

Aus der Chirurgischen Klinik Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Immunhistochemische Untersuchungen zum Stellenwert des Notch-
Signalwegs im Pankreaskopfkarzinom und Cholangiokarzinom**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Francesca Borlak

aus Hannover

Datum der Promotion: 17.09.2021

In großer Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XIII
Zusammenfassung	XVI
Abstract	XVII
1. Einleitung	1
2. Wissenschaftliche Grundlagen	2
2.1 Das Pankreaskarzinom.....	2
2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	2
2.1.2 Pathologie.....	2
2.1.3 Klinik.....	3
2.1.4 Klassifikation.....	3
2.1.5 Diagnostik.....	4
2.1.6 Therapie.....	5
2.2 Das Cholangiokarzinom.....	7
2.2.1 Das intrahepatische Cholangiokarzinom.....	7
2.2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	7
2.2.1.2 Pathologie.....	7
2.2.1.3 Klinik.....	7
2.2.1.4 Klassifikation.....	8
2.2.1.5 Diagnostik.....	8
2.2.1.6 Therapie.....	9
2.2.2 Der Klatskin-Tumor.....	9
2.2.2.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	9
2.2.2.2 Klinik.....	9
2.2.2.3 Pathologie.....	10
2.2.2.4 Klassifikation.....	10
2.2.2.5 Diagnostik.....	11
2.2.2.6 Therapie.....	11
2.2.3 Das distale Cholangiokarzinom.....	12
2.2.3.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	12

2.2.3.2	Klinik	12
2.2.3.3	Pathologie	12
2.2.3.4	Klassifikation	13
2.2.3.5	Diagnostik.....	13
2.2.3.6	Therapie	14
2.3	Vergleich der Tumorentitäten	14
2.4	Der Notch-Signalweg.....	14
2.4.1	Notch1 und Notch4.....	17
2.4.2	ADAM17	18
2.4.3	Musashi (MSI)	19
2.4.4	HES1	19
2.4.5	CD44	20
3.	Material und Methoden.....	21
3.1	Material	21
3.1.1	Patientenkollektiv	21
3.1.2	Puffer.....	21
3.1.3	Antikörper	22
3.2	Methoden.....	22
3.2.1	Anfertigung der Kryoschnitte	22
3.2.3	Fotografieren des Gewebes.....	25
3.2.4	Immunhistochemische Auswertung mit ImageJ.....	25
3.2.5	Klinische Datenerhebung.....	27
3.2.6	Statistische Auswertung.....	28
4.	Ergebnisse.....	29
4.1	Vergleich des Notch-Signalweges im Tumor- und Normalgewebe.....	29
4.2	Vergleich der klinischen Parameter und der Antigen-Expressionen in den drei Tumorentitäten	36
4.2.1	Vergleich der klinischen Parameter in den drei Tumorentitäten	38
4.2.1.1	Vergleich der T-Stadien in den Tumorentitäten	38
4.2.1.2	Vergleich der Lymphangiosis carcinomatosa in den Tumorentitäten.....	40
4.2.2	Vergleich der Antigen-Expressionen in den drei Tumorentitäten	41
4.2.2.1	Vergleich der HES1 Expression in den Tumorentitäten.....	41
4.2.2.2	Vergleich der Notch4 Expression in den Tumorentitäten	43

4.2.2.3	Übersicht der Differenzen der Antigen-Expressionen im Tumor- und Normalgewebe	44
4.3	Korrelation klinischer Daten und Antigen-Expressionen mit dem Patientenüberleben	45
4.3.1	Korrelation klinischer Daten mit dem Patientenüberleben	46
4.3.1.1	Korrelation UICC-Stadium mit dem Patientenüberleben	47
4.3.1.1.1	Korrelation UICC-Stadium mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend	47
4.3.1.1.2	Korrelation UICC-Stadium mit dem Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome	50
4.3.1.1.3	Korrelation UICC-Stadium mit dem Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome	52
4.3.1.1.4	Korrelation UICC-Stadium mit dem Patientenüberleben für Pankreaskarzinome	54
4.3.1.2	Korrelation Grading mit dem Patientenüberleben	56
4.3.1.2.1	Korrelation Grading mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend	56
4.3.1.2.2	Korrelation Grading mit dem Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome	58
4.3.1.2.3	Korrelation Grading mit dem Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome	60
4.3.1.2.4	Korrelation Grading mit dem Patientenüberleben für Pankreaskarzinome	62
4.3.1.3	Korrelation Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben	64
4.3.1.3.1	Korrelation Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend	64
4.3.1.3.2	Korrelation Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome	66
4.3.1.3.3	Korrelation Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome	68
4.3.1.3.4	Korrelation Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben für Pankreaskarzinome	70

4.3.2	Korrelation der Antigen-Expressionen mit dem Patientenüberleben	71
4.3.2.1	Korrelation ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben	72
4.3.2.1.1	Korrelation ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend	72
4.3.2.1.2	Korrelation ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome	74
4.3.2.1.3	Korrelation ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome	76
4.3.2.1.4	Korrelation ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben für Pankreaskarzinome	78
4.3.2.2	Korrelation Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben	80
4.3.2.2.1	Korrelation Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend	80
4.3.2.2.2	Korrelation Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome	82
4.3.2.2.3	Korrelation Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome	84
4.3.2.2.4	Korrelation Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben für Pankreaskarzinome	86
4.3.2.3	Korrelation Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben	88
4.3.2.3.1	Korrelation Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend	88
4.3.2.3.2	Korrelation Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome	90
4.3.2.3.3	Korrelation Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome	92
4.3.2.3.4	Korrelation Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben für Pankreaskarzinome	94

5. Diskussion	97
5.1 Diskussion zu Material und Methode.....	97
5.1.1 Diskussion zu Material	97
5.1.2 Diskussion zu Methode.....	97
5.2 Diskussion zur Rolle des Notch-Signalweges in Cholangio- und Pankreaskopfkarzinomen	98
6. Schlussfolgerung und Fazit	109
Literaturverzeichnis	112
Eidesstattliche Versicherung	124
Lebenslauf	125
Danksagung	126

Abkürzungsverzeichnis

µm: Mikrometer

5-FU: 5-Fluoruracil

A: Arterie

ADAM: A Disintegrin And Metalloprotease

AP: Alkalische Phosphatase

Aqua dest.: Aqua destillata

CA 19-9: Carbohydrate-Antigen 19-9

CCL: Chemokine ligand

CD: Cluster of differentiation

CEA: Carcinoembryonales Antigen

CK: Zytokeratin

CT: Computertomographie

DAB: 3,3'-Diaminobenzidine

DPCA: Ductal pancreatic cancer antigen

eCC: Extrahepatisches Cholangiokarzinom

eCG: Extrahepatisches Cholangiogewebe

EGF: Epidermal Growth Factor

ERCP: Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie

G: Grading

g: Gramm

GTDS: Gießener Tumordokumentationssystem

HCL: Chlorwasserstoff

HES1: Hairy and enhancer of split-1

HRP: Horseradish Peroxidase

iCC: Intrahepatisches Cholangiokarzinom

iCG: Intrahepatisches Cholangiogewebe

IL: Interleukin

kD: Kilodalton

Kum: Kumulativ

L: Liter
LC: Lymphangiosis carcinomatosa
Lig.: Ligamentum
LSAB: Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode
M: Fernmetastasen
ml: Milliliter
MRCP: Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT: Magnetresonanztomographie
MSI: Musashi
MUC: Muzin
n: Anzahl der Proben
N: Lymphknotenbefall
NaCl: Natriumchlorid
NF-YA: Nuclear Transcription Factor Y Subunit Alpha
NID: Notch intrazelluläre Domäne
PDAC: Pankreaskarzinom
PG: Pankreasgewebe
pG: pathologisches Grading
pM: pathologische Fernmetastasen
pN: pathologischer Lymphknotenbefall
pT: pathologische Tumorausdehnung
SAP: Systeme, Anwendungen und Produkte in der Datenverarbeitung
Std.-Abweichung: Standard-Abweichung
T: Tumor(-ausdehnung)
TACE: Tumor-necrosis-factor- α converting enzyme
TBST: Tris-buffered saline with Tween20
TGF: Tumor growth factor
TNF: Tumor necrosis factor
Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UICC: Union internationale contre le cancer
V: Vene

