Complete	Roche
Eindeckmedium Aquatex®	Merck
Eindeckmedium Entellan®	Merck
Eosin G Lösung 0,5 % wässrig	Roth
Ethanol (vergällt) mit 1 % MEK	ZChL der UdS
H <sub>2</sub> O, destilliert	VWR
H <sub>2</sub> O, RNase-frei	Quiagen
Hämalaunlösung, sauer, nach Mayer	Roth
HCl	VWR
KCl	Roth
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , wasserfrei	Roth
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich (Thermo Fisher Scientific)
NaCl	Roth
NaF	Merck
PMSF	Roche
Rinderserumalbumin	Roche
RIPA Lysis & Extraction Buffer	G- Biosciences
Tris Ultra Qualität	Roth
Wasserstoffperoxid	VWR
Xylol	ZChL der UdS

### 3.2.1 Puffer und Diluenten

Tabelle 5: Puffer und Diluenten

Produkt	Hersteller
RIPA Lysis & Extraction Buffer	G-Biosciences
Target Retrieval Solution	Dako
REAL Antibody Diluent	Dako



### 3.2.2 Enzyme und Kits

*Tabelle 6: Enzyme und Kits*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Inc.
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Inc. (Thermo Fisher Scientific)
ImmPact™ AEC Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories, Inc.
Vectastain ABC-Kit	Vector Laboratories, Inc.
RNeasy Mini Kit	Quiagen
RNase-free DNase	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)

### 3.2.3 Assay on Demand

*Tabelle 7: Assay on Demand*

<b>Gen</b>	<b>Assay ID</b>	<b>Hersteller</b>
mTOR	Hs00234508_m1	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
PMM1	Hs00160195_m1	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)

### 3.2.1 Weitere Reagenzien

*Tabelle 8: Weitere Reagenzien*

<b>Reagenz</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Master Mix	TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
Primärantikörper	Anti-mTOR antibody [Y391] ab32028	Abcam®

### 3.2.2 Software

Tabelle 9: Software

<b>Programm</b>	<b>Entwickler</b>
Office	Microsoft
SPSS	IBM
ZEN light	Zeiss

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Das Patientenkollektiv

Für die histologische und molekularbiologische Untersuchung bediente man sich an Gewebeproben, die zwischen 2002 und 2008 aus der Allgemeinchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes gesammelt und in einer Gewebekbank aufbewahrt wurden. In diesem Rahmen wurde in Operationen sowohl aus dem pathologischen („p“), d.h. dem tumor-, pankreatitis- oder adenomhaltenden Pankreasabschnitt, als auch aus dem gesunden Nachbargewebe („n“), welches nicht von der Erkrankung beeinträchtigt war, Gewebestückchen entnommen. Für die Analyse der Nukleinsäuren wurde ein Teil dieser Proben bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert, für die histologische Beurteilung wurde der andere Teil in Paraffin eingebettet. Für letzteres musste das Gewebe zunächst in 5%iger Formaldehydlösung fixiert werden. Anschließend wurden die Proben in einer ansteigenden Alkoholreihe entwässert und schließlich in erstarrendem Paraffin verfestigt. Die Systematik der Paraffinblöcke wurde in einer laborinternen Datenbank dokumentiert. Mithilfe von Diagnose und Pathologiebericht, der Aufschluss über Makro- und Mikroskopie sowie Staging und Grading gab, wurde eine Auswahl an Patienten erstellt. Eingeschlossen wurden in der Tumor- und Pankreatitisgruppe nur Präparate mit der Diagnose „duktales Pankreaskarzinom“ und „chronische Pankreatitis“. Da in der Adenomgruppe am wenigsten Präparate zur Verfügung standen, entschied man sich für die Beibehaltung eines homogenen Kollektivs. Die am häufigsten vertretenen Präparate trugen dabei die Charakterisierung „seröses Zystadenom“, weshalb schließlich diese Entität für die Untersuchungen gewählt wurde.

Für die in diese Studie eingeschlossenen Patienten bestimmte man weiterhin Patientendaten aus Arztbriefen, Tumorberichten und Untersuchungen, die im klinikinternen Computerprogramm gespeichert waren. Dazu gehörten neben Name, Geschlecht und Alter das TNM Stadium (in der Karzinomgruppe), das Vorhandensein von Nebendiagnosen wie Diabetes mellitus, Adipositas (BMI  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>), Hyperlipidämie (Triglyceride > 150 mg/dl oder Gesamtcholesterin > 200 mg/dl), arterielle Hypertonie (Blutdruck  $\geq$  140/90 mmHg), der CRP-Wert vor der Operation als Entzündungsmarker sowie Suchterkrankungen wie Alkohol- und Nikotinabusus. Nur gesicherte, d. h. im

Computerprogramm aufgeführte, Diagnosen wurden dabei gezählt. Diese flossen in die statistische Auswertung am Ende der Datenerhebung mit ein.

Für die immunohistochemische Untersuchung standen nach der Begutachtung der HE-gefärbten Proben durch den Pathologen in der Karzinomgruppe 29 Patienten zur Verfügung. Bei 11 davon lagen sowohl „p“- als auch „n“-Gewebe vor („Pärchen“), bei 18 Patienten waren es reine „p“-Proben. Im Taqman-Versuchsteil schloss man 55 Patienten ein, wovon 24 Pärchen waren, 31 reine „p“-Präparate und eins ein reines „n“-Präparat war. Da sich die Patientenkollektive in den Versuchen teilweise überschneiden, konnte die Karzinomgruppe insgesamt über 63 Patienten verfügen.

Unter diesen fand sich eine ungefähr ausgeglichene Verteilung unter den Geschlechtern (46,4 % männlich und 53,6 % weiblich). Das mittlere Alter zum Operationszeitpunkt betrug 67,8 Jahre, wobei die Männer im Schnitt mit 65 Jahren und die Frauen mit 71 Jahren behandelt wurden. Mehr als 80 % (84,1 %;  $n=53$ ) der Patienten befanden sich dabei bereits im fortgeschrittenen Stadium T3 der TNM-Klassifikation. Der Rest verteilte sich zu je 3,2 % auf T1 und T4 und zu 9,5 % auf T2. Lymphknotenmetastasen wurden bei 63,5 % detektiert, während Fernmetastasen 7,9 % der Patienten aufwiesen. Die meisten histologischen Befunde des Pathologen (55,6 %), der die Gewebeproben im Rahmen der Therapieplanung erhielt, waren als GIII klassifiziert, wiesen also eine schlechte Differenzierung auf. Grad II gehörten 31,7 % an, Grad I nur 1,6 % und bei 11,1 % konnte weder Grad II noch Grad III eindeutig zugeordnet werden („GII-III“).

An Nebenerkrankungen hatten 27 von den insgesamt 63 Patienten (42,9 %) einen Diabetes mellitus. Innerhalb der Untersuchungen mittels IHC waren es 15 von 29 Patienten (51,7 %), wovon wiederum bei 11 Patienten der Diabetes mellitus nicht insulinpflichtig war (NIDDM; *Non-insulin-dependent diabetes mellitus*), während bei den restlichen vier die Therapie ein Insulinpräparat enthielt (IDDM). Bei den Proben, die der Real-Time-PCR zugeführt wurden, waren von 55 Patienten 22 Diabetiker (40 %), davon waren 12 nicht insulinpflichtig und 10 insulinpflichtig. Die Verteilung der restlichen Diagnosen können Tabelle 1 und 2 entnommen werden.

Bei der Pankreatitis wurden im IHC-Versuch insgesamt 17 Patienten eingeschlossen. Hiervon waren bei dreien „p- und -n“-Pärchen vorhanden. Der Rest waren zehn pathologische und vier nicht pathologische Gewebeproben. Im Versuch der Real-Time-PCR konnten acht Patienten eingeschlossen werden. Es waren sieben „p“- und „n“-Pärchenproben sowie eine reine „n“-Probe vorhanden. Das Kollektiv aus beiden Versuchsteilen zusammen zählte 21 Patienten. Der Großteil ( $n=16$ ) waren Männer. Mit 51 Jahren wurden die Patienten im Durchschnitt operiert, wobei der jüngste 33 Jahre und der älteste 70 Jahre alt war. Bei 5 von 21 Patienten (23,8 %) war ein Diabetes mellitus vorhanden, der in allen Fällen insulinabhängig war.

In der Untersuchung des Adenoms hatte man für die immunhistochemischen Analysen sechs Patienten zur Verfügung mit vier „p-und-n“-Pärchen und zwei rein pathologischen Präparaten. In der Real-Time-PCR gab es fünf Pärchen und drei „n“-Gewebebeob. Das aus insgesamt 10 Patienten bestehende Adenomkollektiv beinhaltete drei Männer und sieben Frauen. Das mittlere Operationsalter betrug 65 Jahre.

*Tabelle 10: Klinische Charakteristika der Patienten, die für die immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzt wurden.*

Charakteristika		PDAC-Patienten	Pankreatitis-Patienten	Adenom-Patienten
Gesamt		29	17	6
Geschlecht	m	14	14	2
	w	16	3	4
TNM	T1	0	-	-
	T2	2	-	-
	T3	27	-	-
	N0	10	-	-
	N1	19	-	-
	M0	27	-	-
	M1	2	-	-
Grading	G I	0	-	-
	G II	13	-	-
	G II-III	2	-	-
	G III	14	-	-
Diabetes mellitus		15	3	1
Adipositas		2	0	0
Hyperlipidämie		3	2	1
Arterielle Hypertonie		16	6	2
CRP > 10 mg/dl		10	4	0
Alkoholabusus		0	7	0
Nikotinabusus		0	4	0

*Tabelle 11: Klinische Charakteristika der Patienten, die für die quantitativen PCR-Untersuchungen eingesetzt wurden.*

<b>Charakteristika</b>		<b>PDAC-Patienten</b>	<b>Pankreatitis-Patienten</b>	<b>Adenom-Patienten</b>
Gesamt		55	8	8
Geschlecht	m	25	5	3
	w	30	3	5
TNM	T1	2	-	-
	T2	6	-	-
	T3	45	-	-
	T4	2	-	-
	N0	22	-	-
	N1	33	-	-
	M0	50	-	-
	M1	5	-	-
Grading	G I	1	-	-
	G II	18	-	-
	G II- III	5	-	-
	G III	31	-	-
Diabetes mellitus		22	3	4
Adipositas		9	0	3
Hyperlipidämie		9	0	1
Arterielle Hypertonie		33	5	5
CRP > 10 mg/dl		14	2	0
Alkoholabusus		3	7	0
Nikotinabusus		4	6	1

### 3.3.2 Immunhistochemische Untersuchungen

#### 3.3.2.1 HE-Färbung

Aus den Paraffinblöcken der Proben wurden mit dem Mikrotom 4 µm dünne Schnitte abgelöst und diese auf Objektträger übertragen. Um sicherzugehen, dass die Anschnitte einen repräsentativen Ausschnitt der ausgewählten Krankheitsentität enthielten, mussten diese noch von einem Pathologen begutachtet werden. Zu diesem Zwecke war eine Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) notwendig. Von einem Paraffinblock wurden daher ungefähr fünf Objektträger mit Schnitten erstellt, wovon ein Teil der HE-Färbung diente und der andere der IHC vorbehalten war.

Für die Untersuchungen verwendete man die wässrige Hämalaunlösung nach Mayer von der Firma Roth. Vor jeder Anwendung musste eine Filtration davon durchgeführt werden. Die Lösung färbt anionische (basophile) Komponenten, die negative elektrische Ladungen besitzen, an. Dazu gehören die DNA-tragenden Zellkerne, welche sich blau (bis blauviolett nach Mischfärbung mit Eosin) darstellen. Der andere Anteil, Eosin, ist sauer und färbt die azidophilen (eosinophilen) Anteile, wie z. B. das Zytoplasma oder Kollagenfasern, rot [72]. Zur Herstellung der Eosin-Standardlösung löste man 1g Eosin in 50 ml A. dest. und 50 ml 96%igem Ethanol. Die Gebrauchslösung entstand durch eine 1:10-Verdünnung der Standardlösung und der Hinzugabe von drei Tropfen Essigsäure pro 100 ml. Im ersten Schritt der HE-Färbung wurden die Objektträger in Xylol (drei Mal je 10 Minuten) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe in Wasser gebracht. Die Konzentrationen des Ethanol betragen 98 %, 96 %, 90 %, 80 % und 70 %, in deren Küvetten die Objektträger jeweils zwei Minuten eingetaucht wurden. Vor und nach der achtminütigen Färbung mit Hämatoxylin reihte sich je ein Spülschritt mit A. dest. ein. Die Objektträger wurden im Anschluss zweimal kurz in eine zu 1 % Salzsäure enthaltende Ethanollösung getunkt, um danach in eine 38 °C warme Küvette mit Leitungswasser getaucht zu werden. Darauffolgend ließ man die Objektträger in der Küvette für zwei Minuten vorsichtig unter fließendem Leitungswasser stehen, woraufhin sich die Schnitte bläuten und sich die Färbung fixierte. Der nächste Schritt war die fünfminütige Färbung mit der Eosin-Gebrauchslösung. Diese Färbung erfolgt regressiv, d. h. nach einer anfänglichen Überfärbung wird durch nachfolgendem Spülen mit A. dest. und einer ansteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 % und zweimal 100 % Ethanol jeweils für eine Minute) erheblich differenziert [43]. Für das Eindecken mit dem Xylol enthaltendem Entellan von Merck bedurfte es noch eines dreiminütigen Eintauchens in Xylol.

#### 3.3.2.2 IHC-Färbung

Die ungefärbten Objektträger derjenigen Schnitte, die als geeignet befundet wurden, führte man dem Versuchsteil der IHC zu. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der farblichen Markierung einer Zellstruktur, dem Epitop des Antigens, durch einen spezifischen Antikörper. Dieser lagert sich an die zu untersuchende Struktur an und ist zur Sichtbarmachung im Gewebeschnitt an ein Detektionssystem gekoppelt [43]. In dieser Studie benutzte man einen monoklonalen Primärantikörper des Typs IgG mit

mTOR als Zielstruktur der Firma Abcam, der aus Kaninchenzellen gewonnen wurde. Monoklonale Antikörper entstammen einer einzigen Ursprungs-B-Zelle, sind identisch und richten sich gegen ein bestimmtes Epitop. Polyklonale Antikörper hingegen stammen von unterschiedlichen Plasmazellen ab und werden durch Antigenexposition mehrerer Tiere einer Spezies und Poolen ihrer Seren hergestellt [43]. Antikörper als Makromoleküle stellen ihrerseits selbst eine antigene Struktur dar. Wenn also ein Immunglobulin an ein Antigen mit seinem Fab-Teil bindet, kann der hinausragende Fc-Teil von einem zweiten, artfremden Antikörper erkannt und ebenfalls gebunden werden. Dieser Mechanismus wird in der IHC ausgenutzt. Der als Sekundärantikörper bezeichnete Bindungspartner ist an ein Enzym konjugiert. Durch ihn und mit Hilfe des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (ABC), dem hier verwendeten Detektionssystem, wird ein sichtbares Farbprodukt hergestellt [43].

Wie auch bei der HE-Färbung musste der Schnitt zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Dies geschah zunächst mit den Xylol-Küvetten, in welche die Objektträger dreimal zu je zehn Minuten hineingelassen wurden. Im zweiten Schritt folgte die absteigende Alkoholreihe, die aus zweimaligem Stellen in 100%ige Alkohollösung für je fünf Minuten und anschließendem Lagern bei Konzentrationen von 95 %, 90 %, 80 % und 70 % Ethanol für jeweils zwei Minuten bestand. Die Objektträger kamen im Anschluss für je fünf Minuten zuerst in A. dest. und danach in Tris-Puffer (TBS).

Die Herstellung von TBS erfolgte durch Zugabe von 90 g Kochsalz (NaCl) zu 61 g Tris-Base. Nach Lösen des Gemisches in 700 ml A. dest. wurde der pH-Wert mit 37%iger HCl-Lösung auf 7,5 eingestellt und mit A. dest. auf einen Liter aufgefüllt. In der IHC wurde als Gebrauchslösung eine 1:10-Verdünnung dieses Erzeugnisses verwendet.

Es folgte der Schritt der Antigen-Demaskierung. Dies ist notwendig, da durch die Formalinfixierung und die Paraffineinbettung Vernetzungen und Membranen im Gewebe entstehen, die die Bindung des Primärantikörpers mit dem zu untersuchenden Antigen erschweren bzw. unmöglich machen [43]. Zur Auflockerung und somit zur Permeabilitätssteigerung dieser Strukturen wurde zu diesem Zweck die HIER-Methode (*heat induced epitope retrieval*) benutzt. Die Gebrauchslösung, die verwendetet wurde, war der Target Retrieval Puffer von DAKO, der einen pH-Wert von sechs aufwies und mit 1:10 verdünnt war. Die Objektträger in dieser Lösung wurden in die Mikrowelle gestellt und für zweimal fünf Minuten in einen Siedezustand versetzt, sodass die Temperatur ca. 100 °C betrug. Es war darauf zu achten, dass die Objektträger nicht austrockneten, da dies zu Artefaktfärbungen führen konnte. Im Anschluss wurde die Küvette für 20 Minuten bei Raumtemperatur zur Abkühlung stehengelassen und danach zweimal für je fünf Minuten mit TBS gespült.

Die Blockierung der endogenen Peroxidase war der nachfolgende Punkt des Protokolls. Peroxidase ist das Enzym, welches für die Umwandlung des Farbstoffs verantwortlich ist und in einem späteren Schritt (s. u.) zum Einsatz kommt. Bei fehlender Inaktivierung im Gewebe würde es unspezifisch färben und

zu somit zu falsch-positiven Markierungen führen. Die kompetitive Hemmung des Enzyms erfolgt durch die Hinzugabe seines Substrats Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) im Überschuss [43]. Dafür wurden die Objektträger für zehn Minuten in eine mit A. dest. verdünnte, 3%ige  $H_2O_2$ -Lösung gestellt und im Anschluss zweimal für je fünf Minuten mit TBS gespült.

Der nächste Schritt war die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen. Ziel dieses Verfahrens ist es, unerwünschte Hintergrundfärbung zu reduzieren. Ein Grund für diese unspezifische Färbung sind hydrophobe Wechselwirkungen. Viele Proteine haben aufgrund der neutralen Seitenkette ihrer Aminosäuren hydrophobe Eigenschaften. Da Immunglobuline ebenfalls stark hydrophob sind, neigen sie dazu, sich an diese Strukturen anzulagern, obwohl es nicht ihr spezifisches Epitop ist [43]. Man benutzte zu diesem Zweck Normal-Serum, welches auch Antikörper derselben Spezies (Ziege) wie des Sekundärantikörpers enthält, um so unspezifische Bindungen der Antikörper zu umgehen. Serum der Primärantikörper-Spezies würde zwar auch an solche reaktiven Stellen binden, aber der Sekundärantikörper würde dann sowohl die unspezifischen Bindungen durch das Serum als auch die Bindung des Primärantikörpers mit dem Zielantigen erkennen und somit das Färberesultat verfälschen. Drei Tropfen Serumstock aus dem Vectastain ABC-Kit wurden daher mit 10 ml PBS-Lösung vermischt, davon ca. 10  $\mu$ l auf jeden Objektträger aufgetragen, sodass der gesamte Schnitt vom Tropfen bedeckt war und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Blockingserum wurde nachher durch vorsichtiges Abklopfen entfernt.