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

γ -GT: Gamma-Glutamyl-Transferase

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für das Pankreaskarzinom.....	4
Tabelle 2: UICC- Klassifikation für das Pankreaskarzinom.....	4
Tabelle 3: TNM-Klassifikation für das intrahepatische Cholangiokarzinom	8
Tabelle 4: UICC-Klassifikation für das intrahepatische Cholangiokarzinom	8
Tabelle 5: Klassifikation des Klatskin-Tumors nach Bismuth-Corlette	10
Tabelle 6: TNM-Klassifikation für den Klatskin-Tumor	10
Tabelle 7: UICC-Klassifikation für den Klatskin-Tumor	11
Tabelle 8: TNM-Klassifikation für das distal extrahepatische Cholangiokarzinom.....	13
Tabelle 9: UICC-Klassifikation für das distal extrahepatische Cholangiokarzinom	13
Tabelle 10: Primärantikörper	22
Tabelle 11: Kontrollgewebe für Primärantikörper	22
Tabelle 12: Sekundärantikörper	22
Tabelle 13: Vergleich der Mittelwerte der IHC-Scores im Tumor- und Normalgewebe	34
Tabelle 14: Signifikanz der Unterschiede der IHC-Scores im Normal- und Tumorgewebe	35
Tabelle 15: Übersicht über klinische Parameter und statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den drei Tumorentitäten.....	37
Tabelle 16: Kruskal-Wallis-Test der Tumorausdehnungen in den drei Tumorentitäten	39
Tabelle 17: Kruskal-Wallis-Test der Lymphangiosis carcinomatosa in den drei Tumorentitäten.....	40
Tabelle 18: Kruskal-Wallis-Test der Differenzgruppen der IHC-Scores von HES1 in Tumor- zu Normalgewebe in den drei Tumorentitäten	42
Tabelle 19: Kruskal-Wallis-Test der Differenzgruppen der IHC-Scores von Notch4 in Tumor- zu Normalgewebe in den drei Tumorentitäten	43
Tabelle 20: Übersicht über Differenzgruppen der IHC-Scores zwischen Tumor- und Normalgewebe und statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den drei Tumorentitäten.....	44
Tabelle 21: Übersicht über die statistische Signifikanz der Kaplan-Meier-Kurven der klinischen Parameter und Antigen-Expressionen tumorentitätenübergreifend	45
Tabelle 22: Übersicht über die statistische Signifikanz der Kaplan-Meier-Kurven der klinischen Parameter und Antigen-Expressionen für eCC, iCC und PDAC.....	46

Tabelle 23: Daten für die tumorentitätenübergreifende Korrelation der UICC-Stadien mit dem Patientenüberleben.....	48
Tabelle 24: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von UICC-Stadium und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend.....	48
Tabelle 25: Daten für die Korrelation der UICC-Stadien mit dem Patientenüberleben für eCC.....	50
Tabelle 26: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von UICC-Stadium und Patientenüberleben für eCC.....	50
Tabelle 27: Daten für die Korrelation der UICC-Stadien mit dem Patientenüberleben für iCC ...	52
Tabelle 28: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von UICC-Stadium und Patientenüberleben für iCC.....	52
Tabelle 29: Daten für die Korrelation der UICC-Stadien mit dem Patientenüberleben für PDAC.....	54
Tabelle 30: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von UICC-Stadium und Patientenüberleben für PDAC.....	54
Tabelle 31: Daten für die tumorentitätenübergreifende Korrelation des Gradings mit dem Patientenüberleben.....	56
Tabelle 32: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Grading und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend.....	56
Tabelle 33: Daten für die Korrelation des Gradings mit dem Patientenüberleben für eCC.....	58
Tabelle 34: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Grading und Patientenüberleben für eCC.....	58
Tabelle 35: Daten für die Korrelation des Gradings mit dem Patientenüberleben für iCC.....	60
Tabelle 36: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Grading und Patientenüberleben für iCC.....	60
Tabelle 37: Daten für die Korrelation des Gradings mit dem Patientenüberleben für PDAC.....	62
Tabelle 38: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Grading und Patientenüberleben für PDAC.....	62
Tabelle 39: Daten für die tumorentitätenübergreifende Korrelation der Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben.....	64
Tabelle 40: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Tumorausdehnung und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend.....	64
Tabelle 41: Daten für die Korrelation der Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben für eCC.....	66

Tabelle 42: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Tumorausdehnung und Patientenüberleben für eCC.....	66
Tabelle 43: Daten für die Korrelation der Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben für iCC.....	68
Tabelle 44: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Tumorausdehnung und Patientenüberleben für iCC.....	68
Tabelle 45: Daten für die Korrelation der Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben für PDAC.....	70
Tabelle 46: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Tumorausdehnung und Patientenüberleben für PDAC	70
Tabelle 47: Daten für die Korrelation der ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend.....	72
Tabelle 48: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von ADAM17 Expression und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend.....	72
Tabelle 49: Daten für die Korrelation der ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben für eCC.....	74
Tabelle 50: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von ADAM17 Expression und Patientenüberleben für eCC.....	74
Tabelle 51: Daten für die Korrelation der ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben für iCC	76
Tabelle 52: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von ADAM17 Expression und Patientenüberleben für iCC.....	76
Tabelle 53: Daten für die Korrelation der ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben für PDAC.....	78
Tabelle 54: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von ADAM17 Expression und Patientenüberleben für PDAC	78
Tabelle 55: Daten für die Korrelation der Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend.....	80
Tabelle 56: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch1 Expression und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend.....	80
Tabelle 57: Daten für die Korrelation der Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben für eCC	82
Tabelle 58: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch1 Expression und Patientenüberleben für eCC.....	82

Tabelle 59: Daten für die Korrelation der Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben für iCC.....	84
Tabelle 60: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch1 Expression und Patientenüberleben für iCC.....	84
Tabelle 61: Daten für die Korrelation der Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben für PDAC.....	86
Tabelle 62: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch1 Expression und Patientenüberleben für PDAC	86
Tabelle 63: Daten für die Korrelation der Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend.....	88
Tabelle 64: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch4 Expression und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend.....	88
Tabelle 65: Daten für die Korrelation der Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben für eCC	90
Tabelle 66: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch4 Expression und Patientenüberleben für eCC.....	90
Tabelle 67: Daten für die Korrelation der Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben für iCC.....	92
Tabelle 68: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch4 Expression und Patientenüberleben für iCC.....	92
Tabelle 69: Daten für die Korrelation der Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben für PDAC.....	94
Tabelle 70: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch4 Expression und Patientenüberleben für PDAC	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Notch-Signalweg.....	15
Abbildung 2: Referenzbilder für den Intensitäts-Score.....	27
Abbildung 3: Verteilung der IHC-Scores im Normalgewebe.....	29
Abbildung 4: Verteilung der IHC-Scores im Tumorgewebe	30
Abbildung 5: ADAM17-Färbung der Zellmembranen und des Zytoplasmas extrahepatischer Gallengänge im Normalgewebe (200x Vergrößerung)	31
Abbildung 6: ADAM17-Färbung der Zellmembranen und des Zytoplasmas im extrahepatischen Cholangiokarzinom (200x Vergrößerung).....	31
Abbildung 7: CD44-Färbung der Zellmembranen und des Zytoplasmas extrahepatischer Gallengänge im Normalgewebe (200x Vergrößerung)	31
Abbildung 8: CD44-Färbung der Zellmembranen und des Zytoplasmas im extrahepatischen Cholangiokarzinom (200x Vergrößerung)	31
Abbildung 9: HES1-Färbung der Zellkerne und des Zytoplasmas intrahepatischer Gallengänge im Normalgewebe (200x Vergrößerung)	32
Abbildung 10: HES1-Färbung der Zellkerne und des Zytoplasmas im intrahepatischen Cholangiokarzinom (200x Vergrößerung)	32
Abbildung 11: MSI-Färbung der Zellkerne und des Zytoplasmas intrahepatischer Gallengänge im Normalgewebe (200x Vergrößerung)	32
Abbildung 12: MSI-Färbung der Zellkerne und des Zytoplasmas im intrahepatischen Cholangiokarzinom (200x Vergrößerung)	32
Abbildung 13: Notch1-Färbung des Zytoplasmas des Pankreaskopfes im Normalgewebe (200x Vergrößerung)	33
Abbildung 14: Notch1-Färbung des Zytoplasmas im Pankreaskopfkarzinom (200x Vergrößerung).....	33
Abbildung 15: Notch4-Färbung des Zytoplasmas des Pankreaskopfes im Normalgewebe (hier keine Färbung erkennbar) (200x Vergrößerung)	33
Abbildung 16: Notch4-Färbung des Zytoplasmas im Pankreaskopfkarzinom (200x Vergrößerung).....	33
Abbildung 17: T-Stadien in den Tumorentitäten	38
Abbildung 18: Lymphangiosis carcinomatosa in den Tumorentitäten	40
Abbildung 19: Differenz der IHC-Scores zwischen Tumor und Normalgewebe für das Antigen HES1	42

Abbildung 20: Differenz der IHC-Scores zwischen Tumor und Normalgewebe für das Antigen Notch4.....	43
Abbildung 21: Tumorentitätenübergreifende Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben.....	49
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben für Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom (eCC)	51
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben für Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom (iCC).....	53
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben für Patienten mit Pankreaskarzinom (PDAC).....	55
Abbildung 25: Tumorentitätenübergreifende Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Grading (pG) und Patientenüberleben	57
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Grading (pG) und Patientenüberleben für Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom (eCC)	59
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Grading (pG) und Patientenüberleben für Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom (iCC).....	61
Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Grading (pG) und Patientenüberleben für Patienten mit Pankreaskarzinom (PDAC).....	63
Abbildung 29: Tumorentitätenübergreifende Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Tumorausdehnung (pT) und Patientenüberleben.....	65
Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Tumorausdehnung (pT) und Patientenüberleben für Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom (eCC)	67
Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Tumorausdehnung (pT) und Patientenüberleben für Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom (iCC).....	69
Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Tumorausdehnung (pT) und Patientenüberleben für Patienten mit Pankreaskarzinom (PDAC).....	71
Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen ADAM17 Expression und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend.....	73
Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen ADAM17 Expression und Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome (eCC).....	75
Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen ADAM17 Expression und Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome (iCC)	77
Abbildung 36: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen ADAM17 Expression und Patientenüberleben für Pankreaskarzinome (PDAC)	79

Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch1 Expression und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend	81
Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch1 Expression und Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome (eCC)	83
Abbildung 39: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch1 Expression und Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome (iCC)	85
Abbildung 40: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch1 Expression und Patientenüberleben für Pankreaskarzinome (PDAC)	87
Abbildung 41: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch4 Expression und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend	89
Abbildung 42: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch4 Expression und Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome (eCC)	91
Abbildung 43: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch4 Expression und Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome (iCC)	93
Abbildung 44: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch4 Expression und Patientenüberleben für Pankreaskarzinome (PDAC)	95

Zusammenfassung

Einleitung: Der Notch-Signalweg spielt in vielen zellulären Prozessen des Körpers eine zentrale Rolle, ebenso in der Kanzerogenese diverser Tumorentitäten. Dies gilt auch für intra- und extrahepatische Cholangiokarzinome sowie Pankreaskarzinome, hier wird aufgrund einer Vielzahl an Ähnlichkeiten eine pankreatikobiliäre Superfamilie postuliert. Es wurde in dieser wissenschaftlichen Arbeit die Expression zentraler Proteine des Notch-Signalweges im Tumor- und Normalgewebe und dessen Einfluss auf das Patientenüberleben untersucht.

Methodik: Das Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 60 Patienten mit Pankreaskopf- (n=14), extrahepatischen (n=22) und intrahepatischen (n=24) Cholangiokarzinomen. Es ist sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe die immunhistochemische Analyse von Signalproteinen des Notch-Signalwegs (Notch1, Notch4, ADAM17, MSI, HES1, CD44) erfolgt und die statistische Signifikanz berechnet worden. Zudem erfolgten ein Vergleich wichtiger klinischer Parameter (Geschlecht, Alter bei Diagnose, Überlebenstage, Vorliegen anderer Malignitäten, UICC-Stadien, TNM-Klassifikation, pathologisches Grading und Vorliegen von Lymphangiosis carcinomatosa) sowie der Antigen-Expressionslevel zwischen den drei Gewebearten. Anschließend wurden sowohl die klinischen Parameter als auch die Antigen-Expressionslevel mit dem Patientenüberleben in Form von Kaplan-Meier-Kurven korreliert.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass im Tumorgewebe mehr Signalproteine des Notch-Signalweges im Vergleich zum Normalgewebe exprimiert werden, jedoch nicht immer statistisch signifikant. Für extrahepatische Cholangiokarzinome ist die Expression von CD44 ($p = 0,043$), für intrahepatische Cholangiokarzinome die Expression von CD44 ($p = 0,026$) und Notch1 ($p < 0,001$) und für Pankreaskarzinome die Expression von ADAM17 ($p = 0,008$), CD44 ($p = 0,012$), HES1 ($p = 0,012$), Notch1 ($p = 0,012$) und Notch4 ($p = 0,008$) im Tumorgewebe signifikant höher. Beim Vergleich der klinischen Parameter sowie der Antigen-Expressionslevel zeigten sich für einige Variablen statistisch signifikante Unterschiede. Eine Korrelation der klinischen Parameter mit dem Patientenüberleben ergab ebenfalls für einige der o.g. Variablen einen statistisch signifikanten Zusammenhang. Es konnte jedoch keine statistisch signifikante Korrelation der Antigen-Expressionslevel des Notch-Signalweges im Tumor- verglichen mit dem Normalgewebe und dem Patientenüberleben festgestellt werden.

Schlussfolgerung: Für einige Signalproteine des Notch-Signalwegs lässt sich eine signifikante Überexpression im Tumor- verglichen mit dem Normalgewebe nachweisen, jedoch ohne signifikanten Einfluss auf das Patientenüberleben. Die Fragestellung sollte daher in einem größeren Patientenkollektiv untersucht werden, um die statistische Aussagekraft zu erhöhen. Dies könnte als Grundlage für neue therapeutische Ansätze in der Entwicklung von Notch-Inhibitoren dienen.

Abstract

Introduction: The Notch signaling pathway plays a central role in various cellular processes in the body, as well as in the carcinogenesis of several tumor entities such as intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinomas as well as pancreatic carcinomas, which are postulated to be part of a pancreaticobiliary superfamily due to a variety of similarities. In this scientific work, the expression of central proteins of the Notch signaling pathway in normal and malignant tissue and its influence on patient survival was examined.

Methods: The patient collective consisted of a total of 60 patients with pancreatic head (n=14), extrahepatic (n=22) and intrahepatic (n=24) cholangiocarcinomas. Immunohistochemical analysis of signaling proteins of the Notch signaling pathway (Notch1, Notch4, ADAM17, MSI, HES1, CD44) has been performed in both normal and malignant tissue with regards to the statistical significance. In addition, an analysis and comparison of important clinical parameters (gender, age at diagnosis, survival days, presence of other malignancies, UICC stages, TNM classification, pathological grading and presence of lymphangiosis carcinomatosa) as well as the antigen expression levels took place. Subsequently, both clinical parameters and antigen expression levels were correlated with patient survival

Results: A higher expression of signal proteins of the Notch pathway in malignant tissue compared to normal tissue was found, but not always statistically significant. For extrahepatic cholangiocarcinomas, the expression of CD44 ($p=0.043$), for intrahepatic cholangiocarcinomas CD44 ($p=0.026$) and Notch1 ($p<0.001$) and for pancreatic carcinomas ADAM17 ($p=0.008$), CD44 ($p=0.012$), HES1 ($p=0.012$), Notch1 ($p=0.012$) and Notch4 ($p=0.008$) were significantly higher in malignant tissue. When comparing clinical parameters and levels of antigen expression, there were statistically significant differences for some variables. The correlation of some clinical parameters with patient survival also showed a statistically significant relationship. However, there was no statistically significant correlation between expression levels of signal proteins of the Notch signaling pathway in tumor tissue compared to normal tissue and patient survival.

Conclusion: In this scientific work, a significant overexpression of signaling proteins of the Notch signaling pathway can be found in malignant tissue compared to normal tissue without, however, having a significant influence on patient survival. Therefore, this scientific work should be examined in a larger group of patients to increase the statistical power. This could lay basis for new therapeutic approaches such as the development of Notch signaling inhibitors.