PBS steht für *phosphate buffered saline*. Für dessen Herstellung nach Dulbecco wurden zwei Gramm Kaliumchlorid, zwei Gramm Kaliumhydrogenphosphat mit 80 g Kochsalz und 11,5 g wasserfreiem Dinatriumhydrogenphosphat vermengt und auf einen Liter mit A. dest. aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und vor Gebrauch in einem Verhältnis von 1:10 mit A. dest. verdünnt.

Der nachfolgende Teil war das Blockierungsverfahren des endogenen Biotins. Für die HIER-Methode wurde ein vermehrtes Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen in der IHC durch endogenes Biotin festgestellt, weshalb sich in solch einem Protokoll ein Blockierungsschritt empfiehlt [43]. Biotin wird als Coenzym oder als prosthetische Gruppe für mehrere Reaktionen im Stoffwechsel benötigt und ist deshalb in vielen Geweben vorhanden. Es kann von Avidin, einem Glykoprotein aus Hühnereiweiß, an je einer seiner vier Untereinheiten gebunden werden. Auch wenn keine kovalente Bindung eingegangen wird, ist die Affinität der beiden Moleküle sehr hoch [43]. In einem späteren Versuchsschritt (s. u.) macht man sich den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex als Detektionssystem für die Farbreaktion zunutze.

Durch Bedecken des Schnitts auf dem Objektträger für 15 Minuten mit Avidin D aus dem Blocking Kit von Vector Laboratories wurde das freiliegende Biotin gebunden. Nach dem Spülen in A. dest wurde ebenfalls für 15 Minuten das Biotin aus dem Kit aufgetragen, damit die nun offenen Avidin-Bindestellen besetzt wurden. Danach reihte sich ein weiterer Spülschritt mit TBS an.



Um nun den Primärantikörper an mTOR binden zu lassen, bedurfte es noch einer geeigneten Verdünnung. Durch mehrmaliges Durchführen des Protokolls an Testschnitten und Bewertung der Färbung in Zusammenarbeit mit dem Pathologen Herrn PD Dr. med. Wagner entschied man sich für eine 1:2000 Verdünnung des Primärantikörpers in den Diluenten der Firma DAKO. Nach vollständiger Bedeckung der Schnitte mit der Antikörperlösung wurden diese auf einer Platte in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht in den Kühlschrank zum Inkubieren gestellt. Der Primärantikörper, welcher aus Kaninchenzellen gewonnen wurde, richtet sich gegen humane Gewebeeigenschaften (in diesem Fall das mTOR-Antigen). Bei jedem Durchgang wurde auch eine Negativkontrolle ohne Auftragen des Primärantikörpers angefertigt.

Am zweiten Tag des Versuchs wurden die Objektträger zunächst durch zweimal fünfminütiges Stellen des Schiffchens in TBS-Küvetten gespült. Es schloss sich die Inkubation mit dem Sekundärantikörper an. In diesem Schritt bindet der Sekundärantikörper der Spezies Ziege mit seinem Fab-Teil an die Fc-Region des artfremden Primärantikörpers. Für die Bedeckung der Schnitte mit der Flüssigkeit war die Lösung von drei Tropfen Serumstock der Ziege und einem Tropfen des Sekundärantikörpers aus dem Vectastain ABC-Kit in 10 ml PBS nötig. Die Objektträger wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach zweimal für jeweils fünf Minuten in TBS gespült. Der Sekundärantikörper ist biotinyliert, d. h. das Biotinmolekül ist an ihn konjugiert. Mit diesem Biotin reagiert im nächsten Schritt das ABC-Reagenz.

Aus dem Kit wurden zwei Tropfen des Reagenz A (Avidin) und zwei Tropfen des Reagenz B (biotinylierte Meerrettich-Peroxidase) benutzt, die in 5 ml PBS gelöst und schon 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt wurden, damit das Avidin mit dem Biotin an der Peroxidase eine Bindung eingehen konnte. Das Resultat dieser Methode ist das Entstehen von großmolekularen Vernetzungen zwischen Avidin, Biotin und dem Enzym [43]. In der darauffolgenden dreißigminütigen Inkubation der Schnitte mit dieser Lösung verband sich das Avidin, welches, wie bereits erwähnt, mehrere Bindungsstellen besitzt, mit dem Biotin am Sekundärantikörper.

Nach zweimal fünfminütigem Spülen mit TBS folgte die Umsetzung eines Farbstoffs an der Peroxidase. Hierfür benutzte man das ImmPACT AEC Peroxidase Kit von Vector Laboratories. Eine Verdünnung des Farbstoffs Aminoethylcarbazol (AEC) wurde gemäß den Herstellerangaben des Kits erstellt. Diese wurde dann auf die Objektträger gegeben, sodass die Schnitte vollständig mit der Lösung bedeckt waren. Die Farbentwicklung wurde nach 15 Minuten durch A. dest abgestoppt.

Als letztes stand die Gegenfärbung mit Hämatoxylin an. Diese erfolgte analog zur HE-Färbung. Nach der Filtration des Hämatoxylins wurde das Schiffchen mit den Objektträgern in die Küvette mit dem Farbstoff für sechs Minuten gestellt und anschließend mit A. dest. gespült. Für das Bläuen ließ man die Objektträger in der Küvette zuerst für drei Minuten in warmem Leitungswasser stehen und stellten sie

danach vorsichtig für weitere drei Minuten unter fließendes Leitungswasser. Nach einem kurzen Spülschritt mit A. dest. erfolgte das Eindecken der Schnitte mit Aquatex® und den Deckgläsern.

### 3.3.2.3 Auswertung

Das Ziel der IHC war es, herauszufinden, ob Unterschiede in der mTOR-Expression erkennbar sind oder nicht. Bei einer Überexpression in einer bestimmten Gruppe müsste also im Gewebeschnitt mehr immunhistochemisch gefärbte Fläche zu sehen sein als in ihrer Vergleichsgruppe. Diese Überlegung bedurfte für ihre Umsetzung ein exaktes Ausmessen dieser Fläche und deren Bestimmung des Anteils am Schnitt. Des Weiteren liefert die mikroskopische Begutachtung Aufschluss über das histologische, und damit zelluläre, Korrelat der Expression. Von Interesse war demnach die Frage, welche Zellen mTOR tragen und ob es Unterschiede innerhalb verschiedener Untergruppen gab.

In Kooperation mit der AG Böhm überführte man die mikroskopierbaren Gewebeschnitte in eine digitalisierte Form unter Zuhilfenahme des Slide Scanners Axio Scan Z.1. Mit der Software ZEN light war es daraufhin möglich, Messungen manuell durchzuführen. Als erstes wurde die gesamte Schnittfläche umfahren und deren Fläche ermittelt. Diese enthielt neben dem Pankreasparenchym teilweise noch große Flächen an Bindegewebe, Fett und „leere“ Flächen, die z. B. durch das Lumen großer Gefäße entstanden. Deshalb wurden diese Bereiche markiert und von der Gesamtfläche des Schnitts abgezogen, um letztendlich nur Pankreasgewebe einzuschließen. Im nächsten Schritt wurde per Hand das Gewebe am Bildschirm durchmustert und nach rot bis rotbraun gefärbten Zellzusammenschlüssen gesucht. All diese Flächen wurden umrandet und waren somit im Programm in einer Liste gespeichert. Um eine Aussage über den Anteil der IHC-gefärbten Fläche am Parenchym zu treffen wurden alle Areale, die ein immunhistochemisches Signal aufwiesen, addiert und durch die Fläche des Parenchyms geteilt.

Für die Analyse der Zelltypen wurde jeder Zellverband mit IHC-Markierung einer Zellart untergeordnet. Es wurden Inselzellen, Azinuszellen, duktale Zellen und Immunzellen identifiziert. Anschließend setzte man die Summe dieser Flächen mit IHC-Signal je eines Zelltyps ins Verhältnis zur Fläche des Gesamt-IHC-Signals.

In den IHC-Schnitten war darauf zu achten, Artefakte von echten Signalen zu unterscheiden. Dafür bediente man sich einiger Kriterien. Als echt-positive Färbung wurde nur eine solche gezählt, welche sich klar Zellkörpern zuordnen ließ und welche eine eindeutige Abgrenzbarkeit zu Nachbarzellen aufwies. Diffuse Färbungen sowie Färbungen an Präparaterändern zählte man als Artefakte, die durch Fixierungsfehler oder Austrocknung entstanden [69]. Ebenfalls zu erkennen und damit auszuschließen war die Hintergrundfärbung, die aber durch die verschiedenen Blockierungsschritte und ausreichende Verdünnung des Antikörpers weitgehend reduziert werden konnte.

### 3.3.3 Untersuchung der Genexpression

#### 3.3.3.1 Proteinisolation

Nachdem im ersten Versuchsteil die Expression von mTOR auf Proteinebene erfolgte, untersuchte der zweite Teil die mRNA und führte sie nach Umschreibung in cDNA der Real-Time-PCR zu, um sie zu quantifizieren. Für die Proteinisolation homogenisierte man in einem Dispersiergerät jeweils zwischen 40 und 80 mg des Patientengewebes in 900 µl RIPA Lyse-Puffer, 5 µl 200 mM NaF (Phosphatase Inhibitor), 5 µl 200 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Protein Tyrosin Phosphatase Inhibitor), 80 µl 25X Stock Complete<sup>TM</sup> (Protease Inhibitor Cocktail) und 10 µl 100 mM PMSF (Protease Inhibitor). Bevor, zwischen und nach den Durchgängen am Dispersiergerät wurde eine gründliche Spülung mit 70%igem Alkohol vorgenommen, um Verunreinigungen zu umgehen. Es folgte eine zehnmünütige Zentrifugation der Proben bei 4 °C und 13 000 rpm, um im nächsten Schritt den entstandenen Überstand abzupipettieren und bei -20 °C einzufrieren.

#### 3.3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Am Photometer und mit Hilfe de BCA Protein Assay Kits von Pierce erfolgte anschließend die Messung der Proteinkonzentration. Die Methode kombiniert die Biuret-Reaktion mit der selektiven Komplexierung einwertiger Kupferionen ( $\text{Cu}^+$ ) durch die Bicinchoninsäure (BCA). Bei der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  in alkalischem Milieu bilden je zwei Moleküle BCA mit dem entstandenen  $\text{Cu}^+$  einen spezifischen Komplex, der die Lösung violett färbt und sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm hat [67].

Entsprechend dem Protokoll des Herstellers wurde je ein Teil Probe mit zwanzig Teilen der zuvor hergestellten Gebrauchslösung vermischt und anschließend für dreißig Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die kolorimetrische Messung am Mikroplatten-Reader ELx800 bei 562 nm. Durch eine Verdünnungsreihe von Standardproben mit Rinderserumalbumin (BSA) und bekanntem Proteingehalt wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer man die Konzentration in den unbekanntenen Proben ermittelte.

#### 3.3.3.3 RNA-Isolation

Aus den Gewebelysaten musste im nächsten Schritt die RNA isoliert werden. Dies erfolgte durch Benutzung des RNeasy Mini Kits von Qiagen. Es basiert auf der selektiven Bindefähigkeit einer Silica-Gel-Membran, an die durch ein Salz-Puffer-System bis zu 100 µg an RNA gebunden werden kann, welche mehr als 200 Basen aufweist. Hierfür werden in einem hochdenaturierten Puffer, welcher Guanidin und Isothiocyanat enthält, jeweils 40-50 mg Materialmenge an Gewebeproben lysiert und homogenisiert. Dabei wird die RNase inaktiviert, sodass die RNA vollständig extrahiert werden kann. Nach der Hinzugabe von Ethanol, welches für geeignete Bindeverhältnisse sorgt, wird die Probe auf die RNeasy Mini Säule gegeben, wodurch die Gesamt-RNA an die Silica-Membran binden kann.

Verunreinigungen werden dadurch ausgewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit DNase, um eventuelle Reste an genomischer DNA zu eliminieren.

Das genaue Vorgehen war wie folgt: Nach Reinigung des Turrax wurde je 40 bis 50 mg des Probenmaterials mit 600 µl RLT-Puffer und 6 µl β-Mercaptoethanol zerkleinert und gemischt und anschließend in geschlossene Reaktionsgefäße umpipettiert, um für drei Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert zu werden. Der RLT-Puffer ermöglicht der RNA an die Säule zu binden, da seine Salze sie von ihrer Hydrathülle befreien. Nach Hinzugabe von je 600 µl 70%igem Ethanol wurden 600 µl aus diesem Reaktionsgefäß entnommen, auf die Filtersäule gegeben und dann bei 10 000 rpm für 20 Sekunden zentrifugiert, wodurch sich ein Unterstand absetzte, der verworfen wurde. Die restlichen 600 µl des Ethanol-Proben-Gemisches wurden auf dieselbe Säule pipettiert und der Vorgang wiederholt. Die Säulen wurden danach in frische Reaktionsgefäße gestellt und je 350 µl RW1-Puffer dazupipettiert. Dieser Puffer wäscht Proteine und Zellbestandteile aus. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation über 20 Sekunden bei 10 000 rpm, wobei der Unterstand am Ende ebenfalls weggeschüttet wurde. Daraufhin erfolgte der DNase-Verdau, wie im Herstellerprotokoll vorgegeben. Nach einer Viertelstunde, in der man es ruhen ließ, wurden wieder 350 µl RW1-Puffer dazugegeben, 20 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert und die Säulen dann in frische Reagenzgefäße gestellt. Schließlich wurde je 500 µl des mit Ethanol angesetzten RPE-Puffers den Säulen hinzugegeben und eine kurze Zentrifugation für 20 Sekunden bei 10 000 rpm durchgeführt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, wobei sich jedoch am Ende eine etwas längere, nämlich zweiminütige Zentrifugation anschloss. Die Säulen wurden in neue Reagenzgefäße gestellt, bei 14 000 rpm der Trockenzentrifugation zugeführt und in wieder ausgetauschte Eppendorf-Gefäße gestellt. Pro Reagenz wurde 50 µl HPLC dazugegeben, für eine Minute ruhen gelassen, für eine weitere Minute zentrifugiert (10 000 rpm) und die Säulen schließlich entfernt. In 50 µl RNase freiem Wasser wurden 2 µl des RNA-HPLC-Gemisches hinzugegeben und am Vortex-Schüttler gemischt. Es folgte die Messung mit dem Photometer (s. u.) Die RNA-Proben wurden daraufhin bei -80 °C gelagert.

#### 3.3.3.4 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte über die Bestimmung der optischen Dichte (OD) am Photometer bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und dem von Proteinen bei 280 nm. Durch Bildung eines Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  kann der Grad der Reinheit bzw. der Kontamination mit Protein ermittelt werden. Für optimale Ergebnisse der RNA-Präparation sollte dieser zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Konzentration der zu bestimmenden Nukleinsäure lässt sich berechnen durch Multiplikation der Extinktion bei 260 nm und des Multiplikationsfaktors F mit dem Verdünnungsfaktor V.

Der Multiplikationsfaktor beträgt hier 40 µg/ml, da eine OD<sub>260</sub> von 1 genau so viel RNA enthält [53].

$$c \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = OD_{260} * F \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] * V$$

Die RNA-haltige Lösung wurde mit einer Menge von 1 µl mit 49 µl RNase-freiem Wasser verdünnt, wodurch ein Verhältnis von 1:50 entstand. Es erfolgte eine dreimalige Messung mit darauffolgender Mittelung der Werte.

### 3.3.3.5 cDNA-Synthese

Das Umschreiben der gewonnenen RNA in cDNA (*complementary* oder *copy DNA*) war der nächste Schritt. Es geschieht durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) und war notwendig, da die sich anschließende PCR (s. u.) DNA als Ausgangsmaterial benötigt. Nach Zusammengeben der Reagenzien hybridisieren die Primer an die RNA. Daraufhin synthetisiert die Reverse Transkriptase die cDNA mit Hilfe der komplementären Nukleotide (dNTPs), während Puffer und RNase-Inhibitoren die Reaktionsbedingungen optimal halten.

Die verwendeten Primer sind zufällige Hexamerprimer (sog. *random primer*) mit allen möglichen Sequenzkombinationen aus sechs Basen. Sie können somit an sämtliche Teile der mRNA binden, sodass am Ende jeder Bereich der mRNA in der cDNA vertreten ist.

Vor der Durchführung wurde die bei -80 °C gelagerte isolierte RNA erneut photometrisch gemessen, um eine etwaige Degeneration auszuschließen. Es wurden 1 µg RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt und mit HPLC auf 35,5 µl aufgefüllt. Dazu wurden 5 µl RT Puffer, 2 µl 500 µM dNTPs, 5 µl 2,5 µM Random Primer und 2,5 µl 1,25 U/µl Multiscribe RT aus dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit gegeben, sodass insgesamt ein Endvolumen von 50 µl erreicht wurde und das Gemisch eine RNA-Konzentration von 100 ng/µl aufwies. Um DNA-Verunreinigungen auszuschließen, setzte man zusätzlich RT-Negativkontrollen an. Nach kurzem Anzentrifugieren bei 2 000 rpm wurde die cDNA-Synthese im Gene AMP System 2700 von Applied Biosystems durchgeführt. Das eingestellte Programm durchlief die Schritte 10 Minuten bei 25 °C, 120 Minuten bei 37 °C und 30 Minuten bei 4 °C. Es folgte eine Verdünnung mit HPLC in ein Verhältnis von 1:2, sodass die cDNA-Konzentration im Anschluss noch 50 ng/µl betrug.

### 3.3.3.6 PCR

Das Grundprinzip der Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*; PCR) ist die Vervielfältigung (Amplifizierung) einer bestimmten DNA-Sequenz mit dem Ziel ihres Nachweises. Um den Abschnitt im Genmaterial zugänglich zu machen, muss zuerst die im Doppelstrang vorliegende DNA in zwei komplementäre Einzelstränge durch Erhitzen auf etwa 95 °C aufgetrennt werden. Die hinzugegebenen Primer, welche Starthilfen für die Polymerase darstellen und komplementär zur DNA-Matrize sind, lagern sich im Anschluss bei niedrigerer Temperatur je an den Anfang und an das Ende des zu amplifizierenden Abschnitts. Durch eine hitzestabile Polymerase und ihrer Substrate

(Desoxyribonukleosidtriphosphate) wird zu der zwischen den Primern liegenden Einzelstrang-Sequenz ein komplementäres DNA-Stück synthetisiert, indem die entsprechenden Basen sich ihrem Gegenüber anlagern. Bei erneuter Temperaturerhöhung trennt sich das neu gebildete DNA-Doppelstrang-Stück und nach Hybridisierung der Primer kann ein neuer Syntheszyklus beginnen. Die Amplifizierung erfolgt exponentiell, da jede neu gebildete DNA als Matrize für den nächsten Durchgang genutzt wird. Mehrere Methoden können im Anschluss zur Sichtbarmachung und zum Nachweis der DNA angewendet werden [45].