1. Einleitung

Krebserkrankungen zählen zu den zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2018). In den letzten 50 Jahren hat sich die Anzahl von Krebs-Neuerkrankungen beinahe verdoppelt, wobei die krebsassoziierte Mortalität stetig sinkt. Krebs ist eine Volkskrankheit, die in Zukunft aufgrund des demographischen Wandels immer mehr Menschen betreffen wird (Robert Koch Institut, 2016). Ziel der medizinischen Forschung ist es daher, maligne Erkrankungen besser zu verstehen und so geeignetere Therapieformen zu entwickeln.

Sowohl die Gallengangs- (Yao et al., 2016) als auch die Bauchspeicheldrüsenkarzinome (Lucas et al., 2016) stellen Tumorentitäten mit einer sehr hohen Sterblichkeit dar. Welche molekularen Mechanismen genau hinter der Aggressivität dieser Tumore stecken, ist noch Gegenstand der Forschung.

Die drei in dieser Arbeit verglichenen Tumorentitäten, extra- und intrahepatisches Cholangio- und Pankreaskarzinom, gehören dabei zur Gruppe der gastrointestinalen Tumore, einer sehr heterogenen Gruppe mit unterschiedlicher Häufigkeit und karzinomspezifischer Mortalität.

Die WHO unterteilt diese Entitäten in intrahepatische Gallengangstumore, Tumore der Gallenblase und des extrahepatischen Gallengangsystems und Tumore des exokrinen Pankreas. Wie Schmuck et al. (2016) zeigen, bestehen zwischen den Tumorentitäten jedoch eine Vielzahl an Ähnlichkeiten, beispielsweise bezogen auf den Phänotyp und der embryologischen Entstehung der Organe. Im Sinne einer Superfamilie unter dem Begriff eines pankreatobiliären Systems könne man diese Tumorgruppen zusammenfassen.

Im Fokus der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit steht der Notch-Signalweg. Dieser Signalweg ist weit verbreitet und spielt sowohl in der embryologischen Entwicklung der meisten Vielzeller eine Rolle als auch im Erhalt und in der Erneuerung adulten Gewebes (Sato et al., 2012). Zudem gehört der Notch-Signalweg, u.a. neben dem Wnt- und Hedgehog-Signalweg, zu den Hauptsignaltransduktionen, die zur Kanzerogenese beitragen (Müller-Esterl, 2018).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der Notch-Signalweg in der Tumorentstehung dieser drei Tumorgruppen eine Rolle spielt. Hierzu wurden sowohl Tumor- als auch Normalgewebeproben eines Patientenkollektivs bestehend aus den oben genannten drei Tumorgruppen immunhistochemisch analysiert. Anschließend erfolgte eine klinische Datenauswertung der Patienten, die sich vor allem auf das Patientenüberleben fokussierte. Mittels geeigneter statistischer Testverfahren wurde nun im Kern der Zusammenhang zwischen der Expression einzelner Signalproteine des Notch-Signalwegs und dem klinischen Verlauf der Patienten analysiert und zwischen den drei Tumorgruppen verglichen.

2. Wissenschaftliche Grundlagen

2.1 Das Pankreaskarzinom

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms ist weltweit steigend. Nach aktuellen Studien ist die Inzidenz in den USA von ca. 12/100.000 im Jahre 2000 auf ca. 15/100.000 Einwohner im Jahre 2014 angestiegen (Wu et al., 2018). Dabei sind Männer etwas häufiger betroffen (Rate Männer: Frauen 1,2-1,5:1) (Chari, 2007). Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr (Illic und Illic, 2016). Bekannte Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom lassen sich grob in demographische, genetische und Umweltfaktoren unterteilen. Zu den demographischen Risikofaktoren gehören vor allem hohes Alter, das männliche Geschlecht sowie eine afroamerikanische Herkunft (Büchler et al., 2004). Zu den genetischen Risikofaktoren gehören u.a. hereditär bedingte Pankreatitiden. Als krankheitsauslösende Umweltfaktoren zählen vor allem Nikotin- und Alkoholabusus sowie z.B. die Exposition gegenüber anderen Karzinogenen wie Nitrosaminen oder Pestiziden (Sedlacek, 2013). Dennoch ist die genaue Ursache der Entstehung noch ungeklärt. Bekannt sind bisher auf molekularer Ebene die Aktivierung des Onkogens K-ras sowie die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p53, p16 und DPCA als wichtige Bestandteile der Kanzerogenese (Karges und Al Dahouk, 2011).

In der Krebsmortalitätsstatistik befindet sich das Bauchspeicheldrüsenkarzinom für beide Geschlechter an siebter Stelle (Illic und Illic, 2016). Es ist ein sehr aggressiver Tumor, das 5 Jahres- Überleben beträgt weniger als 5% (Li et al., 2017).

2.1.2 Pathologie

Der Großteil der Pankreastumore sind duktal differenzierte Adenokarzinome, auch als exokrine Pankreaskarzinome bezeichnet (Schubert, 2016). Endokrine Pankreastumore unterschiedlicher Dignität sind seltener (Böhm, 2013). Weitere histologische Subtypen sind z.B. die muzinösen Adeno-, Siegelring- sowie die anaplastischen und adenosquamösen Karzinome (Werner und Büchler, 2010). 70-80% der Tumore sind dabei im Pankreaskopf lokalisiert, der Rest befindet sich im Körper und im Schwanz des Pankreas (Krams et al., 2013).

Makroskopisch zeigt sich das duktale Pankreaskarzinom verhärtet, unscharf begrenzt und mit weißlicher Schnittfläche. Mikroskopisch lassen sich stark proliferierende, drüsig angeordnete und abnormale Gangepithelien erkennen. Typisch sind zudem eine Muzinproduktion, eine Infiltration des normalen Pankreasgewebes und der Perineuralscheiden sowie eine desmoplastische und lymphoplasmazelluläre Begleitreaktion (Krams et al., 2013).

2.1.3 Klinik

Generell treten erst spät karzinombedingte Symptome auf. Dies trägt zur schlechten Prognose bei, da bei der Diagnosestellung der Tumor in der Regel schon weit fortgeschritten ist. Typisch sind unspezifische Symptome wie Gewichtsverlust, Schwäche und Appetitlosigkeit. Weiterhin möglich sind neu auftretende unspezifische Rücken- oder Oberbauchschmerzen sowie vor allem beim Pankreaskopfkarzinom ein oftmals schmerzloser Ikterus (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2018). Klinisch kann dann das Courvoisier-Zeichen imponieren, das ggf. auch beim Cholangiokarzinom auftritt (Piper, 2013). Dieses klinische Zeichen beschreibt eine prallelastische und schmerzlose Gallenblase sowie einen durch den Verschluss des Ductus choledochus (bzw. Papilla vateri) bedingten Ikterus (Füeßl und Middeke, 2010). Weitere Symptome können rezidivierende Thrombophlebitiden (Huhnstock et al., 2013) sowie Thrombosen, beispielsweise eine Milzvenenthrombose, sein (Woolliscroft, 2013). Nicht nur histologisch sondern auch klinisch kann das Pankreaskarzinom einer chronischen Pankreatitis ähneln und schwierig davon zu differenzieren sein (Krams et al., 2013).

2.1.4 Klassifikation

Der Großteil der Proben des Kollektivs der wissenschaftlichen Arbeit wurde nach der 6. und 7. Auflage der TNM- und UICC-Klassifikation klassifiziert. Daher wird die 7. Auflage für die einzelnen Tumore exemplarisch dargestellt. Inzwischen wurde die 8. Auflage der TNM und UICC-Klassifikation (Brierley et al., 2017) veröffentlicht. Da keiner der Patienten danach beurteilt wurde, wird sie nicht gesondert betrachtet.

Die TNM-Klassifikation dient der Stadieneinteilung bösartiger Tumore. Das T steht für die Ausdehnung des Primärtumors, das N für das Fehlen bzw. Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und das M für das Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen. Tabelle 1 zeigt die 7. TNM-Klassifikation für das Pankreaskarzinom.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für das Pankreaskarzinom (Manser, 2013)

TNM	Ausdehnung
T0	Kein Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Auf Pankreas begrenzt: Größte Ausdehnung ≤ 2 cm
T2	Auf Pankreas begrenzt: Größte Ausdehnung ≥ 2 cm
T3	Ausbreitung jenseits Pankreas, jedoch ohne Infiltration Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior
T4	Infiltration Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Eine Ergänzung der TNM- Klassifikation ist die Stadieneinteilung nach UICC. Diese fasst die TNM-Klassifikation zu insgesamt vier Gruppen zusammen. Bei diesem so genannten Staging kann leichter eine Aussage über die Prognose sowie therapeutische Konsequenzen getroffen werden. Je höher das Stadium, desto schlechter die Überlebenschancen. Tabelle 2 zeigt die 7. Auflage der UICC-Klassifikation für das Pankreaskarzinom.

Tabelle 2: UICC-Klassifikation für das Pankreaskarzinom (Manser, 2013)

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

2.1.5 Diagnostik

Im Mittelpunkt der Diagnostik steht die Bildgebung. In der Regel erfolgt zunächst eine Abdomensonographie mittels welcher bei guten Schallbedingungen und ausreichender Größe des Tumors das Pankreaskarzinom detektiert und seine Ausmaße orientierend bestimmt werden können (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Auch das Vorhandensein von hepatischen Metastasen, die am häufigsten auftretenden Metastasen beim Pankreaskarzinom, kann so untersucht werden. Wegweisend beim Pankreaskopfkarzinom ist dabei das sogenannte Double-duct-sign, eine sonographisch, in der ERCP oder MRCP sichtbare Dilatation sowohl des Ductus pancreaticus als auch des Ductus choledochus infolge eines gestörten Sekretabflusses durch den Tumor (Sprouse et al., 2015). Weitere diagnostische Untersuchungsmöglichkeiten neben der

Oberbauchsonographie sind die Endosonographie, die Multidetektor-CT sowie die MRT kombiniert mit der MRCP. Die ERCP eignet sich alleine nicht zur Tumordiagnostik, da sie nur Gangveränderungen und nicht eine Raumforderung direkt nachweist (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Endosonographisch stehen zum einen mechanische Radialscanner und zum anderen elektronische Geräte ohne klare diagnostische Überlegenheit einer der Varianten zur Verfügung. Bei der Multidetektor-CT sollte mit einer Schichtdicke ≤ 3 mm sowie einer biphasischen Kontrastmittelgabe gearbeitet werden (parenchym- und portalvenöse Phase). Die MRT/MRCP sollte mit einer Feldstärke von 1,5 Tesla sowie Standardwichtungen (T1 und T2) durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). In der aktuellen S3-Leitlinie wird darauf hingewiesen, dass es keinen klar definierten Algorithmus zur Diagnostik bei Verdacht auf Pankreaskarzinom gibt. Es sollten jene diagnostische Modalitäten durchgeführt werden, mit denen die größte Expertise in der jeweiligen medizinischen Einrichtung herrscht. Ein wesentliches Ziel der Diagnostik ist es hierbei, die Möglichkeit einer operativen Resektabilität zu eruieren.

Die Diagnostik maligner Erkrankungen beinhaltet oft die Bestimmung von Tumormarkern. Im Falle des Pankreaskarzinoms können das Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA 19-9) sowie das carcinoembryonale Antigen (CEA) bestimmt werden. Tumormarker sind jedoch nicht spezifisch und können auch bei anderen Erkrankungen wie Entzündungen erhöht sein, auf das Pankreas bezogen beispielsweise bei einer akuten Pankreatitis (Balletshofer et al., 2009). Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei Pankreaskarzinomen, deren Tumorgröße weniger als 3 cm beträgt, nur noch bei 50% der Erkrankten eine Erhöhung des Tumormarkers CA 19-9 nachweisbar ist (Manser et al., 2013). Daher empfiehlt sich die Bestimmung der Marker nicht in der Primärdiagnostik, sondern als Verlaufskontrolle beispielsweise nach operativer Resektion des Tumors.

Bei unklarer Diagnostik muss ggf. eine diagnostische Laparoskopie durchgeführt werden. Diese hat zum einen den Vorteil, der bildgebenden Diagnostik entfallende Befunde intraoperativ darzustellen, ggf. minimal-invasiv Probiopsien zu entnehmen (Carus, 2010) und zum anderen direkt ein intraabdominelles Staging bei Tumorerkrankungen durchzuführen, besonders bei klinischem Verdacht auf Peritonealkarzinose oder ausgeprägter Ascites (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Nach Durchführung der Diagnostik folgt das Staging gemäß UICC mit prognostischer und therapeutischer Relevanz.

2.1.6 Therapie

Unterschieden werden kann generell zwischen einer kurativen und einer palliativen Therapie. Die einzig kurative Therapie beim Pankreaskarzinom ist die komplette Resektion (R0-Resektion) des Tumors. Dennoch ist bei einem Großteil der Patienten eine Resektion aufgrund des lokal fortgeschrittenen Befunds bzw. der Fernmetastasierung nicht mehr möglich. Bei Inoperabilität

des Tumors leben die Patienten noch durchschnittlich 9-32 Monate, im Falle einer Fernmetastasierung oftmals nur noch wenige Monate (Taieb et al., 2017). Neben der totalen Duodenopankreatektomie gibt es die Pankreatikoduodenektomie, die im Gegensatz zur klassischen Variante nach Whipple auch pyloruserhaltend nach Traverso- Longmire durchgeführt werden kann. Aktuelle Metaanalysen konnten keinen klaren Vorteil einer pyloruserhaltenden Pankreatikoduodenektomie vs. der klassischen Whipple-Op zeigen (Bolm et al., 2018). Bei kurativer Intention (nach R0-Resektion) im UICC Stadium II-III sollte eine adjuvante Chemotherapie über 6 Monate innerhalb von 6 Wochen nach der OP mit Gemcitabin oder 5-FU/Folinsäure durchgeführt werden. Es gibt neuere Studien, die beispielsweise einen besseren Effekt von FOLFIRINOX (Leukovorin, 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin) vs. Gemcitabin auf das Langzeitüberleben zeigen, jedoch mit einer höheren Rate an Nebenwirkungen (Chin et al., 2018). Es gibt noch keine klaren Empfehlungen, welches Chemotherapie-Regime ausgewählt werden soll. Außerhalb von randomisierten, kontrollierten klinischen Studien sollte bei R0-resezierten Patienten keine adjuvante Radiochemotherapie erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen und inoperablen Tumoren kann eine Radiochemotherapie durchgeführt werden. Neuere Studien belegen den zusätzlichen Nutzen einer Radiotherapie zur Chemotherapie für das Gesamtüberleben bei lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen (Zhong et al., 2018).

Erweist sich der Tumor als inoperabel, liegt eine Palliativsituation vor. Zum einen können die Patienten aufgrund der lokalen Ausdehnung des Karzinoms mit Infiltration in umliegendes Gewebe inoperabel sein, zum anderen können sie bei Diagnosestellung bereits fernmetastasiert sein, sich also im UICC Stadium IV befinden. Unabhängig von der Ursache der Inoperabilität, sollte standardmäßig eine Gemcitabin-Monotherapie durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Alternativ kann auch eine Kombination von Gemcitabin mit einem EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor wie Erlotinib oder dem Taxan nab-Paclitaxel verabreicht werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Die Kombination aus Gemcitabin und nab-Paclitaxel beim metastasierten Pankreaskarzinom zeigt im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin einen positiven Einfluss u.a. auf das mediane progressionsfreie Überleben (von Hoff et al., 2013). In der S3-Leitlinie wird darauf hingewiesen, dass bei einem günstigen Risikoprofil (ECOG 0-1, Bilirubinwert unter dem 1,5 - fachen des oberen Normwertes, Alter bis 75 Jahre) beim metastasierten Pankreaskarzinom FOLFIRINOX verabreicht werden kann. In einer randomisierten klinischen Phase 3 Studie zeigte die Verabreichung von FOLFIRINOX eine Verlängerung des Gesamtüberlebens sowie des progressionsfreien Intervalls (Thibodeau und Voutsadakis, 2018). Generell erfolgt die Palliativtherapie symptomatisch und fokussiert sich auf eine nebenwirkungsarme Schmerztherapie.

2.2 Das Cholangiokarzinom

Das Cholangiokarzinom kann an folgenden Lokalisationen auftreten: intrahepatisch, perihilär (Klatskin-Tumor, an der Hepatikusgabel) und distal extrahepatisch. Während das perihiläre Gallengangskarzinom mit 60% die häufigste Entität darstellt, tritt das distale mit ca. 30% und das intrahepatische Cholangiokarzinom als seltenste Variante mit knapp 10% auf (Müller et al., 2017). Wie das Pankreaskarzinom ist es unabhängig seiner Lokalisation ein aggressiver Tumor mit schlechter Prognose.