### 3.3.3.7 Real-Time-PCR

Eine Weiterentwicklung dieses Systems stellt die Real-Time-PCR-Methode dar, welche in Echtzeit die Amplifikationsmenge misst. Zusätzlich zu den Primern werden sequenzspezifische Oligonukleotide (sog. Real-Time-Proben) im Überschuss hinzugegeben, die an die Zielsequenz der zu vervielfältigenden DNA binden, sobald diese in ihre Einzelstränge aufgeteilt ist. An die Real-Time-Proben sind Fluorophore, d. h. fluoreszierende Moleküle, gekoppelt, die nach Anregung durch kurzwelligeres Licht (<495 nm) höherwelligeres Licht im Bereich von 500-800 nm emittieren. Die Leuchtintensität wird durch Detektionssysteme pro PCR-Zyklus gemessen. Damit die Real-Time-Proben nicht durchweg fluoreszieren, bedient sich das hier eingesetzte Taqman-System der „Quencher“-Methode, um das unspezifische Signal zu unterdrücken. Während am 5'-Ende der Real-Time-Probe das Fluorophor sitzt, welches als Reporter fungiert, ist am 3'-Ende der Quencher angebracht, der durch seine räumliche Nähe die Emission unterbindet. Dies geschieht durch einen Energietransfer vom Reporter zum Quencher, der stattfindet, wenn das zu detektierende Fluorophor angeregt wird. Wenn allerdings diese beiden Moleküle getrennt werden, kann dieser Energietransfer nicht mehr erfolgen, sodass die spezifische Fluoreszenz bei einer definierten Wellenlänge gemessen werden kann. Verantwortlich für diese Trennung ist die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase. Die Polymerase liest die DNA-Matrize von 3' nach 5' und synthetisiert den komplementären Strang demnach in 5' zu 3'-Richtung. Dabei trifft sie auf das 5'-Ende der Real-Time-Probe, an dem das Fluorophor sitzt, und trennt dieses durch ihre Exonukleaseaktivität ab. Mit zunehmenden PCR-Zyklen und damit DNA-Amplifikaten, werden auch mehr Fluorophore freigesetzt, die die Leuchtintensität direkt proportional dazu ansteigen lassen [54].

Für die Auswertung stehen zwei verschiedene Quantifizierungsmöglichkeiten zur Verfügung; die relative und die absolute. In der Startphase der PCR ist nur wenig DNA-Menge vorhanden, am Ende liegt so viel vor, dass amplifizierte Nukleinsäure-Stücke immer häufiger miteinander hybridisieren und damit den Prozess hemmen. Es bildet sich ein Plateau. Zwischen Start- und Plateauphase liegt die exponentielle Phase, welche bei der relativen Quantifizierung zur Berechnung hinzugezogen wird. Hierbei bedient man sich des sog. CT-Werts („*threshold cycle*“), welcher angibt, ab wann sich erstmalig die emittierte Fluoreszenz signifikant gegenüber der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Zur Kontrolle wird ein Referenzgen gemessen und mit dem Zielgen verglichen. Dieses, auch als „*housekeeping gene*“

bezeichnet, stellt ein Gen dar, welches im Optimalfall keiner Expressionsvariation während des Zellzyklus oder bei Entartung unterliegt. Für die Versuche wählte man dafür, basierend auf früheren Untersuchungen unseres Labors [63], das Gen Phosphomannomutase 1 (PMM1). Mit Hilfe der Delta-Delta-CT-Methode berechnete man die unterschiedliche Genexpression. Dabei wird im ersten Schritt vom CT-Wert des Zielgens das Referenzgen abgezogen ( $= \Delta CT$ ) und im zweiten Schritt die Differenz aus dem  $\Delta CT$ -Wert des pathologischen Gewebes und dem des gesunden Nachbargewebes gebildet ( $\Delta\Delta CT = \Delta CT_p - \Delta CT_n$ ).

Die absolute Quantifizierung erfolgt im Gegensatz dazu mit einer Standardkurve. Bekannte Konzentrationen von Standardproben des zu untersuchenden Gens werden logarithmisch in einem Diagramm gegen ihren CT-Wert aufgetragen. Die cDNA-Konzentrationen der unbekanntenen Proben können somit anhand der Geraden abgelesen und errechnet werden [31].

Die Materialien für den Versuch waren neben der zu untersuchenden cDNA der Mastermix von Applied Biosystems, welcher die DNA-Polymerase und die DNA-Basen enthält, der Assay on Demand, ebenfalls von Applied Biosystems mit den Primern und den Real-Time-Proben, und RNase-freies Wasser von VWR. Die 96-Well-Platte für das Taqman-Gerät war aufgeteilt in die cDNA-Proben zur Quantifizierung, fünf Standardproben und eine Kontrollprobe (NTC; *no template control*). Für jede Probe waren jeweils zwei Wells zur Doppelbestimmung vorgesehen.

Das in ein Well aliquotiertes Volumen setzte sich zusammen aus 10  $\mu$ l Mastermix, 1  $\mu$ l Assay on Demand und 8  $\mu$ l RNase-freiem Wasser. Die zu ermittelnden Proben enthielten je 1  $\mu$ l ihrer cDNA. Die cDNA musste für den Versuch vor Benutzung zunächst in Eis vollständig aufgetaut und vor dem Pipettieren noch anzentrifugiert werden. Für die NTC wurde anstatt der cDNA Wasser in analoger Menge hinzugegeben. Die Standards enthielten Verdünnungen aus einer cDNA Probe mit einer Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l, sodass sie für den Versuch 250 ng, 50 ng, 25 ng, 5 ng und 1 ng aufwiesen. Das Programm des ABI-Prism 7900 Sequence Detectors bestand aus einer zunächst zehnminütigen Einheit von 95 °C gefolgt von 40 Zyklen von jeweils 15 Sekunden bei 95 °C und zehn Minuten bei 60 °C. Die Auswertung erfolgte durch die oben beschriebenen Methoden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expressionsuntersuchung von mTOR

Für die histologischen Untersuchungen wurde stets ein flächenmäßiger Anteil verwendet. In den Vergleichen zwischen „n“ und „p“ wurde die immunhistochemisch gefärbte Fläche in Relation zur Fläche des auf dem Gewebeschnitt vorhandenen Pankreasparenchyms gesetzt. Bei der Zelltypanalyse wurde hingegen der Anteil einer Zellart am Gesamt-IHC-Signal benutzt. Der Wert, der im Taqman-Versuch Verwendung fand, war die Division (ZG/HK) zwischen dem aus der Standardkurve ermittelten absoluten Wert des Zielgens (ZG) durch den des Housekeeping-Gens (HK). Als Signifikanzniveau für die statistische Auswertung wurde standardmäßig  $p=0,05$  zugrunde gelegt. Die angewandten Tests waren unter normalverteilten Kollektiven T-Tests für verbundene und unverbundene Stichproben. Die nicht-parametrischen Tests waren der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben und der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben.

### 4.2 Pankreaskarzinom

#### 4.2.1 Gesamtbetrachtung in IHC und PCR

Der „IHC-Anteil“ innerhalb aller tumorenhaltenden 29 („p“-) Proben betrug im Mittel 0,46 %, während in den 11 Proben des gesunden Nachbargewebes („n“- Proben) ein Durchschnittswert von 0,61 %

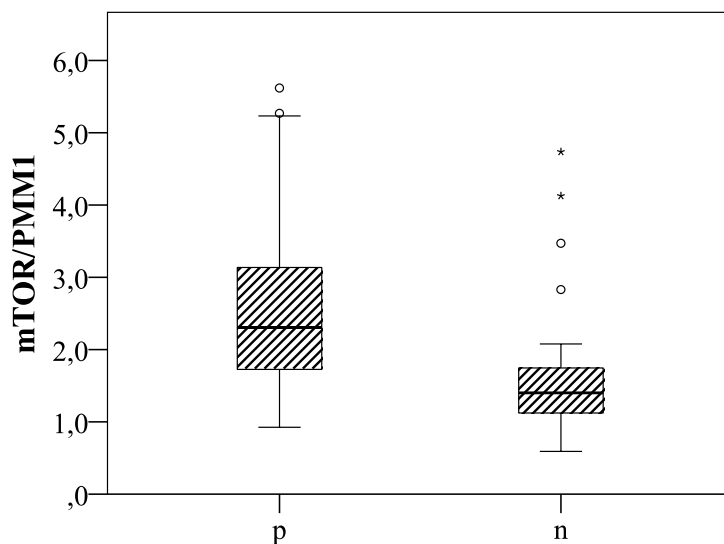


Diagramm 1: mTOR-Expression in PDAC-Proben im Vergleich.

ermittelt wurde. Nach statistischer Testung stellte sich jedoch kein signifikanter Unterschied heraus.

Im Gegensatz dazu konnte die Real-Time-PCR jedoch einen solchen aufzeigen. Für 24 korrespondierende Wertepaare („n“ und „p“) ergab sich eine Signifikanz von  $p=0,005$ . Dabei enthielten die Tumورproben 1,4-mal mehr mTOR-mRNA als die tumorfreen Proben (siehe Diagramm 1).

#### 4.2.2 Untersuchung der Zelltypen in der IHC

Neben der quantitativen Aussage der IHC, wie viel Fläche an gesuchtem Protein sich anfärben lässt, kann darüber hinaus festgestellt werden, welche Zelltypen mTOR exprimieren. Insel-, Azinus- und duktale Zellen bilden das Parenchym des Pankreas und sind deshalb Grundlage dieser Untersuchung.



In den Präparaten, die Tumorgewebe enthielten, machten die Inselzellen fast die Gesamtheit des IHC-Signals aus (>99 %). Repräsentative Ausschnitte sind in Abbildung 2 und 3 dargestellt. Azinus- und Duktuszellen teilten sich den restlichen kleinen Flächenanteil zu ungefähr gleichen Beträgen. Innerhalb der Präparate des tumorfreien Nachbargewebes waren die Inselzellen mit ca. 78 % ebenfalls die dominierende Zellart in der Gesamtheit des immunhistochemischen Signals. Azinuszellen waren mit 21 % vertreten und duktale Zellen mit <1 %.

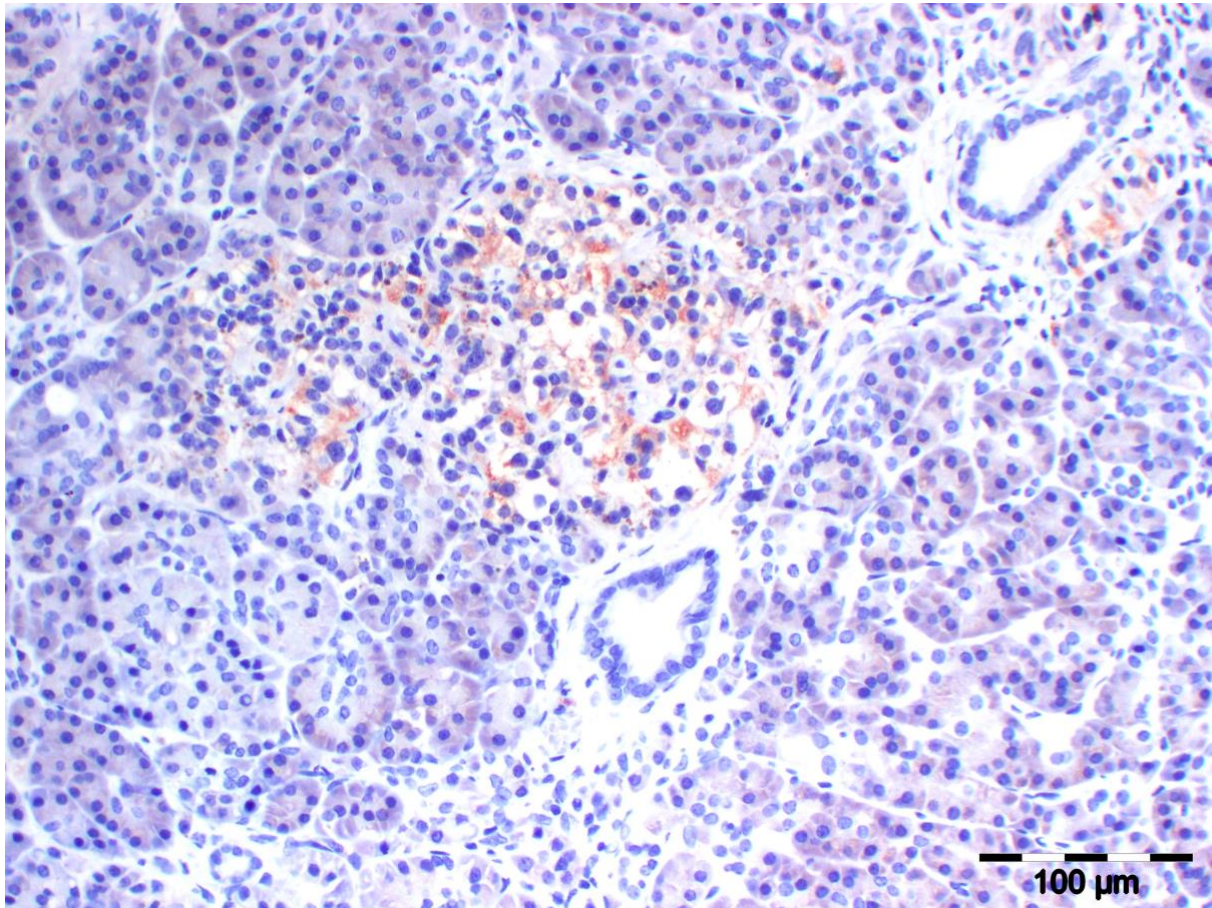


Abbildung 2: Repräsentatives Übersichtsbild aus PDAC-Gewebe. Die mit dem mTOR-Antikörper gefärbten Zellen stellen sich bräunlich dar. Es finden sich Azinuszellen, duktale Zellen sowie Inselzellen. Nur letztere sind hier immunhistochemisch angefärbt.

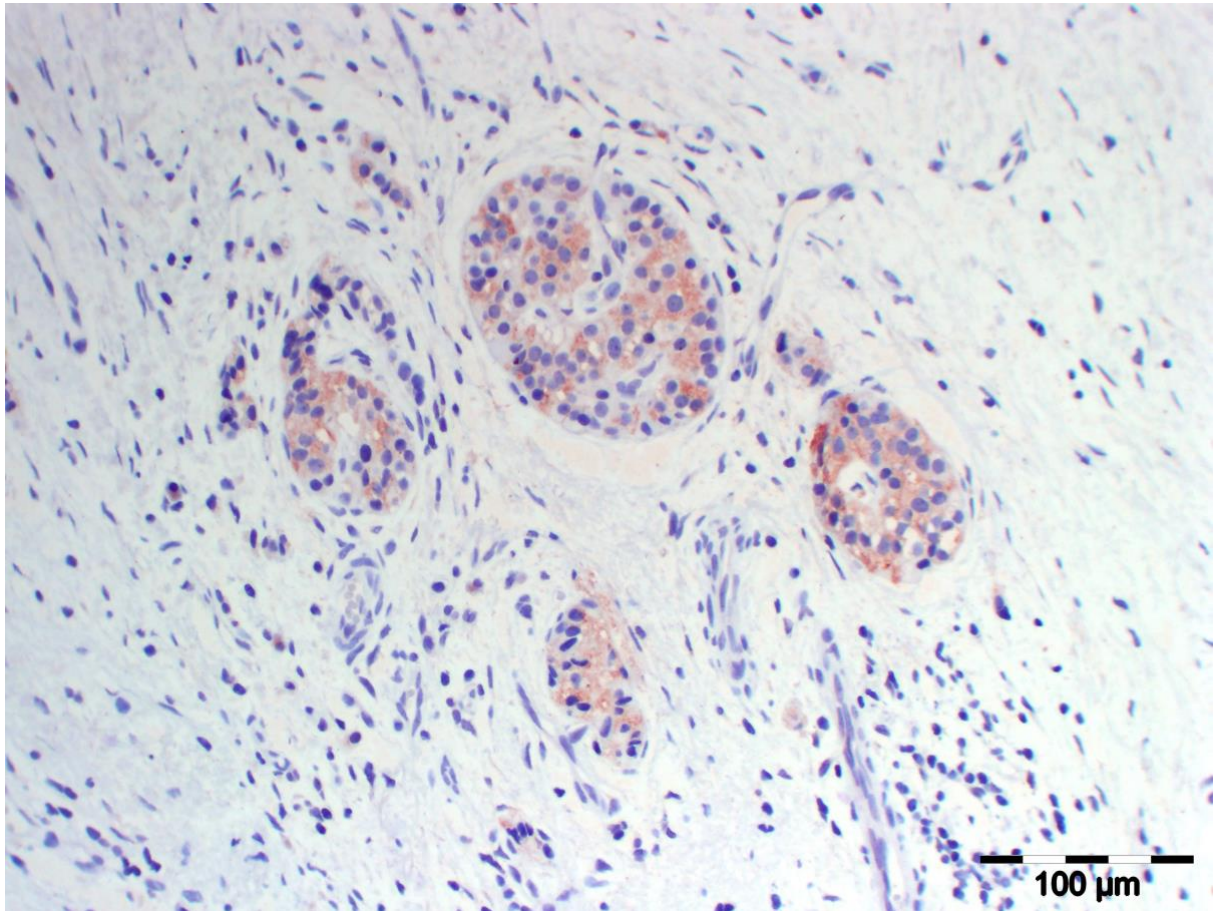


Abbildung 3: Ausschnitt aus PDAC-Gewebe. Es sind in Bindegewebe eingestreute Pankreasinseln dargestellt, die mit dem mTOR-Antikörper immunhistochemisch markiert sind.

Des Weiteren wurde das Färbeverhalten eines Zelltyps in Tumor- und Normalgewebe betrachtet. Wie oben angemerkt, waren in den „p“-Präparaten mehr Inselzellen angefärbt als in den „n“-Präparaten (siehe Diagramm 2). Unter den 11 Wertepärchen ergab sich hierfür eine Signifikanz von  $p=0,03$ .

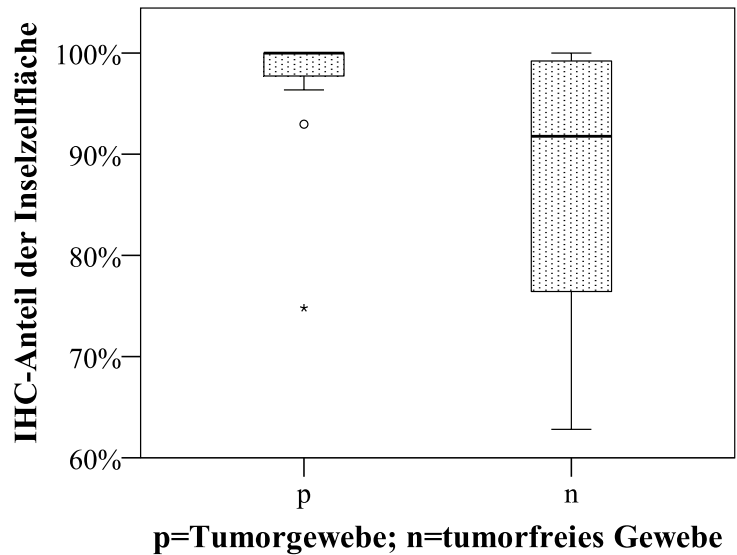


Diagramm 2: Flächiger Anteil der Inselzellen mit IHC-Signal am Gesamt-IHC-Signal im Vergleich.

Im Gegensatz dazu zeigten die Azinuszellen einen signifikant höheren Färbeanteil in den „n“-Schnitten als in den Tumorgewebe (siehe Diagramm 3;  $p=0,03$ ). Bei den duktaalen Zellen ließ sich keine signifikante Verschiedenheit feststellen.

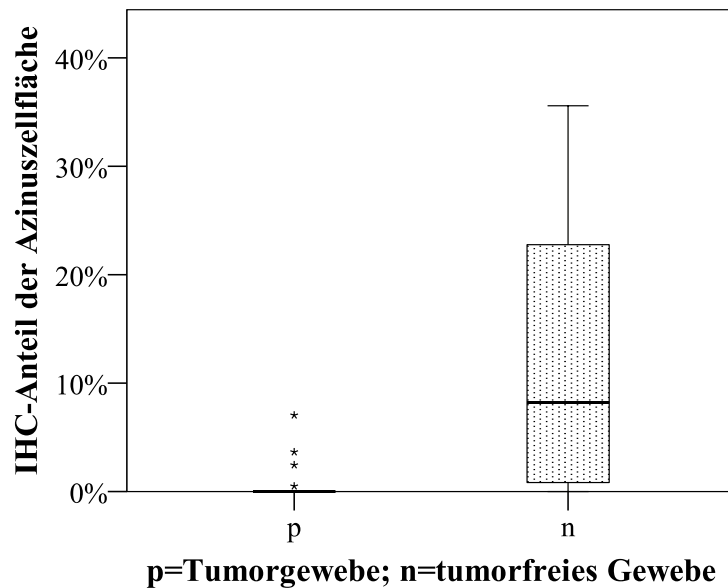


Diagramm 3: Flächiger Anteil der Azinuszellen mit IHC-Signal am Gesamt-IHC-Signal im Vergleich.

#### 4.2.3 Untersuchung anhand klinischer Merkmale

##### 4.2.3.1 Geschlecht

Um etwaige Unterschiede in den Geschlechterkategorien aufzudecken, wurden jeweils innerhalb der „p“- sowie der „n“- Proben die Werte von Männern und Frauen gegenübergestellt. Allerdings zeigten sich in den Gruppen ähnliche Ergebnisse, sodass statistisch keine signifikante Abweichung ermittelt werden konnte.

##### 4.2.3.2 TNM und Grading

Es schloss sich eine Analyse der Proben im Hinblick auf die Tumorgröße, die Lymphknoten- und Fernmetastasierung sowie das Grading an. Für keine dieser Kategorien waren die Ergebnisse jedoch signifikant divergent.

In der IHC wiesen zwei Patienten ein T2- und 27 ein T3-Stadium auf. Die durchschnittliche Anfärbung war im T3-Stadium 3,5-fach erhöht. Allerdings war eine Statistik bei dem geringen Stichprobenumfang der T2-Proben nicht zweckmäßig. Die PCR lieferte im Vergleich zwischen niedrigen und hohen T-Stadien kein signifikantes Ergebnis. In der Betrachtung von N0 und N1 ergaben die beiden Versuchsteile bei diesen Unterkategorien ähnliche Mittelwerte. Ebenso verhielt es sich im Vergleich zwischen M0 und M1. Im Hinblick auf die Differenzierung fasste man gut und mittel differenzierte Proben (GI, GII) zusammen und verglich diese mit GII-III- und GIII-Proben. Auch hier ergab sich in keinem der Versuche ein Unterschied.



#### 4.2.3.3 Diabetes mellitus

Im Folgenden wurde ein eventueller Einfluss eines Diabetes mellitus auf die mTOR-Expression untersucht. Es wurden jedoch keine signifikanten Ergebnisse erzielt.

Unter den tumorfreien Präparaten der PCR wurde ein 1,4-faches Vorhandensein von mTOR-mRNA in Diabetes-Proben im Vergleich zu Nicht-Diabetes-Proben gesehen (siehe Diagramm 4;  $p=0,5$ ). In der Gegenüberstellung der Unterkategorien „NIDDM“, „IDDM“ und „kein Diabetes“ konnten in allen Kombinationen keine signifikante Änderung der Expression ermittelt werden. Dabei wurden die Tumorproben sowie die tumorfreien Präparate je für sich betrachtet und in beiden Versuchsteilen einzeln ausgewertet.

Zusätzlich wurde ermittelt, ob zwischen „n“ und „p“ ein Unterschied besteht, wenn man nur die Diabetes-Proben einschließt. Es zeigte sich hierbei jedoch keine Signifikanz. Analoges wurde in den

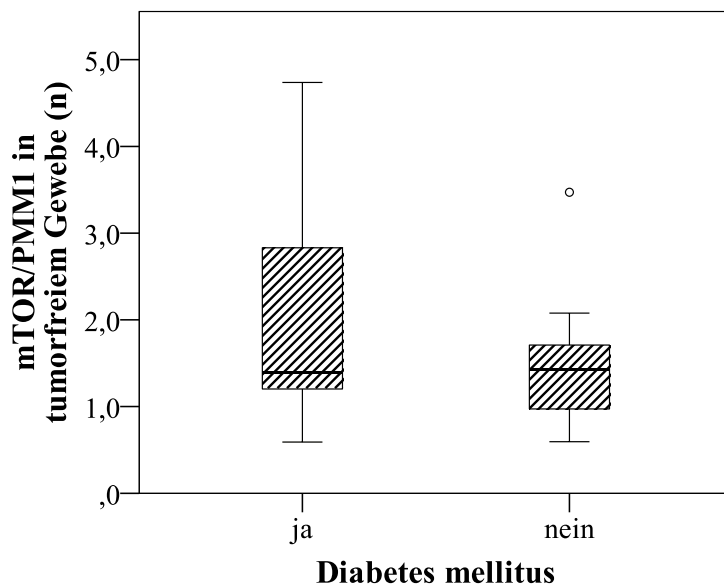


Diagramm 4: mTOR-Expression in tumorfreien PDAC-Proben mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2.

„Nicht-Diabetes“-Proben analysiert. Hier war im Taqman-Versuch eine signifikante Erhöhung um das 1,8-Fache bei den Tumorproben im Vergleich zu den tumorfreien Proben feststellbar ( $p=0,01$ ;  $n=14$ ). Dieses Ergebnis stützt das Gesamtergebnis der PCR, bei dem alle Proben unter dem Gesichtspunkt „p“ und „n“ verglichen wurden (s. o.).

Außerdem wurde getestet, ob die mit dem Antikörper angefärbte Inselfläche in der Histologie Auffälligkeiten im Hinblick auf

Diabetes aufweist. Die Analyse stützt sich auf die Überlegung, dass die Pankreasinseln die Hauptträger des IHC-Signals sind und auch den Ausgangspunkt in der Pathogenese des Diabetes darstellen. Allerdings konnte die Statistik keine Unterschiede aufdecken.

#### 4.2.3.4 Adipositas

Im nächsten Schritt wurden Untersuchungen unter Betrachtung der klinischen Diagnose der Adipositas durchgeführt. Die Immunhistochemie legte keinen signifikanten Unterschied dar, die PCR hingegen schon. Dabei zeigten unter den „p“-Proben die neun Adipositas-Patienten eine 1,4-fache Erhöhung der mTOR-mRNA im Vergleich zu den 45 nicht-adipösen (siehe Diagramm 5;  $p=0,038$ ). Bei den „n“-Proben war die Zunahme 1,3-fach, jedoch nicht signifikant.

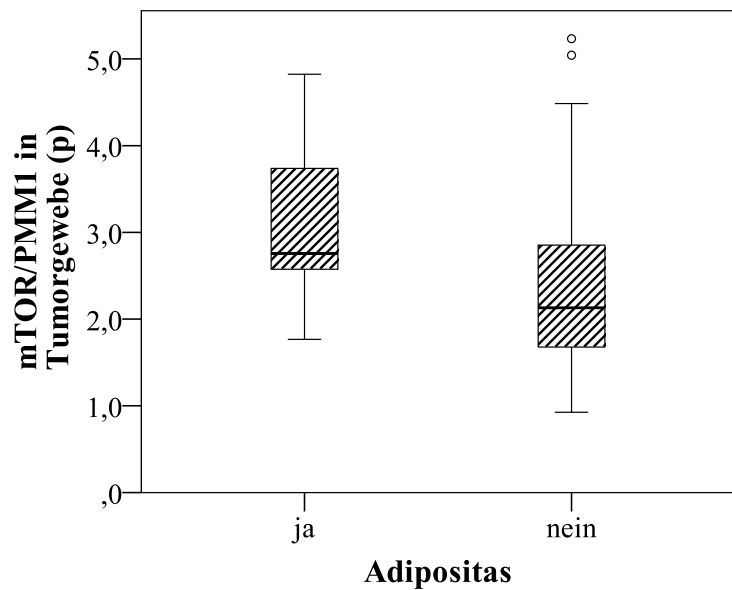


Diagramm 5: mTOR-Expression in tumorhaltigen PDAC-Proben mit und ohne Adipositas.

#### 4.2.3.5 Hyperlipidämie

Für die Diagnose der Hyperlipidämie konnte weder die Immunhistochemie noch der Taqman-Versuch eine signifikante Abweichung zwischen „p“ und „n“ herausstellen. Sowohl unter den Tumorproben als auch unter den tumorfreien Präparaten verhielten sich die Werte in Bezug auf die Diagnose ähnlich.

#### 4.2.3.6 Arterielle Hypertonie

In analoger Weise wurde für die Analyse der arteriellen Hypertonie vorgegangen. Die IHC konnte keine Änderung des Signals feststellen. Auch in der Real-Time-PCR waren die Werte ähnlich. Allerdings zeigte sich unter den tumorfreien Proben sogar eine Signifikanz ( $p=0,026$ ). Eine besondere Bedeutung wurde dem Ergebnis jedoch nicht beigemessen, da die Erhöhung der mTOR-mRNA unter den Hypertonikern nur sehr gering war.

#### 4.2.3.7 CRP

Für die Ermittlung, ob die Entzündungsaktivität die mTOR-Expression beeinflusst, verglich man zunächst die Patienten, bei denen das C-reaktive-Protein präoperativ im Normbereich lag (bis 10 mg/l) mit denen, die ein erhöhtes CRP hatten. Weder für die IHC noch für die PCR ergaben sich signifikante Unterschiede. Auch bei der Gegenüberstellung von normalem und hohem CRP (>30 mg/l) gingen die Werte nicht signifikant auseinander. Im Mittel lag der CRP-Wert unter allen eingeschlossenen Karzinomproben bei 18,16 mg/l. Bei 66% der Patienten lag er im Normbereich.

#### 4.2.3.8 Alkoholabusus

Die Untersuchung des Einflusses des Alkoholabusus war in der IHC nicht möglich, da bei keinem der Patienten aus diesem Kollektiv ein gesicherter regulärer Alkoholkonsum diagnostiziert war. Der Taqman-Versuch deckte auf, dass unter den „p“-Präparaten die Proben von alkoholkranken Patienten ein 1,7-fach erhöhtes Vorhandensein von mTOR-mRNA enthielten als die von nicht-alkoholkranken. Bei den „n“-Proben lag der Faktor ebenfalls bei 1,7. Für beide Beobachtungen ließ sich jedoch bei statistischer Testung keine Signifikanz nachweisen.

#### 4.2.3.9 Nikotinabusus

Der Nikotinabusus als potenzielle Einflussgröße auf die mTOR-Expression konnte in diesen Analysen nicht dargelegt werden.

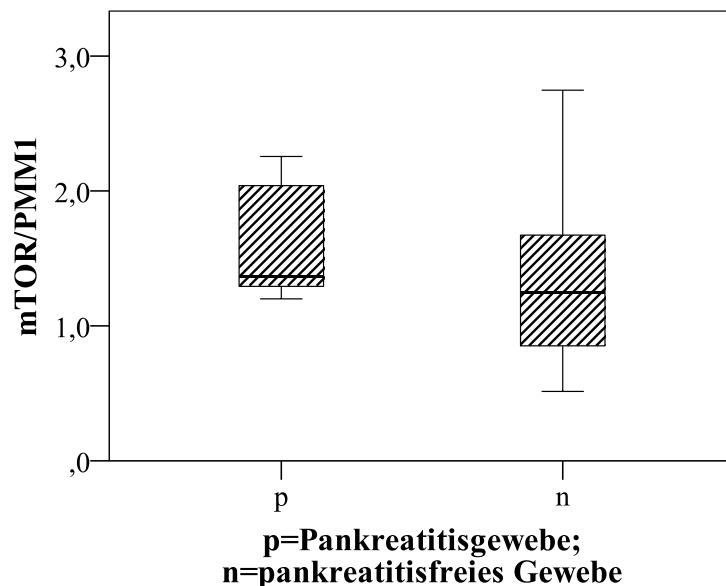


Diagramm 6: mTOR-Expression in Pankreatitis-Proben im Vergleich.

aufwiesen. Die 13 pathologischen Gewebeproben waren im Durchschnitt zu 0,55 % immunhistochemisch gefärbt, während es bei den fünf „n“-Schnitten 0,35 % waren. Der Real-Time-PCR-Versuch konnte sieben Wertepaare miteinander vergleichen und zeigte auf, dass die „p“-Proben im Verhältnis zu den „n“-Proben ein 1,2-Faches der mTOR-mRNA enthielten (siehe Diagramm 6). Die Testung nach Wilcoxon erbrachte jedoch kein signifikantes Ergebnis.

#### 4.3.2 Untersuchung der Zelltypen

Im Pankreatitisgewebe basierte das immunhistochemische Signal flächenmäßig zu mehr als 99 % auf gefärbten Inselzellen (siehe Abbildung 4). Azinuszellen waren zu 0,9 % vertreten, während duktale Zellen den restlichen kleinen Anteil ausmachten. Im gesunden Nachbargewebe der chronischen

### 4.3 Pankreatitis

#### 4.3.1 Gesamtbetrachtung in IHC und PCR

In der Gesamtauswertung konnten die durchgeführten Experimente keine Änderung der mTOR-Expression in Pankreatitis- und Normalgewebe aufdecken. Die Präparate mit chronischer Pankreatitis waren in ihrer immunhistochemischen Anfärbung dem gesunden Nachbargewebe zu ähnlich, als dass sie einen signifikanten Unterschied

Pankreatitis konnte für die Inselzellen ein Anteil von 97,6 % gemessen werden, für die Azinuszellen 2,4 % und für die duktafen 0 %.

Im Vergleich des Inselzellanteils zwischen „p“- und „n“-Gewebe ergab sich nach statistischer Testung kein signifikanter Unterschied. Aus dem analogen Testergebnis für die Azinuszellen und für die duktafen Zellen resultierte ebenso keine Signifikanz.

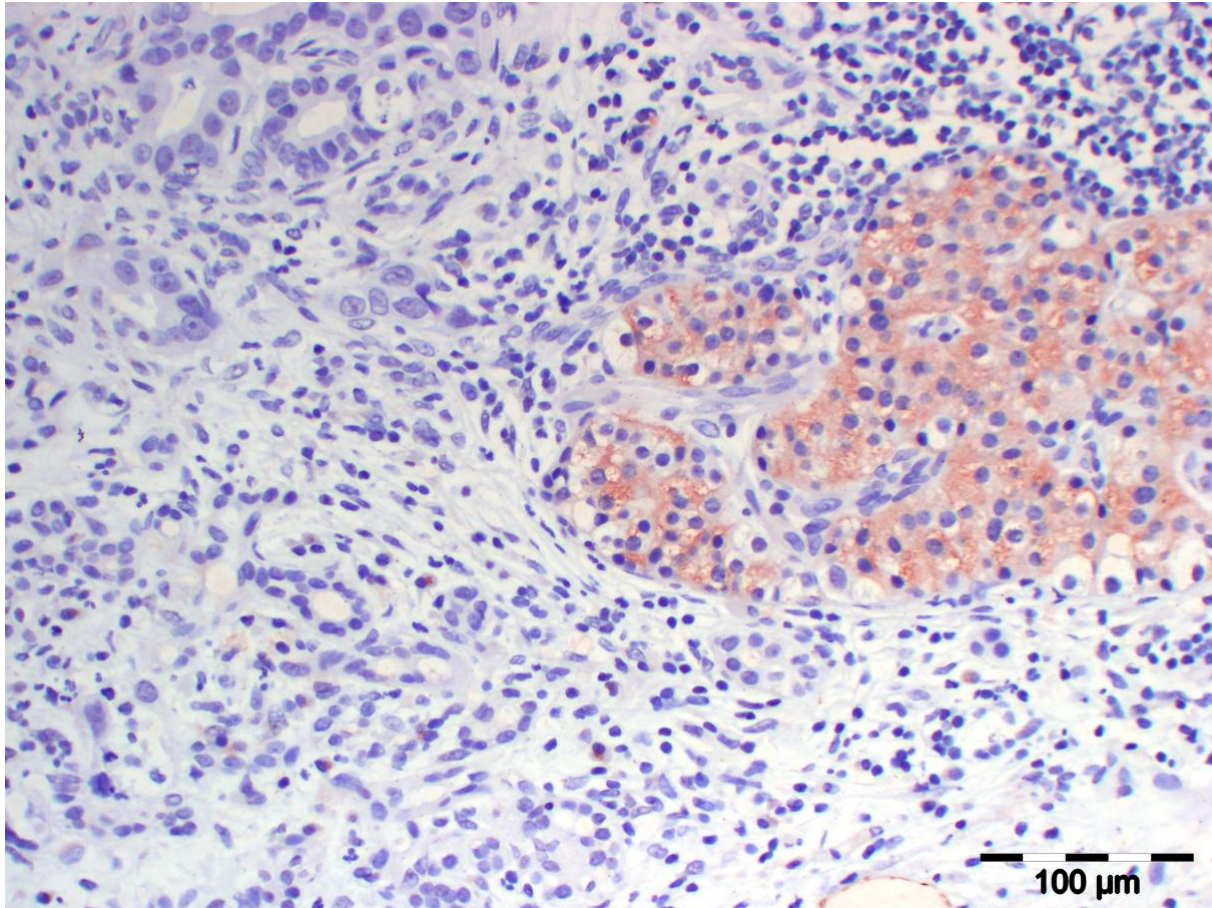


Abbildung 4: Repräsentativer Ausschnitt aus Pankreatitisgewebe. Erkennbar sind die immunhistochemisch gefärbten Inselzellen. Des Weiteren stellen sich eingewanderte Immunzellen sowie duktafe Strukturen dar.

#### 4.3.3 Untersuchung anhand klinischer Merkmale

##### 4.3.3.1 Geschlecht

Die IHC konnte im Hinblick auf Präparate von männlichen und weiblichen Patienten keinen Unterschied feststellen. Gleiches war in der PCR zu sehen. In der Testung wurde jeweils innerhalb des pankreatitisenthaltenden und des pankreatisfreien Probenkollektivs verglichen.

#### 4.3.3.2 Diabetes mellitus

In den Untersuchungen des Diabetes mellitus stellte sich kein signifikantes Ergebnis heraus. Es konnten sich jedoch Tendenzen abzeichnen. So zeigte sich bei den PCR-Proben des gesunden Nachbargewebes eine 1,8-fache Erhöhung der mTOR-mRNA unter drei Diabetikern im Vergleich zu fünf Nicht-Diabetikern (siehe Diagramm 7;  $p=0,14$ ). Zusätzlich wurde nach Unterschieden zwischen „n“ und „p“ gefahndet, wenn man nur die Diabetiker betrachtete. Es war jedoch keine Divergenz feststellbar. Unter den Nicht-Diabetikern hingegen zeigte sich in der PCR bei vier Wertepaaren eine 1,6-fache Erhöhung der mTOR-mRNA in den Pankreatitisproben verglichen mit dem Nachbargewebe ( $p=0,07$ ). Im IHC-Versuch war bei den Nicht-Diabetikern insgesamt eine Anfärbung von 0,55% bei den Pankreatitis-Proben erkennbar. Bei den „n“-Proben waren es nur rund 0,18%. Die Betrachtung der IHC-gefärbten Inselzellfläche am Gesamt-IHC-Signal ließ keine Unterschiede in Bezug auf Diabetes erkennen.