2.2.1 Das intrahepatische Cholangiokarzinom

2.2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das intrahepatische Gallengangskarzinom geht von den intrahepatischen Gallenwegen aus und gehört somit zu den primären Lebertumoren. Die Inzidenz für intrahepatische Cholangiokarzinome beträgt in Deutschland etwa 1-2 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner. Es tritt im höheren Lebensalter auf und betrifft mehr Männer als Frauen. Risikofaktoren sind eine Cholelithiasis, Exposition gegenüber Karzinogenen wie Aflatoxinen, Malformationen der Gallengänge wie Choledochuszysten, parasitäre Infektionen mit beispielsweise Leberegel sowie die primär sklerosierende Cholangitis, die häufig mit der Colitis ulcerosa assoziiert ist (Hoffmann und Schemmer, 2017).

2.2.1.2 Pathologie

Typischerweise ist das intrahepatische Cholangiokarzinom ein duktales Adenokarzinom. Charakteristisch ist dabei die stark ausgeprägte Stromadesmoplasie (Heidecke et al., 2000), makroskopisch als weißlich-derbe Schnittfläche zu erkennen, sowie die Expression von Zytokeratin 7 und 19 sowie CA 19-9 (Schirmacher und Dienes, 2008). Eine klare pathologische Unterscheidung vom extrahepatischen Cholangio- sowie Pankreaskarzinom ist aufgrund des ähnlichen Immunprofils sowie der engen histogenetischen Verwandtschaft teilweise schwierig. Daher sichert der Ausschluss eines Primärtumors im Pankreas und in den extrahepatischen Gallenwegen die Diagnose (Schirmacher und Dienes, 2008).

2.2.1.3 Klinik

Wie beim Pankreaskarzinom gibt es kaum Frühsymptome, wodurch eine Diagnosestellung in der Regel erst spät erfolgt. Mögliche klinische Beschwerden sind unspezifische Oberbauchschmerzen, Cholestasezeichen wie z.B. Ikterus, Übelkeit und Erbrechen sowie ungewollter Gewichtsverlust (Schilling und Lammert, 2012).

2.2.1.4 Klassifikation

Im Folgenden werden die 7. TNM-Klassifikation (Tabelle 3) und UICC-Klassifikation (Tabelle 4) für das intrahepatische Cholangiokarzinom dargestellt.

Tabelle 3: TNM-Klassifikation für das intrahepatische Cholangiokarzinom (Hoffmann und Schemmer, 2017)

TNM	Ausdehnung
T0	Kein Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Solitär, ohne Gefäßinfiltration
T2a	Solitär, mit Gefäßinfiltration
T2b	Multipel, mit oder ohne Gefäßinfiltration
T3	Infiltration des viszeralen Peritoneums oder extrahepatischer Strukturen
T4	Periduktale Invasion
N0	Keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 4: UICC-Klassifikation für das intrahepatische Cholangiokarzinom (Hoffmann und Schemmer, 2017)

Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
Stadium IVA	T4	N0	M0
	Jedes T	N1	M0
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1

2.2.1.5 Diagnostik

Sonographisch fallen beim intrahepatischen Cholangiokarzinom mit komprimierten Gallengängen neben einer solitären Raumforderung kanalikuläre Strukturen in der Umgebung auf. Lassen sich sonographisch nur dilatierte Gallengänge ohne den Nachweis einer solitären Raumforderung finden, sind neben dem Vorliegen sehr kleiner intrahepatischer Gallengangskarzinome auch entzündliche Veränderungen als Ursache denkbar. In diesem Falle sollte eine endoskopische Ultraschalluntersuchung mit hochauflösender Technik durchgeführt werden, ggf. auch eine ERCP oder MRCP. Mittels sonographischer Darstellung können zudem kleine oder beispielsweise diffus entlang der Gallenwege wachsende Tumore unentdeckt bleiben (Seitz et al., 2008). Daher sollte eine Computertomographie des Thorax und Abdomens

durchgeführt werden, auch um im Zuge des Stagings den Metastasierungsgrad der Patienten zu bestimmen.

Die Tumormarkerbestimmung von CA 19-9 sollte wie beim Pankreaskarzinom nicht in der Primärdiagnostik erfolgen, sondern der Verlaufsbeurteilung dienen.

2.2.1.6 Therapie

Die operative Resektion des Tumors stellt trotz hoher Rezidivrate die einzig kurative Therapieoption dar. Beim intrahepatischen Cholangiokarzinom werden Majorresektionen ggf. auch mit Resektion des extrahepatischen Gallengangssystems durchgeführt. Trotz operativer Resektion bleibt die schlechte Prognose u.a. aufgrund operativer Komplikationen schlecht (Neff et al., 2018). Je nach Lokalisation und Größe des Tumors sind auch Segmentresektionen möglich (Lang und Fichtner-Feigl, 2018). Neuere Studien zeigen einen potentiellen Nutzen einer zusätzlichen adjuvanten (Radio-)Chemotherapie mit Gemcitabin, Cisplatin oder 5-FU bei Patienten mit lokalen oder resektablen intrahepatischen Gallengangskarzinomen (Bupathi et al., 2017). Ist eine operative Revision nicht möglich, kommen symptomgesteuerte palliative Maßnahmen zum Einsatz.

2.2.2 Der Klatskin-Tumor

2.2.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das an der Hepatikusgabel (Zusammenfluss des rechten und linken Ductus hepaticus) lokalisierte Cholangiokarzinom, 1965 von dem US-amerikanischen Arzt Gerald Klatskin erstmalig beschrieben, tritt in Deutschland mit einer Inzidenz von 1 zu 100.000 auf (Hoffmann und Schemmer, 2017). Zusammenfassend wird es definiert als ein extrahepatisches Cholangiokarzinom des oberen Drittels der extrahepatischen Gallengänge (Remmele, 1997). Die genaue Ätiologie ist wie bei allen Formen des Cholangiokarzinoms unklar.

2.2.2.2 Klinik

Mögliche klinische Symptome sind wie beim intrahepatischen Cholangiokarzinom unspezifische Oberbauchschmerzen, B-Symptomatik und vor allem Cholestase-Zeichen wie Pruritus oder dunkler Urin. Die Patienten leiden nahezu immer an einem zumeist schmerzlosen Verschlussikterus (Kornek und Schima, 2010). Differentialdiagnostisch kommen neben primären Lebertumoren wie dem HCC, Lebermetastasen und dem Pankreaskarzinom auch nicht-maligne Erkrankungen wie eine Cholangitis oder Gallengangsstrikturen in Frage (Hoffmann und Schemmer, 2017).

2.2.2.3 Pathologie

Pathologisch zeigt sich der Klatskin-Tumor als diffus wachsendes Adenokarzinom der extrahepatischen Gallengänge. Bei zunehmender Verlegung der Gallengänge kommt es zum Ikterus.

2.2.2.4 Klassifikation

Der Klatskin-Tumor kann unterschiedlich klassifiziert werden. Neben der 7. TNM- und UICC-Klassifikation, die in Tabelle 6 und 7 dargestellt sind, gibt es noch die häufig klinisch gebräuchliche Einteilung nach Bismuth-Corlette in vier Typen (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Klassifikation des Klatskin-Tumors nach Bismuth-Corlette (Hoffmann und Schemmer, 2017)

Typ	Charakteristika
Typ I	Betrifft Gallengangsgabel, Kommunikation zwischen rechtem und linken Gallengang vorhanden
Typ II	Wachstum bis in Gallengangsgabel
Typ IIIA	Infiltration in Gallengangsgabel und rechten Gallengang
Typ IIIB	Infiltration in Gallengangsgabel und linken Gallengang
Typ IV	Infiltration in Gallengangsgabel und beide Gallengänge oder multifokal

Tabelle 6: TNM-Klassifikation für den Klatskin-Tumor (Beckh, 2013)

TNM	Ausdehnung
T0	Kein Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Beschränkung auf Gallengang
T2a	Über Gallengangswand hinaus
T2b	Infiltration des benachbarten Lebergewebes
T3	Infiltration unilateraler Äste der V. portae oder der A. hepatica propria
T4	Infiltration Hauptstamm der V. portae oder bilateraler Äste, A. hepatica communis, bilateraler oder unilateraler Gallengänge 2. Ordnung mit Befall von kontralateralen Ästen der V. portae
N0	Keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 7: UICC-Klassifikation für den Klatskin-Tumor (Beckh, 2013)

Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2a-b	N0	M0
Stadium IIIA	T3	N0	M0
Stadium IIIB	T1-T3	N1	M0
Stadium IVA	T4	Jedes N	M0
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1

2.2.2.5 Diagnostik

Typisch für den Klatskin-Tumor ist sonographisch das sogenannte „Doppelflinten-“ oder „Schienenstrangphänomen“. Dies beschreibt eine sonographisch sichtbare Dilatation sowohl des Gallengangs als auch des Pfortaderastes, die anatomisch meist direkt nebeneinander verlaufen, aufgrund einer mechanischen Obstruktion durch den Tumor (Felix et al., 1993). Der Name „Doppelflintenphänomen“ rührt daher, dass das Ultraschallbild dem Bild zweier Flintenläufe eines Gewehrs ähnelt. Weitere diagnostische Möglichkeiten sind die ERCP, MRCP und vor allem die Computertomographie, um ein Staging durchzuführen.