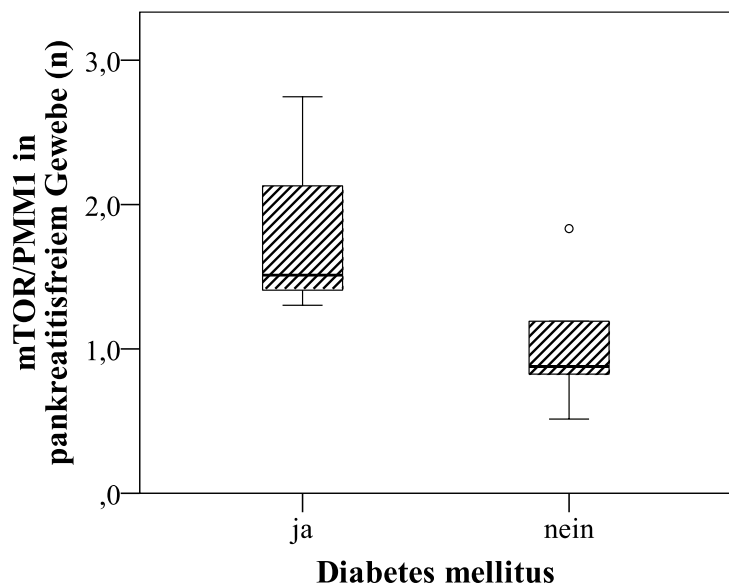


Diagramm 7: mTOR-Expression in pankreatisfreiem Gewebe bei Patienten mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2.

#### 4.3.3.3 Adipositas und Hyperlipidämie

Bei den Nebendiagnosen der Adipositas und der Hyperlipidämie konnte aufgrund der unzureichenden Stichprobenanzahl mit diesen Merkmalen keine statistische Testung erfolgen.

#### 4.3.3.4 Arterielle Hypertonie

Die arterielle Hypertonie konnte in den hier durchgeführten Versuchen nicht als Einflussgröße der mTOR-Expression identifiziert werden. Die Betrachtung innerhalb der pathologischen und normalen Gewebeproben verzeichnete keinen Unterschied unter dem Aspekt des Vorhandenseins von Bluthochdruck. Auch im Vergleich zwischen „n“ und „p“, bei dem zunächst nur das Hypertonie-Kollektiv und später jenes ohne Hypertonie untersucht wurde, waren keine diskrepanten Werte feststellbar.



#### 4.3.3.5 CRP

Als nächstes wurden die Daten unter dem Gesichtspunkt des C-reaktiven Proteins betrachtet. Zwischen erhöhten und normalen CRP-Werten war jedoch keine Änderung in der mTOR-Expression zu erkennen. Sowohl die IHC als auch die PCR lieferten ähnliche Ergebnisse in diesen Kategorien. Im Mittel lag das CRP bei der Pankreatitis im Normbereich.

#### 4.3.3.6 Alkohol- und Nikotinabusus

Regelmäßiger Alkoholkonsum konnte nicht eindeutig als Einfluss auf die mTOR-Expression gewertet werden. In der IHC war keine Verschiedenheit zwischen den Kollektiven erkennbar. Die PCR konnte sowohl für die Pankreatitis-Proben als für die des gesunden Nachbargewebes jeweils nur einen Patienten ohne Alkoholabusus einschließen, sodass keine Statistik durchgeführt werden konnte.

Nikotinabusus war nur bei wenigen der Patienten dokumentiert, sodass sich für die Testung keine ausreichenden Stichproben ergaben.

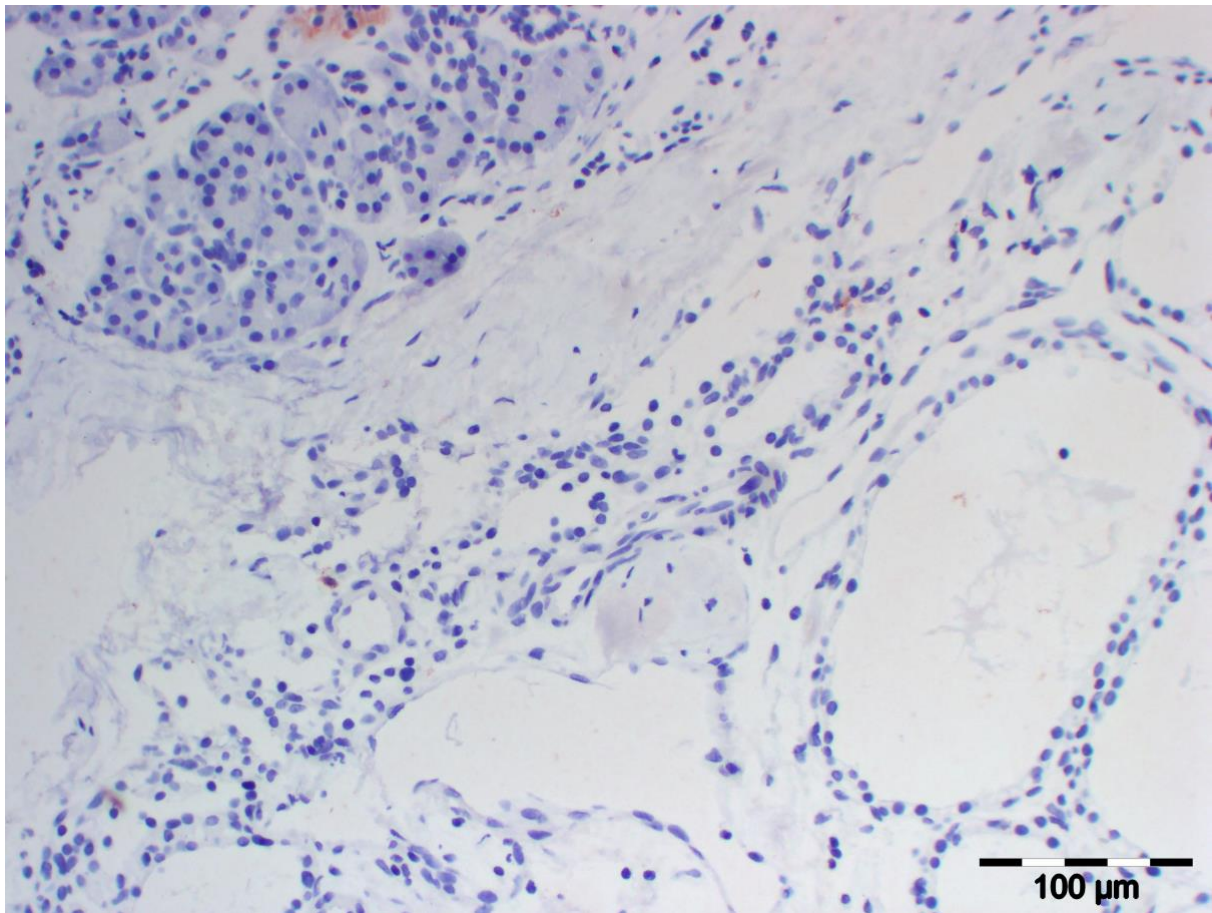
### 4.4 Adenom

#### 4.4.1 Gesamtbetrachtung IHC und PCR

Für das Adenom konnten in den zwei Experimenten keine Unterschiede in der mTOR-Expression zwischen pathologischem und Normalgewebe aufgedeckt werden. In Schnittpräparaten, die Adenomanteile enthielten („p“), lag der durchschnittliche immunhistochemisch markierte Flächenanteil bei 0,08 %. Die adenomfreien Gewebe wiesen einen Anteil von 0,31 % auf. Die Abweichung zwischen diesen beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant. In der PCR lagen die Werte für „n“ und „p“ sehr nah beieinander, sodass auch hier keine Divergenz zu sehen war.

#### 4.4.2 Untersuchung der Zelltypen in der IHC

In den Adenomproben färbten sich nur Insel- und Azinuszellen an (siehe Abbildung 5). In den „p“-Präparaten nahmen die Inselzellen am gesamten immunhistochemischen Signal einen Anteil von mehr als 94 % ein, die Azinuszellen den entsprechenden Rest. In den „n“-Gewebeschnitten waren es zu ca. 99 % Inselzellen und zu ca. 1 % Azinuszellen.



*Abbildung 5: Ausschnitt eines serösen Zystadenoms. Man erkennt die Ausbildung der Zysten sowie azinäre Zellzusammenschlüsse und Bindegewebe. Außerdem ist der Anschnitt einer kleinen Pankreasinsel mit einem immunhistochemischen Signal dargestellt.*

#### 4.4.3 Untersuchung anhand klinischer Merkmale

Auch für das Adenom wurden Vergleiche mit den erhobenen klinischen Merkmalen durchgeführt. Vorgegangen wurde nach dem gleichen Schema wie in den vorangegangenen Untersuchungen der anderen beiden Entitäten. Die Stichprobenanzahl im Adenomkollektiv war jedoch gering, sodass sich statistische Tests zum Teil nicht anbieten. Insgesamt konnte für kein Merkmal eine Signifikanz herausgestellt werden.

Die mTOR-Expression war unter den Geschlechtern nicht unterschiedlich. Auch in der Diagnose des Diabetes mellitus konnte weder die IHC noch die PCR eine Verschiedenheit aufzeigen. Für die Proben der Adipositas-Patienten ergab sich keine mTOR-Erhöhung im Vergleich zu den Patienten ohne diese Erkrankung. Gleiches galt für die arterielle Hypertonie. Die Patienten mit dokumentierter Hyperlipidämie, einem Alkohol- und Nikotinabusus sowie mit erhöhtem CRP reichten für eine statistische Testung nicht aus.

#### 4.5 Vergleich zwischen PDAC, Pankreatitis und Adenom

Um schließlich herauszufinden, ob innerhalb der ausgewählten Entitäten ein Unterschied bestand, verglich man jeweils die „p“-Proben untereinander. Analoges wurde für die „n“-Proben durchgeführt, wobei man hier allerdings keine Abweichung erwartete. Dieser Vergleich diente als Kontrolle, um zu sehen, dass sich Gewebe ohne Pathologie in der mTOR-Expression ähneln.

Zwischen den 29 Karzinomproben und den 13 Pankreatitisproben war bei Mittelwerten von 0,46 % und 0,55 % kein signifikanter Unterschied in der IHC vorhanden. Allerdings zeigte sich in der Gegenüberstellung der PCR-Proben eine Signifikanz. Die 55 tumorenhaltenden Proben, die mit den sieben pankreatitisenthaltenden Proben verglichen wurden, ergaben einen  $p$ -Wert im Mann-Whitney-U-Test von 0,024. Dabei war der durchschnittliche Gehalt an mTOR-mRNA beim PDAC um den Faktor 1,6 im Vergleich zur Pankreatitis erhöht (siehe Diagramm 9). Der Vergleich der „n“-Proben miteinander ergab erwartungsgemäß keine signifikante Änderung in der mTOR-Expression. Sowohl in der IHC als auch in der PCR ähnelten sich die Werte der beiden Entitäten.

Im IHC-Vergleich zwischen PDAC und Adenom erbrachten die „p“-Präparate einen signifikanten

Unterschied von  $p=0,02$ . Während das PDAC einen Färbeanteil von besagten 0,46 % aufwies, betrug dieser bei den Adenompräparaten 0,08 %. Der Taqman-Versuch konnte hingegen keine Verschiedenheit herausstellen. Im Vergleich der „n“-Proben fand sich in keinem der beiden Versuchsteile ein signifikanter Unterschied.

Als letztes wurden die IHC-Ergebnisse der Pankreatitis mit denen des Adenoms gegenübergestellt. Die durchschnittliche Pankreatitisfärbung von 0,55 % wich von der des Adenoms (0,08 %) signifikant ab ( $p=0,01$ ). Auch hier konnte dieser Sachverhalt in den PCR-Ergebnissen nicht gezeigt werden. Der Vergleich der „n“-Proben ergab sowohl in der IHC als auch in der PCR keinen signifikanten Unterschied.

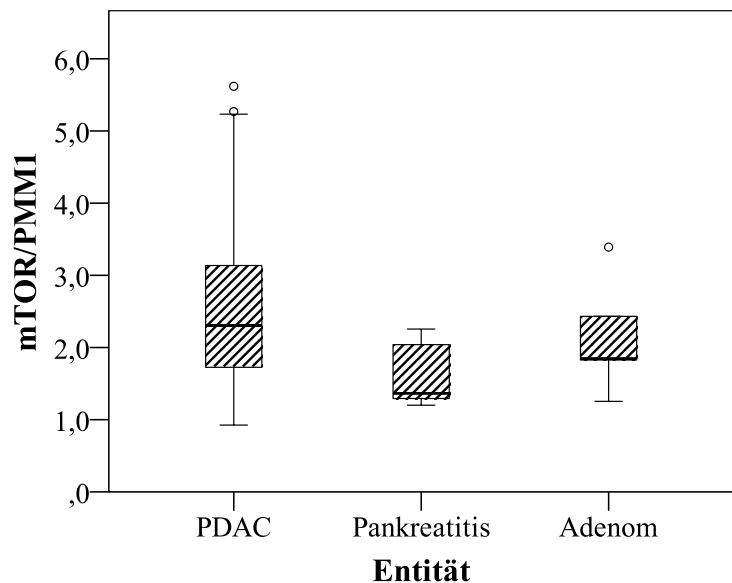


Diagramm 8: mTOR-Expression im Vergleich zwischen PDAC, chronischer Pankreatitis und serösem Zystadenom.

## 5 Diskussion

### 5.1 Hochregulierung von mTOR im Tumorgewebe

Als ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit konnte eine signifikante Überexpression von mTOR im Tumorgewebe auf RNA-Ebene herausgestellt werden. So zeigte die Real-Time-PCR eine signifikant höhere mTOR-Expression in tumorenhaltenden Proben im Vergleich zu nicht betroffenem Nachbargewebe. Außerdem ließ sie einen Anstieg im Tumor im Gegensatz zur Pankreatitis erkennen. Warum ist in PDAC-Gewebe demnach vermehrt mTOR auffindbar?

#### 5.1.1 Genmutationen im duktalem Pankreaskarzinom und die Bedeutung mTORs in dysregulierten Tumorsignalwegen

Dazu soll zunächst gesagt werden, dass verschiedene Genmutationen im PDAC mit dem mTOR-Signalweg verknüpft sind. Überexpression von Protoonkogenen und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen zu erhöhter mTORC1-Aktivität, die dem Signalweg entsprechend zu vermehrtem Zellwachstum führt und als Grund für Tumorentstehung angesehen werden kann (s. u.).

Am häufigsten mit ca. 95 % findet sich im PDAC eine Mutation im Protoonkogen KRAS2. Mutationen sind aber bereits in frühen Stadien der Entartung detektierbar. So sind sie zu 45 % in PanIN-1 Läsionen, zu ca. 50 % in IPMNs mit geringem Dysplasiegrad und zum Teil auch in MZNs beschrieben [32]. KRAS gehört zur Familie der Ras-Proteine, die den Zellzyklus über eine Progression der G1- in die S- Phase regulieren. In der S-Phase wird die DNA repliziert und so die Voraussetzung für eine Zellteilung geschaffen. Von daher ist es nicht verwunderlich, dass der Ras-Signalweg mit mTOR verknüpft ist. Das monomere, kleine G-Protein Ras ist in inaktivem Zustand an GDP gebunden und über einen Lipidanker an der Zellmembran befestigt. Die Aktivierung erfolgt auf Reiz durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren über Rezeptortyrosinkinasen. Die sich anschließenden Signalwege sind die MAPK-Kaskade (*mitogen-activated protein kinase*), der Ral-Signalweg sowie die Aktivierung der PI3K. Über MAPK und PI3K wird außerdem die Expression von Cyclin D1 hochreguliert, was über ein Zusammenspiel mit anderen Faktoren den G1/S-Übergang im Zellzyklus stimuliert [13].

Für mTOR ergeben sich über Ras folgende Vernetzungen: Zum einen wurde der PI3K-Signalweg über PDK1, Akt/PKB, TSC und Rheb bereits beschrieben (s. o.). Zum anderen kann TSC2 aber zusätzlich über den Ras/MAPK-Weg phosphoryliert werden und so zu erhöhter mTORC1-Aktivität führen [62]. Dabei aktiviert Ras die Raf-MEK1/2-ERK1/2-Kaskade, wodurch aktiviertes ERK1/2 direkt TSC2 phosphorylieren und dadurch inaktivieren kann [46]. Folglich kann gesagt werden, dass sowohl der PI3K/Akt als auch der Ras/ERK-Signalweg am TSC1-TSC2-Komplex konvergieren, was zu einer TSC2-Inaktivierung führt und somit mTORC1 aktiviert [78]. Bei Gain-of-Function-Mutationen im Protoonkogen KRAS kann daraus eine Überaktivität von mTORC1 resultieren und dies als Erklärung im Pathogenesemodell des Pankreaskarzinoms herangezogen werden [1].

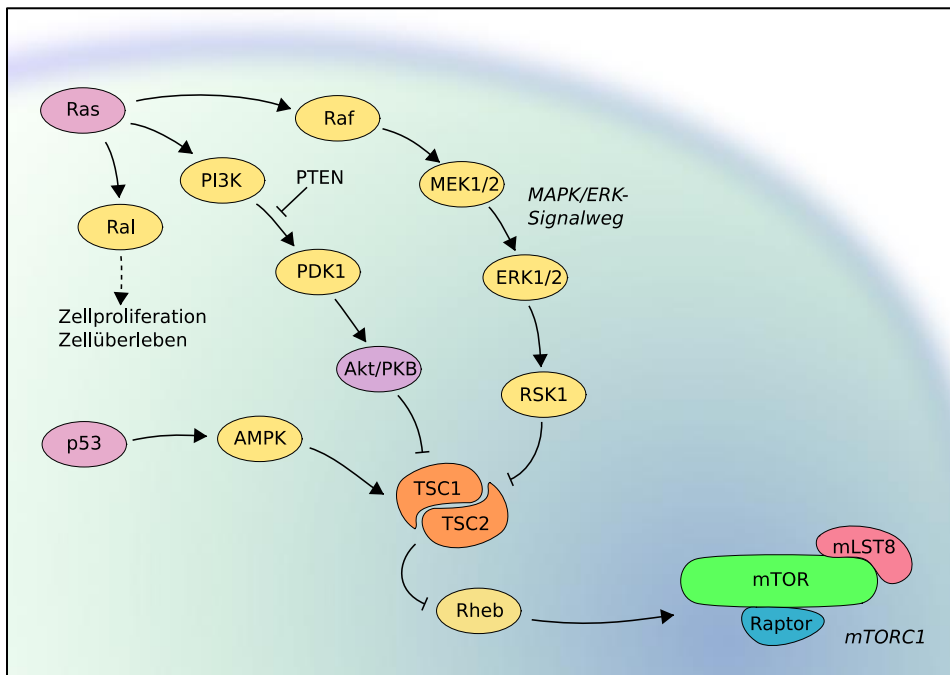


Abbildung 6: Veranschaulichung der Signalwege unter Einbeziehung des Einflusses des Onkoproteins Ras sowie des Tumorsuppressors p53 (eigene Darstellung).

Unter den Tumorsuppressorgenen findet sich bei Pankreaskarzinomen häufig (50-75 %) eine Mutation von p53 [32]. Das Protein p53 sorgt als sog. Wächter des Genoms für die Überwachung der Intaktheit der DNA und blockiert bei DNA-Schäden den Zellzyklus bzw. leitet bei Irreparabilität den kontrollierten Zelltod, die Apoptose, ein. Darüber hinaus wird ihm eine Verbindung zu mTOR zugeschrieben. Es hat sich gezeigt, dass eine p53-Aktivierung mTOR hemmt, indem AMPK aktiviert wird, welches daraufhin TSC2 stimuliert (s. o.) [21]. Mit einer p53-Mutation ginge daher eine erhöhte mTORC1-Aktivität einher [2]. Inaktivierungen von p53 werden erstmalig bei PanIN-3 Läsionen, hochgradig dysplastischen IPMNs sowie in MZNs festgestellt [32]. In Abbildung 6 werden die beschriebenen Signalwege veranschaulicht.

### 5.1.2 Der mTOR-Signalweg als Mediator im Tumorgeschehen des duktales Pankreaskarzinoms

Hinweisend für eine konstitutive Aktivität des mTOR-Signalwegs im PDAC sind Forschungsergebnisse, die einzelne Bestandteile dieses Weges untersuchten. So konnte eine Überaktivität von PI3K, ein Verlust der PTEN-Funktion, eine Überexpression und -aktivität der Proteinkinase B (Akt) sowie eine Phosphorylierung von mTOR und seinen Downstream-Targets p70S6K und 4EBP-1 aufgezeigt werden [6,33,66]. Dies treibt daraufhin die Tumorprogression durch Vermittlung von Zellwachstum und Proliferation voran. Bei Betrachtung o. g. Genmutationen und der Signalwege wird verständlich, wieso mTOR und sein Signalweg schließlich im PDAC aktiviert sind. Eine Hochregulation von mTOR und im Zuge dessen eventuell auch eine vermehrte Expressierung im

Tumor scheint daher im Konsens mit den Ergebnissen aus den hier durchgeführten PCR-Versuchen zu stehen. Die Tatsache, dass auch im Vergleich mit der Pankreatitis als eine Nicht-Tumor-Pathologie mehr mTOR nachgewiesen wurde, unterstreicht diese These (s. u.).

## 5.2 Immunhistochemische Analyse der Zelltypen im duktalem Pankreaskarzinom

### 5.2.1 Inselzellen als Hauptträger des immunhistochemischen Signals in Gewebe des duktalem Pankreaskarzinoms

Der mTOR-Signalweg ist demnach häufig in Tumorzellen des PDAC aktiviert [9]. Nach dieser Feststellung tut sich die Frage auf, wieso die immunhistochemische Untersuchung nun die Inselzellen als Hauptträger des IHC-Signals identifizierte. Zur Beantwortung sollte vorab Einiges über den Versuchsaufbau und die Ergebnisse erläutert werden.

#### 5.2.1.1 Grundsätzliche Überlegungen

Bei jedem Durchgang einer Färbung wurde ein Vergleich mit Negativkontrollen durchgeführt. Es wurde damit auf Mängel in der Ausführung geprüft und bewies nach Auswertung, dass das Experiment erfolgreich war. Das IHC-Signal aus den Inselzellen soll somit als echte Widerspiegelung des Vorhandenseins von mTOR in diesen Zellen gewertet werden.

Eine weitere Beobachtung betrifft das Ergebnis aus der Real-Time-PCR. Der Unterschied zwischen Tumor- und Nachbargewebe ist signifikant, sodass eine Überexpression von mTOR im PDAC als Arbeitshypothese verwendet werden kann. Die Tatsache, dass geschildeter Unterschied ein verhältnismäßig geringer ist, sollte hierbei jedoch nicht außer Acht gelassen werden.

Zudem sei angemerkt, dass Inselzellen, genauer gesagt  $\beta$ -Zellen, mTOR für ihre normale Funktion benötigen. Das Protein spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der  $\beta$ -Zell-Masse und Funktion der Inselzellen, indem es die Zellgröße und die Insulinproduktion kontrolliert [50]. Die Aufgabe der  $\beta$ -Zelle im Körper ist es, das aktuelle Nährstoffangebot zu erkennen und adäquat durch Insulinsekretion darauf zu reagieren [24,49]. Erhöhte Glukose- und Aminosäurespiegel hemmen AMPK, was die Phosphorylierung der mTOR-Zielproteine p70S6K und 4E-BP1 stimuliert und die oben erwähnten Prozesse in Gang setzt [24]. Die Tatsache, dass  $\beta$ -Zellen sowohl einen Insulinrezeptor an ihrer Oberfläche tragen, (welcher für sich bereits die mTOR-Kaskade auslöst), als auch selbst das Insulin synthetisieren und sezernieren, unterstreicht eine genaue Regulation der verknüpften Signalwege. Eine autokrine Aktivierung erfolgt deshalb nur bei gleichzeitigem Vorhandensein des Insulins mit einem ausreichenden Glukose- und Aminosäureangebot [49]. Die Verdeutlichung der Integration von mTOR in die Aufgabenbereiche der  $\beta$ -Zelle macht so eine Detektion des Proteins in den immunhistochemischen Versuchen nicht verwunderlich.

### 5.2.1.2 Methodisch bedingte, verminderte Gewichtung duktaler Zellen in der Immunhistochemie

Da die Inselzellen nun mit Abstand den größten Teil des IHC-Signals im Versuch dieser Studie ausmachen, fallen eventuelle Unterschiede anderer Zellarten nicht ins Gewicht. Um geringe Unterschiede aufzudecken, könnte die PCR sensitiver sein als die Methode der IHC. Allerdings kann der Unterschied in der PCR nicht mehr auf einen bestimmten Zelltyp zurückgeführt werden. Unter Einbeziehung der oben aufgeführten Literatur kann jedoch auf die entartenden dukталen Zellen geschlossen werden, da sich durch ihre o. g. Genmutationen eine Überexprimierung von mTOR erklären lässt [9].

Warum sich die IHC weniger sensitiv verhält und die dukталen Zellen nicht ausreichend gewichtet, kann einige Gründe haben. Zum einen ist ihr Ergebnis abhängig vom Anteil der Strukturen, die nicht in die Auswertung mit einfließen sollen. Dazu gehörten z. B. große Flächen an Fettgewebe oder leere „Löcher“ im Gewebeschnitt. Weitgehend konnte das jedoch reduziert werden, da diese Bereiche im Zuge der Auswertung mit Hilfe der Computersoftware herausgenommen wurden. Zum anderen unterliegt die histologische Auswertung dem anteiligen Anschnitt der zu interessierenden Strukturen. Wenn der Gewebeschnitt aus dem Paraffinblock beispielsweise nur einen geringen Teil an Gangformationen, aber einen großen Teil an Azinus- und Inselzellen enthält, verkleinert sich auch der Anteil der Anfärbung dukталer Zellen am Gesamtschnitt. Hier wurde allerdings vor der Durchführung der IHC an Probeschnitten mit HE-Färbung sorgfältig mit Hilfe des Instituts für Pathologie darauf geachtet, nur Schnitte mit einem ausreichenden Tumoranteil einzuschließen. Dennoch blieben Schwankungen innerhalb aller Gewebeschnitte bestehen, die in ihrer Gesamtheit zu einer schwierigeren Interpretation der Ergebnisse beitragen können.

Außerdem könnte auch die verwendete Verdünnung einen Einfluss auf das Ergebnis haben. Diese wurde für den Primärantikörper bewusst hoch gewählt. Während im Datenblatt des Herstellers eine Verdünnung von 1:400 empfohlen wird, benutzte man in dieser Arbeit hingegen eine von 1:2000. Das Streben, ein Hintergrundrauschen so weit wie möglich zu reduzieren, um die Antikörperreaktion klar abgrenzen zu können, machte ein solches Vorgehen erforderlich. Im Zuge dessen verminderte sich auch die Intensität des Signals. Dies könnte dazu führen, dass sich schwach anfärbbare, aber mTOR-exprimierende Strukturen, nicht mehr zu erkennen geben und sich in der Gegenfärbung mit Hämatoxylin verlieren. Auch das kann ein Grund sein, warum die IHC an Detektionsempfindlichkeit einbüßen könnte.

Im Gegensatz zu all dem wurde für die Real-Time-PCR kein mikroskopierbarer, kleiner Ausschnitt betrachtet, sondern die Gesamtheit des Gewebelöckchens der Analyse zugeführt. Potenzielle Ungenauigkeiten, die bei der IHC durch Untersuchung nur eines Bruchteils des Gewebes zustande kommen, können somit verringert werden. Dazu soll nicht außer Acht gelassen werden, dass diese Methoden in ihren Grundsätzen verschieden sind und deshalb nur bedingt gegeneinander aufgewogen

werden können. Die Werthhaftigkeit der IHC liegt im Aufschluss über zelluläre Gegebenheiten, die der PCR in quantitativen Auskünften.

Basierend auf diesen Begründungen kann der Anstieg der mTOR-mRNA im Experiment der Real-Time-PCR auf die Entartung der Tumorzellen zurückgeführt werden.

### 5.2.2 Die entzündliche Mikroumgebung des Tumors als Reiz für die Hochregulation von mTOR in benachbarten Inselzellen

Die zweite Beobachtung aus der Immunhistochemie war, dass im Tumorgewebe mehr Inselzellen ein IHC-Signal trugen als im tumorfreien Nachbargewebe. Als Erklärung könnte die örtliche Nähe der Inselzellen zu den Tumorzellen herangezogen werden. So könnte eine inflammatorische Mikroumgebung des Tumors, welche u. a. das Zytokin IL-6 enthält [27], unter Umständen einen Effekt auf die  $\beta$ -Zellen ausüben. In anderen Studien wurde gezeigt, dass IL-6 die  $\beta$ -Zelle zu einer Produktion von Insulin anregen kann [17,68]. Wie genau die Verflechtungen mit mTOR dabei aussehen, bleibt hingegen weitgehend unerforscht. Die Insulinproduktion wird jedoch, wie oben erwähnt, über mTOR kontrolliert [50]. Des Weiteren wurde eine Aktivierung von mTOR durch IL-6 bereits in Leberzellen beschrieben [40]. Inwieweit dies auf  $\beta$ -Zellen übertragbar ist, ist unklar. Eine Mehrsekretion von Insulin käme den Tumorzellen jedoch zugute, da sie ihre Energieausbeute durch eine vermehrte Glukoseaufnahme steigern. Dass sie dafür vermehrt Insulinrezeptoren an ihrer Oberfläche exprimieren, ist ebenfalls bereits bekannt [37,56]. Um verifizieren zu können, dass PDAC-Zellen die  $\beta$ -Zellen tatsächlich parakrin über Zytokine zu einer mTOR-vermittelten Insulinsynthese anregen, bedürfte es weiterer Untersuchungen. Das Ergebnis aus der IHC könnte jedoch darauf hindeuten.

### 5.2.3 Nährstoffentzug der Azinuszellen durch Tumorgewebe

Ganz im Gegensatz zu den Inselzellen, wurde bei den Azinuszellen ein vermindertes IHC-Signal im Tumorgewebe gesehen. Auch hier könnten lokale Mechanismen des Tumors für diese Beobachtung verantwortlich sein. Zunächst soll festgehalten werden, dass auch Azinuszellen mTOR für ihr Zellwachstum benötigen [15,74]. Deshalb ist es nicht unverständlich, dass die Immunhistochemie das Protein im Normalgewebe detektierte. Der Grund, weshalb im Tumorgewebe dagegen weniger Anfärbung gesehen wurde, könnte in der Natur der benachbarten Tumorzellen liegen. Ein anerkanntes Modell der Tumorprogression ist, dass Tumorzellen dem umliegenden Gewebe Nährstoffe für ihre eigenen Zwecke entziehen [22]. Dies könnte somit auch auf die Gegebenheiten in den hier untersuchten Proben zutreffen. Ein Nährstoffmangel bei den Azinuszellen führte daraufhin zu einer Herunterregulierung von mTOR [15,18], sodass auch die IHC ein vermindertes Detektionssignal dieser Zellen im Tumorgewebe lieferte.



### 5.3 Hochregulation ohne Überexpression von mTOR in der chronischen Pankreatitis

Für die chronische Pankreatitis konnte kein Unterschied zwischen pathologischem und gesundem Nachbargewebe darlegt werden. Allerdings weisen Ergebnisse von Forschungsgruppen aus früheren Arbeiten auf eine Aktivierung des mTOR-Signalwegs in chronischer Pankreatitis hin [9]. Wie lassen sich nun diese Befunde vereinbaren? Rückschlüsse auf die Aktivierung von mTOR erfolgte in jenen Untersuchungen durch die Beobachtung eines vermehrt detektierten, phosphorylierten Downstream-Targets des Signalwegs, dem p-RPS6. Ziel der Experimente dieser Arbeit war jedoch das Protein mTOR, ungeachtet seines Phosphorylierungsstatus. Deshalb widersprechen sich die Literatur und die Ergebnisse dieser Studie nicht. Im Gegenteil, in Einklang mit diesen Erkenntnissen kann nun gesagt werden, dass die Expression von mTOR in der Pankreatitis im Vergleich zum Normalgewebe womöglich nicht gesteigert ist, der Aktivierungsstatus sich jedoch geändert hat.

#### 5.3.1 Die Störung der Autophagie und die Stimulation zur Fibrose als molekulare Mechanismen der Pankreatitis und ihre Vermittlung durch mTOR

Um sich der chronischen Pankreatitis anzunähern, soll zunächst ihre Vorstufe, die akute Verlaufsform, genauer betrachtet werden. Die akute Pankreatitis stellt eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse dar, die bei wiederholtem Auftreten durch Zellnekrosen zu einer chronischen Inflammation und Fibrosierung (chronische Pankreatitis) führen kann [76].

Grundlage ist die Feststellung einer gestörten Autophagie-Funktion in der Pankreatitis [27,34,35]. Aus der Autophagie-Störung resultieren einige Folgen. Zum einen führt es zu einer intrazellulären Akkumulation von Vakuolen und dadurch zu einem Azinuszellschaden, der schließlich in Nekrose mündet und seinerseits proinflammatorisch wirkt. Zum anderen wird durch ein Cathepsin-B/Cathepsin-L-Ungleichgewicht vorzeitig Trypsinogen zu Trypsin aktiviert, welches ein wichtiger Schritt in der Ausbildung einer akuten Pankreatitis ist [27].

Außerdem soll Autophagozytose normalerweise die Entzündung begrenzen, was bei gestörter Funktion nicht möglich ist. Das Protein p62 wird nicht abgebaut, was zur Aktivierung des zentralen Entzündungsmediators und Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt [52]. Des Weiteren werden dysfunktionale Mitochondrien nicht eliminiert und dies mündet in oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffverbindungen, welche Inflammasome aktivieren. Diese können aber durch die gestörte Autophagozytose ebenfalls nicht abgebaut werden. Gleiches gilt darüber hinaus auch für anfallendes apoptotisches und im Zuge dessen auch proinflammatorisches Material. Die beeinträchtigte Autophagozytose treibt also durch all diese Mechanismen die Entzündung voran [27].

Insgesamt betrachtet kann gesagt werden, dass die gestörte Autophagie für die akute Pankreatitis eine wichtige pathophysiologische Rolle spielt und diese mit mTOR über Signalwege in Verbindung steht. Das Zusammenspiel ist allerdings hoch komplex und zum Teil noch unverstanden. Da sich die

chronische Pankreatitis durch eine persistierende, niedrige Entzündung auszeichnet, wird auch hier die Theorie der beeinträchtigten (konkreter: verminderten) Autophagozytose zu Grunde gelegt [27].

Der andere Aspekt, der eine chronische Pankreatitis charakterisiert, ist neben der Entzündung die Entwicklung einer ausgeprägten Fibrose. Verantwortlich dafür ist die epithelial-mesenchymale Transition der pankreatischen Sternzellen [79], welche den integralen Mechanismus der Gewebsfibrosierung darstellt [44]. Die Zellen werden über das Fibrose-induzierende Zytokin TGF- $\beta$ 1 aktiviert und setzen so den Prozess in Gang [79]. Intrazellulär wird angenommen, dass TGF- $\beta$ 1 die PTEN-Expression herunterreguliert und so über die PI3K-Akt-Aktivierung mTOR aktiviert wird [79]. Dies führt schließlich zu einer vermehrten Einlagerung von Bindegewebe in die Extrazellulärmatrix. Insofern wird deutlich, wie mTOR sowohl über die Vermittlung einer Entzündung als auch im Fibrosierungsgeschehen in der Pathogenese der chronischen Pankreatitis miteingebunden ist.

### 5.3.2 Verminderte Wachstumsstimulation in der chronischen Pankreatitis im Vergleich zum duktalem Pankreaskarzinom

Außerdem war die Beobachtung interessant, dass im PCR-Versuch in Pankreatitisgewebe eine geringere mTOR-Expression zu sehen war als in PDAC-Gewebe. Zum einen könnte der Grund hierfür in mutierten Tumorsuppressorgenen und/oder Protoonkogenen liegen, die nur bei Tumoren auftreten. Diese, wie z. B. p53 und KRAS, haben Assoziationen zum mTOR-Signalweg (s. o.), da sie das Zellwachstum fördern, das bei Tumorzellen unkontrolliert voranschreitet [2,13,21,62]. Die Pankreatitis als eine nicht-tumoröse Erkrankung weist diese Mutationen hingegen nicht auf. Außerdem ist auch das PTEN in Tumoren vermindert exprimiert, während es in der Pankreatitis unverändert vorliegt [9]. Dieses kann daraufhin bei Verlust seine hemmende Wirkung auf den mTOR-Signalweg nicht ausüben [78]. Zudem können die IGF-Rezeptoren eine Rolle spielen. Zwar sind in Pankreatitis und PDAC vermehrt IGF-Rezeptoren exprimiert, in der Pankreatitis jedoch im Vergleich weniger stark [37]. Das kann erklären, weshalb im Tumor auch mehr mTOR als Downstream-Target des Signalwegs vorhanden ist. Insgesamt kann gesagt werden, dass in der Pankreatitis weniger wachstumspromovierende Faktoren bestehen als im Tumorgewebe. Deshalb ist es möglich, dass mTOR im Tumor im Vergleich zur Pankreatitis vermehrt exprimiert wird.

### 5.4 Keine Hochregulierung von mTOR in Adenomgewebe

Im Adenomkollektiv konnte kein Unterschied in den Vergleichen gefunden werden. Die Untersuchung war explorativ, konnte jedoch bei dem geringen Stichprobenumfang keine Signifikanz oder Tendenz festmachen. Wünschenswert wären in dieser Hinsicht weitere Experimente.

Bei den Vergleichen zwischen den Pathologien ergaben sich unterschiedliche IHC-Signale, bei denen das Adenom stets den geringeren Färbeanteil aufwies. Dennoch muss auch hier gesagt werden, dass das Ergebnis nur vorsichtig interpretiert werden sollte. Die Färbeanteile des Adenoms wiesen eine große

Streuung und Inkonstanz auf, sodass hier nur der Einschluss mehrerer Proben Aufschluss über den tatsächlichen Sachverhalt geben kann.