Aufgrund des Verschlussikterus liegen in der Regel erhöhte Cholestase-Parameter vor. Zu diesen Parametern gehören die Alkalische Phosphatase (AP), Gamma-Glutamyl-Transferase (γ -GT) sowie das Bilirubin. Tumormarker wie das CA 19-9 sollten nur zur Verlaufskontrolle bestimmt werden.

2.2.2.6 Therapie

Auch beim Klatskin-Tumor sollte eine operative Resektion angestrebt werden, obgleich ein Großteil der Patienten bei Diagnosestellung bereits inoperabel ist. In Zentren wird in der Regel eine Trisektorektomie mit vollständiger Lymphadenektomie, eine en-bloc Resektion extrahepatischer Gallengänge sowie eventuell eine Pfortaderteilresektion durchgeführt. Diese Operationstechnik soll in ca. 50% der Fälle eine R0-Resektion ermöglichen, welche die 5-Jahres-Überlebensrate auf bis zu 40% verbessere (Herold, 2013). Bei einem ausgewählten Patientenkollektiv mit inoperablem Tumor haben Lebertransplantationen mit einer neoadjuvanten Therapie vielversprechende 5-Jahres-Überlebensraten gezeigt (Lewis et al., 2017). Palliativ stehen verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung, beispielweise die endoskopische Stentsetzung zur Galleableitung sowie die photodynamische Therapie mittels Photosensitizern, um ein „Down-sizing“ des Tumors zu bewirken. In Studien wurde die photodynamische Therapie mit der Gabe von Chemotherapeutika wie Gemcitabin und Cisplatin kombiniert, was zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führte (Herold, 2013).

2.2.3 Das distale Cholangiokarzinom

2.2.3.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das distal extrahepatische Cholangiokarzinom ist generell ein seltenes Karzinom. Beschriebene Risikofaktoren sind eine Cholelithiasis, Colitis ulcerosa, primär sklerosierende Cholangitis sowie ein mehrjähriger Befall mit cholangiolären Parasiten (Riede und Blum, 2009).

2.2.3.2 Klinik

Neben den bereits beschriebenen unspezifischen Beschwerden wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Oberbauchschmerzen stehen bei dieser Form des Gallengangskarzinoms aufgrund einer Obstruktion der distalen extrahepatischen Gallengänge cholestatische Beschwerden im Vordergrund. Dazu gehören klassischerweise Pruritus, Ikterus, ein entfärbter Stuhl sowie dunkler „bierbrauner“ Urin (Hahn, 2010). Klinisch imponiert das bereits erwähnte Courvoisier-Zeichen, eine unter dem rechten Rippenbogen tastbare prall elastische Gallenblase mit schmerzlosem Ikterus aufgrund eines länger andauernden Abflusstaus der distalen Gallenwege. Dennoch ist dieses klinische Zeichen nicht spezifisch für das Cholangio- oder Pankreaskarzinom, da der Stau der Gallenwege auch durch andere krankhafte Zustände wie Gallensteine oder entzündlich bedingte Strikturen bedingt sein kann (Hirner und Weise, 2004).

2.2.3.3 Pathologie

Charakteristisch für die Pathologie des distal extrahepatischen Cholangiokarzinoms ist das sogenannte „Stenosemuster“: Es kommt durch das Wachstum des Tumors zu einer Stenosierung der distalen Gallenwege. Dabei sind zwei verschiedene Wachstumsmuster beschrieben. Während es bei den szirrhösen Karzinomen durch ein diffuses Wachstum der Gallengangswand zu einer Lumeneinengung kommt, erfolgt die Gallengangseinengung bei den papillären Adenokarzinomen durch ein polypöses Wachstum des Tumors (Riede und Blum 2009). Die entstehende Gangstriktur führt bei beiden Varianten zum Abflusstau der Galle und damit zum Ikterus.

2.2.3.4 Klassifikation

Tabelle 8 und 9 zeigen jeweils die 7. TNM- und UICC- Klassifikation für das distal extrahepatische Cholangiokarzinom.

Tabelle 8: TNM-Klassifikation für das distal extrahepatische Cholangiokarzinom (Beckh, 2013)

TNM	Ausdehnung
T0	Kein Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Beschränkung auf Gallengang
T2a	Durchbrechung des Gallengangs
T2b	Infiltration benachbarten Lebergewebes
T3	Infiltration benachbarter Organe
T4	Infiltration Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior
N0	Keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 9: UICC-Klassifikation für das distal extrahepatische Cholangiokarzinom (Beckh, 2013)

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

2.2.3.5 Diagnostik

Typischerweise zeigt sich sonographisch eine Erweiterung intrahepatischer Gallengänge durch den tumorbedingten Aufstau der Galle. Ferner zeigt sich auch bei extrahepatischen Gallengangskarzinomen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei 50% eine Infiltration des Tumors in die Leber sowie bei 30-50% ein Befall der Lymphknoten. Neben der Sonographie stehen noch die invasive ERCP und MRCP, die Endosonographie mit Möglichkeit der Feinnadelbiopsie sowie die nicht-invasive CT oder MRT zur Verfügung. Zudem gibt es noch neuere diagnostische Möglichkeiten wie die der intraduktalen Sonographie. Der Vorteil der endoskopisch oder perkutan hepatisch platzierten Minisonden mit Videoaufzeichnung liegt in der noch höheren Auflösung (0,1 mm) und Eindringtiefe (20 mm) (Gerok und Blum, 2007).

Neben der Bestimmung der Cholestaseparameter AP, γ -GT und Bilirubin sollte mit Hinblick auf die Therapiekontrolle auch die Bestimmung des Tumormarkers CA 19-9 erfolgen.

2.2.3.6 Therapie

Therapeutisch sollte bei fehlenden Kontraindikationen eine operative Entfernung des Tumors in einem Zentrum angestrebt werden. Das Operationsverfahren der Wahl ist die pyloruserhaltende Pankreatikoduodenektomie nach Whipple. Beim distalen Gallengangskarzinom wird die Diagnose im Vergleich zu anderen Gallengangskarzinomen meist früh gestellt und der Tumor ist daher meistens lokal resektabel. Im Falle eines palliativen Vorgehens können Maßnahmen wie eine interne oder externe Galleableitung sowie weitere endoskopische Verfahren deutlich zur Reduktion tumorinduzierter Beschwerden beitragen (Radtke und Königsrainer, 2016).

2.3 Vergleich der Tumorentitäten

Eine vergleichende immunhistochemische Analyse des Notch-Signalwegs im Pankreaskopf- sowie intra- und extrahepatischem Cholangiokarzinom ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Die WHO trennt scharf zwischen den Tumorentitäten Pankreas- sowie intra- und extrahepatischem Gallengangskarzinom. Dabei zeigen neueste Forschungsergebnisse immer mehr Gemeinsamkeiten zwischen Pankreaskopf- und Cholangiokarzinomen. Es wird aufgrund embryologischer, klinischer, struktureller und molekularbiologischer Gemeinsamkeiten eine gemeinsame Superfamilie für einen Teil dieser Tumorentitäten postuliert (Schmuck et al., 2016).