Aufgrund der Wachstumstendenz benigner Tumoren könnte man bei den Adenomen ebenfalls eine Hochregulation von mTOR erwarten. Wie bereits erwähnt finden sich in muzinös-zystischen (MZN) und in intraduktal-papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN) bereits Mutationen von KRAS sowie von p53 [32,77]. Seröse Zystadenome zeigen diese Mutationen hingegen nicht, was als Grund für ihre äußerst geringe Entartungstendenz angesehen werden könnte [77]. Da die Untersuchungen dieser Arbeit ausschließlich seröse Zystadenome einschließen konnten, blieb auch die mutationsbedingte, oben beschriebene Aktivierung des mTOR-Signalwegs aus. Dies kann als Erklärung dienen, weshalb auch hier die Ergebnisse keine erhöhte Expression von mTOR zeigten.

## 5.5 Analyse der klinischen Merkmale

### 5.5.1 Geschlecht

Aus den durchgeführten Experimenten lässt sich auf keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern in der mTOR-Expression des Pankreas schließen. Hinweise auf eine geschlechterspezifische Aktivierung des mTOR-Signalwegs wurden in manchen Organen bereits beschrieben [8,12,60]. So zeigte sich beispielsweise in Verbindung mit dem Autophagieprozess eine erhöhte mTOR-Expression in männlichen Herzzellen von Ratten als in weiblichen [12]. In weiblichen Mäuseleberzellen konnte eine gesteigerte Phosphorylierung von Downstream-Targets im Vergleich zu männlichen nachgewiesen werden, während in Fettzellen kein Unterschied auszumachen war [8]. Die Unterschiede sind nicht zu verallgemeinern, denn sie scheinen sowohl organ- als auch altersspezifisch zu sein und unterscheiden sich womöglich auch zwischen Speziesformen [8]. Im Pankreas wurde der Sachverhalt bisher nur wenig erforscht. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass sich die mTOR-Expression in diesem Organ unter den Geschlechtern womöglich nicht unterscheidet.

### 5.5.2 TNM und Grading

Hohes Staging und Grading waren in den hier vorgestellten Ergebnissen nicht mit erhöhter mTOR-Expression assoziiert. Dass dies allerdings vorkommen kann, zeigte sich am Beispiel des Magenkarzinoms [80]. Dort wurde dargelegt, dass eine erhöhte mTOR-Expression mit hoher bis mäßiger Differenzierung und T1- und T2-Tumoren korrelierte, während eine Überexpression von phosphoryliertem mTOR mit einer Lymphknotenmetastasierung einherging [80]. Hinweisend dafür, dass dies im Pankreaskarzinom nicht der Fall ist, könnten Erkenntnisse aus einer Untersuchung von Akt2 sein. Akt2, welches im PDAC vermehrt exprimiert wird [47,64] und mTOR im Signalweg übergeordnet ist [78], zeigte keine Beziehung zu TNM-Stadien oder Grading [64]. Insofern könnten die hier erzielten Ergebnisse mit mTOR als Downstream-Target von Akt damit im Einklang stehen.

### 5.5.3 Adipositas und Diabetes mellitus

Die Betrachtung der mTOR-Expression bei Adipositas-Patienten ergab nur beim PDAC einen signifikanten Zusammenhang. Beim Diabetes mellitus Typ 2 konnten Tendenzen ausgemacht werden, die darauf hinweisen können, dass mTOR auch in dieser Erkrankung eine wichtige Rolle spielt. Um Aufschluss über diesen Sachverhalt zu gewinnen, sei zunächst die Beziehung zwischen Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 herauszustellen.

Der mTOR-Signalweg steht mit dem Fettstoffwechsel in Verbindung [39,78] und Übergewicht ist wiederum prädisponierend für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus [29]. Deshalb liegt es nahe, die molekularen Mechanismen dieser Vernetzung genauer zu betrachten. Triglyzeride sind eine sehr effiziente Form der Energiespeicherung im Körper [81]. Nährstoffe aktivieren mTORC1 und bewirken eine Stimulation der Entwicklung von Präadipozyten zu Adipozyten sowie die Ansammlung von Lipiden in Fettzellen über die Hochregulation von PPAR $\gamma$  [39,81]. Hochkalorische Nahrung und Überernährung führen über das dauerhafte Vorhandensein von Nährstoffen im Blut zu einer Überaktivierung der mTOR/S6K1-Achse [70]. So kann sich demnach der Zusammenhang einer Detektion von gesteigertem mTOR in den hier ausgewählten Patienten mit Adipositas erklären. Dieser Umstand trägt schließlich zu einer Desensibilisierung gegenüber Insulin bei, da ein negativer Rückkopplungsmechanismus über die aktivierte S6K1 die Funktion des IRS hemmt [70]. Die dazu führende verminderte Akt-Aktivierung führt zu verminderter Glukoseaufnahme in die Zelle, zu verminderter Glykogensynthese sowie zu einer Stimulation der Glukoneogenese in der Leber [81]. Über die negative Rückkopplung wäre anzunehmen, dass dadurch auch mTORC1 gehemmt würde. Warum ist aber mTORC1 unter insulinresistenten Umständen trotzdem dauerhaft aktiv? Die Erklärung liegt hierbei in den bei Adipositas auftretenden hohen Aminosäurespiegeln im Blut, welche über den Nährstoffzweig mTORC1 weiterhin aktivieren [57]. Diese oben genannten Effekte verschlechtern somit die hyperglykämische und hyperinsulinämische Stoffwechsellage und sind Ausgangspunkt der Entwicklung eines T2DM [81].

Auch wenn die Ergebnisse mit T2DM keine Signifikanz ergaben, können die herausgestellten Tendenzen mit Hilfe dieser Theorie begrifflich gemacht werden [11,70,81]. Für eine isolierte Analyse des Sachverhaltes könnte der Einschluss mehrerer Proben sowie eine Untersuchung ohne einen potenziellen Confounder, wie evtl. ein PDAC, dienlich sein. Weitere Experimente zur Bestimmung von mTOR in Pankreasgewebe in Verbindung mit Diabetes sind deshalb Gegenstand aktueller Forschung unserer Arbeitsgruppe.

### 5.5.4 Hyperlipidämie

In Bezug auf die Hyperlipidämie stellte sich bei keiner Entität eine mTOR-Erhöhung heraus. Zum einen kann das am geringen Stichprobenumfang liegen. Tatsächlich zeigte sich zum anderen jedoch in Studien, dass Lipidstoffwechselstörungen eher eine Nebenwirkung einer mTORC1-Hemmung durch

Rapamycin darstellen [48,58]. Dies lässt wiederum Rückschlüsse auf die Funktion von mTOR in der Zelle zu. Auf dieser Grundlage kann sich erklären, weshalb sich keine mTOR-Erhöhung im Zusammenhang mit Hyperlipidämie in den hier durchgeführten Versuchen zeigte.

#### 5.5.5 Arterielle Hypertonie

Bei Untersuchung der arteriellen Hypertonie fand sich keine Erhöhung der mTOR-Expression. Wie mTOR mit der Entstehung von Bluthochdruck zusammenhängt, soll hier kurz dargelegt werden. Grundlage ist die Beziehung zwischen einer arteriellen Hypertonie und atherosklerotischen Veränderungen an den Gefäßwänden [41]. Neben Lipidablagerungen spielt auch eine Proliferation der glatten Muskelzellen im Anfangsstadium eine Rolle [19]. Dass diese mTOR-vermittelt ist, zeigt sich anschaulich an mit Rapamycin beschichteten Stenteinlagen, die eine Restenosierung eines zuvor verschlossenen Gefäßes verhindern [19]. Außerdem wird die glatte Muskelzelle durch Angiotensin II, welches über Vasokonstriktion zu Bluthochdruck führt, u. a. über mTOR zur Hypertrophie angeregt [19,23,38]. Dass keine mTOR-Erhöhung in den Versuchen erhoben werden konnte, sei zum einen dadurch begründet, dass viele der Patienten bereits mit ACE-Hemmern oder mit Angiotensin-II-Rezeptor-Blockern mediziert waren. Zum anderen sollte anstatt des Pankreasgewebes Gefäßschnitte verwendet werden, um den Sachverhalt der arteriellen Hypertonie genauer zu erforschen.

#### 5.5.6 CRP

Zwischen erhöhten und normalen CRP-Werten ließ sich in den oben aufgeführten Versuchen kein statistischer Unterschied aufzeigen. Wie mTOR mit einer Entzündung zusammenhängen kann, soll weiter unten genauer ausgeführt werden. Dass in dieser Arbeit jedoch kein Unterschied festgestellt wurde, kann folgende Gründe haben. Zum einen lag der CRP-Wert im Mittel nicht sehr hoch. Das PDAC und die chronische Pankreatitis zeichnen sich durch eine konstante, aber geringe Entzündungsreaktion des Gewebes aus [27]. Deshalb könnte ein Unterschied zu klein sein, um ihn aufzudecken. Im Vergleich zwischen hohen (>30mg/l) und normalen Werten war die Stichprobenanzahl möglicherweise zu gering.

#### 5.5.7 Alkoholabusus

Für regelmäßigen Alkoholkonsum konnte nur im PDAC eine Erhöhung von mTOR in der PCR gesehen werden. Das Ergebnis war jedoch nicht signifikant. Dass chronischer Alkoholkonsum einen Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis und damit einhergehend auch eines PDAC ist, ist bereits bekannt [3,29,75,76]. Da der mTOR-Signalweg in chronischer Pankreatitis und im PDAC hochreguliert ist [9], könnte sich somit auch ein Zusammenhang zwischen Alkohol und mTOR ergeben. Tatsächlich führt die Aufnahme von Alkohol zu einer Sensibilisierung von Azinuszellen gegenüber Cholezystokinin (CCK) [59]. Dieses Hormon, welches im oberen Duodenum produziert

wird, regt das Pankreas zur Enzymsekretion an, ist jedoch auch am Fibrosierungsprozess bei Pankreatitis wesentlich beteiligt [59]. Für CCK hat sich außerdem gezeigt, dass es den mTOR-Signalweg aktivieren kann [73], woraus sich eine Erhöhung der mTOR-Aktivität erklären könnte.

In Bezug auf das Ergebnis dieser Arbeit, sollte erwähnt werden, dass ein Alkoholkonsum nicht immer sicher anhand der verfügbaren Patientendokumente zu eruieren war, sodass ein statistisches Ergebnis nur schwer zu erzielen war. Diesbezüglich wären deshalb weitere Untersuchungen wünschenswert.

#### 5.5.8 Nikotinabusus

Nikotinabusus konnte in diesen Experimenten keine Assoziation mit vermehrter mTOR-Expression aufweisen. Auch Tabakrauchen ist als Risikofaktor für die Entwicklung eines PDAC definiert [29]. Es zeigte sich in neueren Studien, dass Nikotin die Karzinogenese bei KRAS-mutierten PDACs vorantreibt [28]. So aktiviert es Signalwege über Akt und Erk1/2 [28]. Beide Effekte sind mit dem mTOR-Signalweg verknüpft [46,78], sodass sich hierüber eine Verbindung zwischen Tabakrauchen und mTOR ergibt. Dass kein Ergebnis in dieser Arbeit erzielt wurde, kann einerseits an mangelnder Dokumentation der Suchterkrankung und am damit verbundenen Verlust an Stichproben liegen. Andererseits ist bislang noch nicht geklärt, wie sich eine Aktivierung von mTOR ausprägt und ob daneben auch eine Expressionserhöhung von mTOR durch Nikotin zu erwarten ist. Dies kann nur durch weitere Untersuchungen enthüllt werden.

#### 5.6 Vorstellung eines Pathogenesemodells

Die Entstehung eines Pankreaskarzinoms vereint verschiedene Entartungswege und Risikofaktoren, die sich sowohl gegenseitig beeinflussen als auch miteinander zusammenhängen. Anhand der Untersuchungen von mTOR konnten einige Schlüsselstellen der Pathomechanismen in dieser Arbeit dargestellt werden. In Zusammenführung der untersuchten Gesichtspunkte soll die Erstellung eines ganzheitlichen Pathogenesemodells Klarheit über molekularbiologische Mechanismen verschaffen und Verflechtungen zwischen Begleitpathologien aufzeigen.

Wenn das Pankreaskarzinom als Endpunkt angesehen werden soll, so fließen mehrere zuführende Arme in die Entwicklung mit ein. Akute Pankreatitiden, welche durch Alkoholkonsum ausgelöst werden können [29], führen über die Nekrose-Fibrose-Sequenz zur Ausbildung einer chronischen Pankreatitis [76]. Molekularbiologisches Korrelat bildet hierbei eine mTOR-Hochregulation in den pankreatischen Sternzellen, welche daraufhin vermehrt Kollagen in die Extrazellulärmatrix einlagern [79].

Der Aspekt der Entzündung in der chronischen Pankreatitis schlägt sich u. a. in einer reduzierten Autophagiefunktion der Pankreaszellen nieder, welche ebenfalls mTOR-vermittelt ist und schließlich in vermehrter Nekrose mündet [27]. Entzündungsfördernd über einen veränderten Stoffwechsel ist außerdem die Adipositas. Die anabole Stoffwechsellage bei hochkalorischer Nahrungsaufnahme führt zu vermehrter Fettanreicherung und zu einer erhöhten mTORC1-Aktivität [51]. Auch hierdurch wird

die Autophagozytose gehemmt. Im Rahmen der Fettgewebsanreicherung wandern außerdem vermehrt Makrophagen in das Gewebe ein und sezernieren proinflammatorische Zytokine [36].

Über die chronische Pankreatitis kann sich danach ein Pankreaskarzinom ausbilden. Zum einen tragen hierbei Genmutationen (wie z. B. von KRAS) bei, welche über erhöhte mTOR-Aktivität die unkontrollierte Zellproliferation fördern und auch für Entartungen aus adenomatösen Vorstufen sorgen [32,77]. Zum anderen schreitet die Tumorentwicklung auch über die Entzündung voran. Einerseits werden in pankreatischen Epithelzellen durch die KRAS-Aktivierung Entzündungsmediatoren wie IL-6, IL-11, TNF $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  freigesetzt, wodurch die Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF- $\kappa$ B aktiviert werden. Dies fördert das Überleben der Zelle, stimuliert Proliferation und hält eine entzündliche Tumormikroumgebung aufrecht [27]. Andererseits produzieren die KRAS-exprimierenden, neoplastischen Zellen GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor), welcher immunsuppressive Effekte für die entartenden Zellen hat und somit die PDAC-Entwicklung fördert [14]. Weitere Effekte einer chronischen Inflammation sind die Hemmung der Onkogen-induzierten Seneszenz, einem Schutzmechanismus gegen unkontrolliertes Wachstum [26], sowie eine Stimulation der epithelial-mesenchymalen Transition, dem Vorgang, der für Metastasierung und Invasivität verantwortlich ist [61]. Des Weiteren wird durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus über NF- $\kappa$ B die RAS-Aktivität verstärkt und verlängert, die letztendlich wieder zu verstärkter Entzündung und Tumorprogression führt [16]. Es kann festgehalten werden, dass Entzündung einen wichtigen Katalysator in der Karzinogenese darstellt.

Tabakrauchen kann die Genese eines PDAC ebenfalls vorantreiben. Das Nikotin aktiviert dabei Signalwege, in welche mTOR miteingebunden ist [28].

Schließlich trägt die Adipositas (neben ihrer entzündungsfördernden Eigenschaft) auch zu einem Fortschreiten der Pankreaskarzinomentwicklung bei. Eine mTOR-Erhöhung ist durch die erhöhten Aminosäurespiegel im Blut zu erklären, welche das Protein zu einer Hochregulation veranlassen [57]. Ein sich auf dieser Grundlage entwickelnder Diabetes mellitus Typ II stellt über die chronisch erhöhten Insulinspiegel für sich auch einen Risikofaktor für das PDAC dar [11]. Die erhöhte Tendenz zur Tumorentwicklung kann sich bei diesen Pathologien durch die hochregulierte wachstums- und proliferationsfördernde Eigenschaft von mTOR erklären.

## 5.7 Zusammenfassung

Wie dieses Modell zeigt, fließen in die Entwicklung eines Karzinoms des Pankreas mehrere Faktoren mit ein. Mit dem Augenmerk auf mTOR konnte diese Arbeit einige dieser Aspekte aufzeigen.

Durch die hier ausgeführten Experimente konnte eine Hochregulierung von mTOR auf RNA-Ebene im Tumorgeschehen erfasst werden. So zeigte sich im PDAC eine vermehrte Expression in der Real-Time-PCR. In der chronischen Pankreatitis und im Pankreasadenom ließ sich dies nicht nachweisen, was die Bedeutung einer vermehrten Expression von mTOR in der malignen Entartung betont.

Da die Untersuchungen auch Begleiterkrankungen der Patienten miteinschlossen, konnten auch prädisponierende Risikofaktoren für ein PDAC, die mit mTOR in Verbindung stehen, erfasst werden. Dementsprechend wurde ein positiver Zusammenhang zwischen Adipositas und mTOR im Pankreaskarzinom erzielt. Für Diabetes mellitus Typ 2 und mTOR war die Beziehung in den Experimenten nicht eindeutig. Es gaben sich jedoch Tendenzen zu erkennen, die für einen Zusammenhang sprechen und mit dem oben dargestellten Modell zu vereinbaren wären.

Überdies lieferten die immunhistochemischen Untersuchungen Einsichten in die mTOR-Expression in den Parenchymzellen. So machte die Anfärbung der Pankreasinseln eine Bedeutung von mTOR in diesen Zellen sichtbar.

Von mTOR gehen zahlreiche Funktionen der Zelle aus, die das normale Überleben der Zelle sichern. In die Entwicklung verschiedener Pathologien scheint es jedoch ebenfalls miteinbezogen zu sein. Diese Arbeit widmete sich der chronischen Pankreatitis, dem Adenom und dem Karzinom des Pankreas und konnte kleine Einsichten in die Komplexität dieses Gebietes erbringen. Dennoch wird insbesondere für das Verständnis und die Therapie der Erkrankungen die Beschäftigung mit mTOR auch in der Zukunft noch Gegenstand weiterer Forschung sein.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Agbunag C, Bar-Sagi D (2004) Oncogenic K-ras drives cell cycle progression and phenotypic conversion of primary pancreatic duct epithelial cells. *Cancer Res* 64:5659–5663
2. Akeno N, Miller AL, Ma X, Wikenheiser-Brokamp KA (2015) p53 suppresses carcinoma progression by inhibiting mTOR pathway activation. *Oncogene* 34:589–599
3. Apte MV, Wilson JS, McCaughan GW, Korsten MA, Haber PS, Norton ID, Pirola RC (1995) Ethanol-induced alterations in messenger RNA levels correlate with glandular content of pancreatic enzymes. *J Lab Clin Med* 125:634–640
4. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS (1998) Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 43:128–133
5. Arastéh K (2013) *Innere Medizin. 3., überarbeitete Auflage* edition. Thieme, Stuttgart
6. Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SAG (2004) The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF- $\kappa$ B and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 23:8571–8580
7. Aumüller G, Wolff W, Herausgeber (2010) *Anatomie: 208 Tabellen ; [mit DVD zum Präp.-Kurs]. 2., überarb. Aufl* edition. Thieme, Stuttgart
8. Baar EL, Carbajal KA, Ong IM, Lamming DW (2016) Sex- and tissue-specific changes in mTOR signaling with age in C57BL/6J mice. *Aging Cell* 15:155–166
9. Bellizzi AM, Bloomston M, Zhou X-P, Iwenofu OH, Frankel WL (2010) The mTOR pathway is frequently activated in pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM* 18:442–447
10. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H, Herausgeber (2012) *Pathologie: mit rund 150 Tabellen ; [Plus im Web, mediscript]. 5., vollständig überarbeitete Auflage* edition. Elsevier, Urban & Fischer, München
11. Calle EE, Kaaks R (2004) Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 4:579–591
12. Campesi I, Straface E, Occhioni S, Montella A, Franconi F (2013) Protein oxidation seems to be linked to constitutive autophagy: A sex study. *Life Sci* 93:145–152
13. Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF (2004) RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:355–366
14. Cox AD, Olive KP (2012) Silencing the Killers: Paracrine Immune Suppression in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* 21:715–716
15. Crozier SJ, D'Alecy LG, Ernst SA, Ginsburg LE, Williams JA (2009) Molecular Mechanisms of Pancreatic Dysfunction Induced by Protein Malnutrition. *Gastroenterology* 137:1093-1101.e3
16. Daniluk J, Liu Y, Deng D, Chu J, Huang H, Gaiser S, Cruz-Monserrate Z, Wang H, Ji B, Logsdon CD (2012) An NF- $\kappa$ B pathway-mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice. *J Clin Invest* 122:1519–1528
17. Dauriz M, Trombetta M, Boselli L, Santi L, Brangani C, Pichiri I, Bonora E, Bonadonna RC (2016) Interleukin-6 as a potential positive modulator of human beta-cell function: an

- exploratory analysis—the Verona Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Study (VNDS) 6. *Acta Diabetol* 53:393–402
18. Duran A, Amanchy R, Linares JF, Joshi J, Abu-Baker S, Porollo A, Hansen M, Moscat J, Diaz-Meco MT (2011) p62 Is a Key Regulator of Nutrient Sensing in the mTORC1 Pathway. *Mol Cell* 44:134–146
  19. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG (2002) Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 8:1249–1256
  20. Edinger AL, Thompson CB (2002) Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell* 13:2276–2288
  21. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8204–8209
  22. Gabbert H, Gerharz CD, Ramp U, Bohl J (1986) The nature of host tissue destruction in tumor invasion. *Virchows Arch B Cell Pathol Zell-Pathol* 52:513–527
  23. Giasson E, Meloche S (1995) Role of p70 S6 Protein Kinase in Angiotensin II-induced Protein Synthesis in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* 270:5225–5231
  24. Gleason CE, Lu D, Witters LA, Newgard CB, Birnbaum MJ (2007) The Role of AMPK and mTOR in Nutrient Sensing in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *J Biol Chem* 282:10341–10351
  25. Gstaiger M (2003) Control of Nutrient-Sensitive Transcription Programs by the Unconventional Prefoldin URI. *Science* 302:1208–1212
  26. Guerra C, Collado M, Navas C, Schuhmacher AJ, Hernández-Porrás I, Cañamero M, Rodríguez-Justo M, Serrano M, Barbacid M (2011) Pancreatitis-Induced Inflammation Contributes to Pancreatic Cancer by Inhibiting Oncogene-Induced Senescence. *Cancer Cell* 19:728–739
  27. Gukovsky I, Li N, Todoric J, Gukovskaya A, Karin M (2013) Inflammation, Autophagy, and Obesity: Common Features in the Pathogenesis of Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 144:1199-1209.e4
  28. Hermann PC, Sancho P, Cañamero M, Martinelli P, Madriles F, Michl P, Gress T, de Pascual R, Gándia L, Guerra C, Barbacid M, Wagner M, Vieira CR, Aicher A, Real FX, Sainz B, Heeschen C (2014) Nicotine Promotes Initiation and Progression of KRAS-Induced Pancreatic Cancer via Gata6-Dependent Dedifferentiation of Acinar Cells in Mice. *Gastroenterology* 147:1119-1133.e4
  29. Herold G, Herausgeber (2017) *Innere Medizin 2017: eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Gerd Herold, Köln
  30. Hoeffler CA, Klann E (2010) mTOR signaling: At the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 33:67–75
  31. Holzapfel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete*. *Biol Unserer Zeit* 37:120–126
  32. Hong S-M, Park JY, Hruban RH, Goggins M (2011) Molecular signatures of pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 135:716–727
  33. Ito D, Fujimoto K, Mori T, Kami K, Koizumi M, Toyoda E, Kawaguchi Y, Doi R (2006) In vivo antitumor effect of the mTOR inhibitor CCI-779 and gemcitabine in xenograft models of human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 118:2337–2343

34. Iwahashi K, Hikita H, Shigekawa M, Ikezawa K, Takatoshi N, Sakamori R, Miyagi T, Tatsumi T, Takehara T (2015) 257 Basal Autophagy Plays an Important Role in Maintaining the Integrity of Pancreatic Acinar Cells in Mice. *Gastroenterology* 148:S-58
35. Ji L, Li L, Qu F, Zhang G, Wang Y, Bai X, Pan S, Xue D, Wang G, Sun B (2016) Hydrogen sulphide exacerbates acute pancreatitis by over-activating autophagy *via* AMPK/mTOR pathway. *J Cell Mol Med* 20:2349–2361
36. Johnson AR, Justin Milner J, Makowski L (2012) The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev* 249:218–238
37. Karna E, Surazynski A, Orłowski K, Puchalski Z, Nawrat P, Pałka J (2002) Serum and tissue level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I binding proteins as an index of pancreatitis and pancreatic cancer. *Int J Exp Pathol* 83:239–246
38. Kendall RT, Lee M-H, Pleasant DL, Robinson K, Kuppuswamy D, McDermott PJ, Luttrell LM (2014) Arrestin-dependent Angiotensin AT<sub>1</sub> Receptor Signaling Regulates Akt and mTor-mediated Protein Synthesis. *J Biol Chem* 289:26155–26166
39. Kim JE, Chen J (2004) Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Activity by Mammalian Target of Rapamycin and Amino Acids in Adipogenesis. *Diabetes* 53:2748–2756
40. Kim J-H, Kim JE, Liu H-Y, Cao W, Chen J (2008) Regulation of Interleukin-6-induced Hepatic Insulin Resistance by Mammalian Target of Rapamycin through the STAT3-SOCS3 Pathway. *J Biol Chem* 283:708–715
41. Kojda G, Harrison D (1999) Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 43:652–671
42. Kosmahl M, Pauser U, Anlauf M, Sipos B, Peters K, Lüttges J, Klöppel G (2005) Zystische Pankreastumoren und ihre Klassifikation: Alte und neue Gesichter. *Pathol* 26:22–30
43. Lang G (2006) *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer-Verlag
44. Lee K, Nelson CM (2012) New Insights into the Regulation of Epithelial–Mesenchymal Transition and Tissue Fibrosis. ElsevierURL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123943057000045>
45. Lottspeich F, Engels JW, Herausgeber (2012) *Bioanalytik*. 3. Auflage edition. Springer Spektrum, Berlin Heidelberg
46. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP (2005) Phosphorylation and Functional Inactivation of TSC2 by Erk. *Cell* 121:179–193
47. Maitra A, Hruban RH (2008) Pancreatic Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 3:157–188
48. Martinet W, De Loof H, De Meyer GRY (2014) mTOR inhibition: A promising strategy for stabilization of atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 233:601–607
49. McDaniel ML, Marshall CA, Pappan KL, Kwon G (2002) Metabolic and autocrine regulation of the mammalian target of rapamycin by pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 51:2877–2885
50. Mori H, Inoki K, Opland D, Munzberg H, Villanueva EC, Faouzi M, Ikenoue T, Kwiatkowski DJ, MacDougald OA, Myers MG, Guan K-L (2009) Critical roles for the TSC-mTOR pathway in -cell function. *AJP Endocrinol Metab* 297:E1013–E1022

51. Moscat J, Diaz-Meco MT (2011) Feedback on Fat: p62-mTORC1-Autophagy Connections. *Cell* 147:724–727
52. Moscat J, Diaz-Meco MT (2012) p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem Sci* 37:230–236
53. Müllhardt C (2013) *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
54. Müller H-J, Prange DR (2016) *Real-Time-PCR*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg URL: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-48236-0\\_14](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-48236-0_14)
55. Müller M (2016) *Chirurgie für Studium und Praxis: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen*. 13. Auflage, 2016/17 edition. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach
56. Nair PN, De Armond DT, Adamo ML, Strodel WE, Freeman JW (2001) Aberrant expression and activation of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) are mediated by an induction of IGF-1R promoter activity and stabilization of IGF-1R mRNA and contributes to growth factor independence and increased survival of the pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2. *Oncogene* 20:8203–8214
57. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS, Eisensohn H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD, Svetkey LP (2009) A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab* 9:311–326
58. Pallet N, Legendre C (2013) Adverse events associated with mTOR inhibitors. *Expert Opin Drug Saf* 12:177–186
59. Pandol SJ, Gukovsky I, Satoh A, Lugea A, Gukovskaya AS (2003) Animal and in vitro models of alcoholic pancreatitis: role of cholecystokinin. *Pancreas* 27:297–300
60. Paturi S, Gutta AK, Katta A, Kakarla SK, Arvapalli RK, Gadde MK, Nalabotu SK, Rice KM, Wu M, Blough E (2010) Effects of aging and gender on muscle mass and regulation of Akt-mTOR-p70s6k related signaling in the F344BN rat model. *Mech Ageing Dev* 131:202–209
61. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD, Stanger BZ (2012) EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation. *Cell* 148:349–361
62. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J (2004) Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13489–13494
63. Rubie C, Kempf K, Hans J, Su T, Tilton B, Georg T, Brittner B, Ludwig B, Schilling M (2005) Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probes* 19:101–109
64. Ruggeri BA, Huang L, Wood M, Cheng JQ, Testa JR (1998) Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol Carcinog* 21:81–86
65. Schima W, Ba-Ssalamah A, Plank C, Kulinna-Cosentini C, Prokesch R, Tribl B, Sautner T, Niederle B (2006) Pankreas: Teil II: Tumoren. *Radiol* 46:421–438

66. Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ (2003) Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer* 89:2110–2115
67. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85
68. Suzuki T, Imai J, Yamada T, Ishigaki Y, Kaneko K, Uno K, Hasegawa Y, Ishihara H, Oka Y, Katagiri H (2011) Interleukin-6 Enhances Glucose-Stimulated Insulin Secretion From Pancreatic -Cells: Potential Involvement of the PLC-IP3-Dependent Pathway. *Diabetes* 60:537–547
69. True LD (2008) Quality control in molecular immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* 130:473–480
70. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431:200–205
71. Wang X (2006) The mTOR Pathway in the Control of Protein Synthesis. *Physiology* 21:362–369
72. Welsch U, Deller T (2010) *Lehrbuch Histologie: [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch]. 3. Aufl edition. Elsevier, Urban & Fischer, München*
73. Williams JA, Dolors Sans M, Tashiro M, Schäfer C, Bragado MJ, Dabrowski A (2002) Cholecystokinin activates a variety of intracellular signal transduction mechanisms in rodent pancreatic acinar cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 91:297–303
74. Williams JA (2010) Regulation of acinar cell function in the pancreas: *Curr Opin Gastroenterol* 26:478–483
75. Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS (2007) Chronic Pancreatitis: Challenges and Advances in Pathogenesis, Genetics, Diagnosis, and Therapy. *Gastroenterology* 132:1557–1573
76. Witt H (2014) Pathogenese der chronischen Pankreatitis. *Gastroenterol* 9:6–13
77. Wu J, Jiao Y, Dal Molin M, Maitra A, de Wilde RF, Wood LD, Eshleman JR, Goggins MG, Wolfgang CL, Canto MI, Schulick RD, Edil BH, Choti MA, Adsay V, Klimstra DS, Offerhaus GJA, Klein AP, Kopelovich L, Carter H, Karchin R, Allen PJ, Schmidt CM, Naito Y, Diaz LA, Kinzler KW, Papadopoulos N, Hruban RH, Vogelstein B (2011) Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci* 108:21188–21193
78. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* 124:471–484
79. Xu M, Wang G, Zhou H, Cai J, Li P, Zhou M, Lu Y, Jiang X, Huang H, Zhang Y, Gong A (2017) TGF- $\beta$ 1-miR-200a-PTEN induces epithelial–mesenchymal transition and fibrosis of pancreatic stellate cells. *Mol Cell Biochem* 431:161–168
80. Yu G, Wang J, Chen Y, Wang X, Pan J, Li G, Jia Z, Li Q, Yao JC, Xie K (2009) Overexpression of Phosphorylated Mammalian Target of Rapamycin Predicts Lymph Node Metastasis and Prognosis of Chinese Patients with Gastric Cancer. *Clin Cancer Res* 15:1821–1829
81. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:21–35

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der mTOR-Signalweg und seine Einbindung in Zellfunktionen (eigene Darstellung)...	20
Abbildung 2: Repräsentatives Übersichtsbild aus PDAC-Gewebe. Die mit dem mTOR-Antikörper gefärbten Zellen stellen sich bräunlich dar. Es finden sich Azinuszellen, duktale Zellen sowie Inselzellen. Nur letztere sind hier immunhistochemisch angefärbt. ....	41
Abbildung 3: Ausschnitt aus PDAC-Gewebe. Es sind in Bindegewebe eingestreute Pankreasinseln dargestellt, die mit dem mTOR-Antikörper immunhistochemisch markiert sind. ....	42
Abbildung 4: Repräsentativer Ausschnitt aus Pankreatitisgewebe. Erkennbar sind die immunhistochemisch gefärbten Inselzellen. Des Weiteren stellen sich eingewanderte Immunzellen sowie duktale Strukturen dar. ....	47
Abbildung 5: Ausschnitt eines serösen Zystadenoms. Man erkennt die Ausbildung der Zysten sowie azinäre Zellzusammenschlüsse und Bindegewebe. Außerdem ist der Anschnitt einer kleinen Pankreasinsel mit einem immunhistochemischen Signal dargestellt. ....	50
Abbildung 6: Veranschaulichung der Signalwege unter Einbeziehung des Einflusses des Onkoproteins Ras sowie des Tumorsuppressors p53 (eigene Darstellung).....	53

## 8 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: mTOR-Expression in PDAC-Proben im Vergleich. ....	40
Diagramm 2: Flächiger Anteil der Inselzellen mit IHC-Signal am Gesamt-IHC-Signal im Vergleich. ....	42
Diagramm 3: Flächiger Anteil der Azinuszellen mit IHC-Signal am Gesamt-IHC-Signal im Vergleich. ....	43
Diagramm 4: mTOR-Expression in tumorfreien PDAC-Proben mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2. ....	44
Diagramm 5: mTOR-Expression in tumorhaltigen PDAC-Proben mit und ohne Adipositas. ....	45
Diagramm 6: mTOR-Expression in Pankreatitis-Proben im Vergleich. ....	46
Diagramm 7: mTOR-Expression in pankreatitisfreiem Gewebe bei Patienten mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2. ....	48
Diagramm 8: mTOR-Expression im Vergleich zwischen PDAC, chronischer Pankreatitis und serösem Zystadenom. ....	51

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des PDAC. ....	11
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	22
Tabelle 3: Instrumentarien .....	23
Tabelle 4: Chemikalien und Biochemikalien .....	24
Tabelle 5: Puffer und Diluenten .....	24
Tabelle 6: Enzyme und Kits .....	25
Tabelle 7: Assay on Demand .....	25
Tabelle 8: Weitere Reagenzien .....	25
Tabelle 9: Software .....	26
Tabelle 10: Klinische Charakteristika der Patienten, die für die immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzt wurden.....	28
Tabelle 11: Klinische Charakteristika der Patienten, die für die quantitativen PCR-Untersuchungen eingesetzt wurden.....	29



## 10 Abkürzungsverzeichnis

4E-BPs	eukaryontische Initiationsfaktor-4-bindende Proteine
A.	Arterie
A. dest.	destilliertes Wasser
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
ACE	Angiotensin Converting Enzym
AEC	Aminoethylcarbazol
AG	Arbeitsgemeinschaft
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body Mass Index
BSA	Rinderserumalbumin
CCK	Cholezystokinin
cDNA	copy DNA
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie; Threshold Cycle
d. h.	das heißt
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
eIF4E	eukaryontischer Translations-Initiationsfaktor 4E
eIF4G	eukaryontischer Translations-Initiationsfaktor 4G
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie
G	Grad der Differenzierung
ggf.	gegebenenfalls
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	Heat-induced epitope retrieval
HK	Housekeeping-Gen
IDDM	Insulin-dependent Diabetes mellitus
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPMN	Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie

IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
m	Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mg	Milligramm
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
mTORC1/2	Mammalian Target of Rapamycin Complex 1/2
MZN	Muzinös-zystische Neoplasie
<i>n</i>	Anzahl
n	Normalgewebe
NaCl	Kochsalz
ng	Nanogramm
NIDDM	Non-insulin-dependent Diabetes mellitus
nm	Nanometer
NTC	No template control
OD	Optische Dichte
p	pathologisches Gewebe
<i>p</i>	<i>p</i> -Wert
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDAC	Duktales Pankreaskarzinom (pancreatic ductal adenocarcinoma)
PI3K	Phosphoinosid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMM1	Phosphomannomutase 1
PPAR $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute

rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real-Time-PCR
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
S6K1	ribosomale Protein-S6-Kinase $\beta$ -1
Sog.	sogenannte/-r/-s
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TBS	Tris-Puffer
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNM	TNM-Klassifikation (Tumor, Nodus, Metastasen)
TSC1/TSC2	Tuberöse-Sklerose-Komplex
u. a.	unter anderem
u.	und
UdS	Universität des Saarlandes
UICC	Union for international cancer control
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel
ZChL	Zentrales Chemie-Labor
ZG	Zielgen
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

## 11 Danksagung

Mein Dank gebührt all denjenigen, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Dazu gehört zuerst PD Dr. rer. nat. Claudia Rubie, bei der ich mich für die Bereitstellung des Themas und für die ständige Hilfe bei allen aufkommenden Fragen bedanken möchte. Für die Betreuung und Begutachtung meiner Doktorarbeit drücke ich meinen herzlichen Dank aus.

Dem Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß und Kinderchirurgie, Prof. Dr. Matthias Glanemann, danke ich für die Ermöglichung der Anfertigung dieser Arbeit in seiner Klinik sowie dafür, dass er die notwendigen finanziellen Mittel zur Verfügung stellte.

Weiterhin bin ich ausgesprochen dankbar für die Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Mathias Wagner. Neben der Befundung und Hilfestellung in der Auswahl meiner Schnittpräparate gilt den nützlichen Anregungen und der konstruktiven Kritik mein besonderer Dank.

Speziellen Dank möchte ich außerdem an Kathrin Kölsch aussprechen, die mich in die Methodik einarbeitete und mich mit dieser vertraut machte.

Auch den Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Bianca Kruse und Beata Halajda gebührt Dank für die Unterstützung in der Arbeit im Labor.

Außerdem danke ich der benachbarten AG Böhm für die freundliche Genehmigung der Mitbenutzung ihres Slidescanners.

Dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinischer Informatik gilt mein Dank für die Beratung in der statistischen Auswertung.

Abschließend danke ich von ganzem Herzen meiner Familie, die mich mit viel Unterstützung in jeglicher Hinsicht und mit viel Motivation während meines gesamten Studiums begleitete.