2.4 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist ein in mehrzelligen Organismen weit verbreiteter und stark konservierter Signalweg, der erstmals in der *Drosophila* Fliege entdeckt worden ist. Er spielt nicht nur in der embryologischen Entwicklung eine große Rolle, sondern auch im Erhalt und in der Erneuerung adulten Gewebes (Sato et al., 2012).

Der Signalweg funktioniert größtenteils durch Zell-Zell-Interaktionen. Bindet eine Nachbarzelle mit einem passenden Notch-Liganden wie Delta oder Jagged an den Notch-Rezeptor der Zielzelle, so kommt es zur proteolytischen Aktivität der extrazellulären α -Sekretase, der ADAM Metalloprotease (Sato et al., 2012). Diese Protease führt zur Abspaltung des ligandenbindenden Teils des Notch-Rezeptors, während die integrale γ -Sekretase der Plasmamembran die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NID) freisetzt. NID gelangt über Kernporen in den Zellkern der Zielzelle und bindet dort an den normalerweise inhibierend wirkenden Transkriptionsfaktor CSL. Der neue Komplex aus NID und CSL wirkt nun auf Transkriptionsebene aktivierend und führt zu einer verstärkten Expression wichtiger Zielgene. Dazu gehören beispielsweise wichtige regulatorische Gene des Zellzyklus mit Zielproteinen wie

Cyclin D1 sowie Gene, die für Transkriptionsfaktoren wie HES1 kodieren. Es gibt auch Notch-Rezeptoren, die nur eine zytosolische Domäne besitzen und daher nicht wie oben beschrieben durch auf Nachbarzellen befindlichen Liganden aktiviert werden, wodurch ein onkogenes Potential entsteht (Müller-Esterl, 2018). In der Abbildung 1 werden zentrale Komponenten des Notch-Signalwegs bildhaft dargestellt.

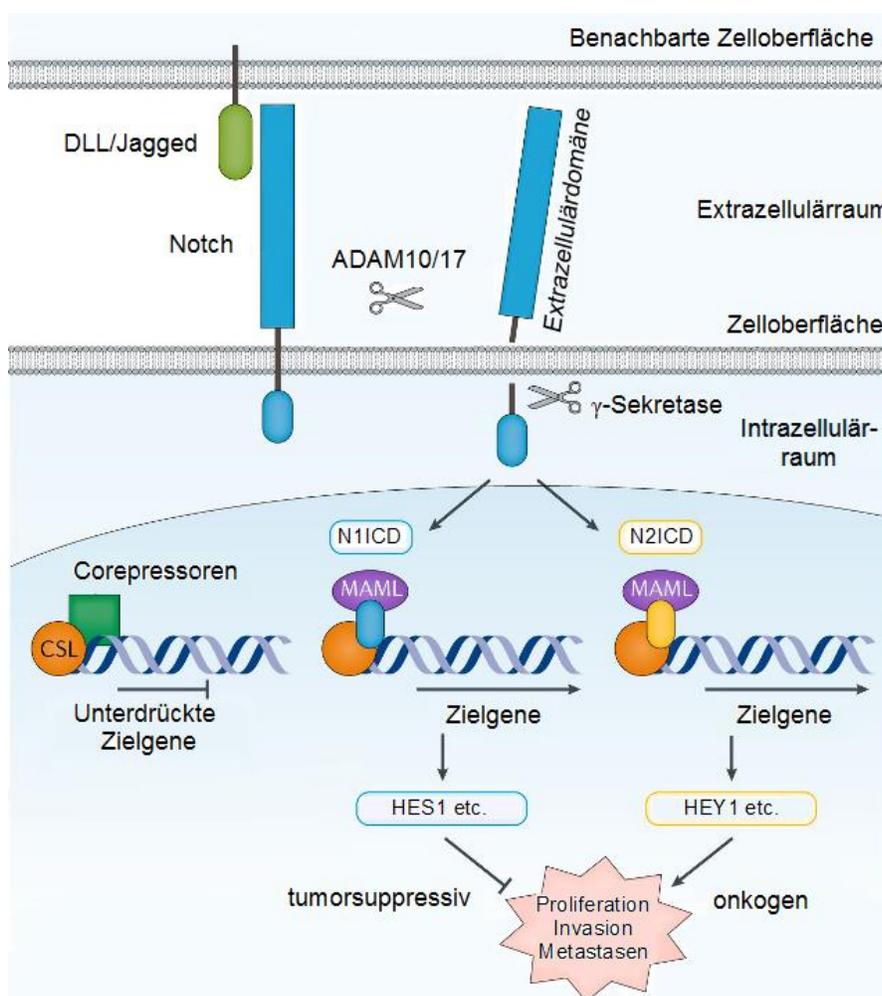


Abbildung 1: Der Notch-Signalweg (modifiziert nach Goriki et al., 2018)

Die Rolle des Notch-Signalweges in der embryologischen Entwicklung ist immer noch Gegenstand der Forschung. Für einige Entwicklungsprozesse ist seine Rolle schon näher beschrieben, wie beispielsweise in der Entwicklung des vaskulären Systems. Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Signaltransduktionsweg für die Schicksalsentscheidung arterieller Stammzellen sowie während der Angiogenese an der Selektion der sogenannten „Tip“-Zellen, also der Leitzellen des entstehenden Blutgefäßsystems, und der „Stalk“-Zellen, also der Leitzelle

folgenden Zellen, beteiligt ist (Kume, 2012). Auch die epithelial-mesenchymale Transition, einem Prozess bei dem Epithelzellen ihre Zellpolarität und Zell-Zell-Adhäsionen verlieren und Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen annehmen, wird vom Notch-Signalweg reguliert (Sethi und Kang, 2012).

Der Notch-Signalweg beeinflusst diverse Erhaltungs- und Erneuerungsprozesse in verschiedenen Gewebearten im adulten Organismus. Er beeinflusst dabei nicht nur Organe, deren Gewebe einer aktiven Selbsterneuerung unterliegt wie im Gastrointestinaltrakt, hämatopoetischen System sowie in der Haut, sondern reguliert auch Prozesse in weniger regenerativen Organen wie im Muskel, Knochen oder Nervensystem (Tao et al., 2010). Das Epithel des Gastrointestinaltraktes erneuert sich in etwa alle vier bis fünf Tage (Van der Flier und Clevers, 2009). Für diesen hohen Zelldurchsatz essentiell sind die in den Krypten liegenden intestinalen Stammzellen, die sich teilen und damit die transit-amplifizierenden Zellen erzeugen, der Grundlage aller vier differenzierten Zellen des unteren Intestinums: absorptive Enterozyten, sekretorische Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Paneth-Körnerzellen. Studien mit Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass der Notch-Signalweg die Schicksalsentscheidung der Stammzellen in entweder absorptive Enterozyten oder sekretorische Becherzellen reguliert. Ferner führt es in Abhängigkeit des Wnt-Signalweges zur verstärkten Proliferation der intestinalen Stammzellen oder der transit-amplifizierenden Zellen (Sato et al., 2012).

Ein möglicher Einfluss des Notch-Signalwegs auf die Kanzerogenese hat sich erstmals in Untersuchungen der akuten T-Zell-Leukämie gezeigt. Bei etwa 1% aller Patienten mit dieser Leukämieform gibt es eine Translokation t(7;9), wodurch das Notch1-Gen unter die Kontrolle eines T-Zell-Rezeptor-Genlocus gelangt. Infolge dieser Translokation geht die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors verloren und die Aktivierung des Signalwegs ist nicht mehr von Liganden der Nachbarzellen abhängig. Somit kommt es zu keiner bedarfsadaptierten, sondern einer konstitutiven Aktivität. Obgleich diese spezielle Translokation nur einen geringen Teil der Leukämie-Patienten betrifft, finden sich bei über der Hälfte aller Patienten mit einer akuten T-Zell-Leukämie somatische Mutationen im Notch1-Protein (Wagener und Müller, 2010). Doch nicht nur in der T-Zell-Leukämie scheint der Notch-Signalweg dysreguliert zu sein, auch z.B. im Mamma- oder Basalzellkarzinom der Haut sind Veränderungen in diesem Signalweg beschrieben. Wie bereits erwähnt, wird die in der embryologischen Entwicklung bedeutsame epithelial-mesenchymale Transition durch den Notch-Signalweg reguliert. Dieser Prozess scheint aber auch an der Kanzerogenese beispielsweise des Mamma-Karzinoms beteiligt zu sein. Wie Bolós et al. (2013) zeigen, führt eine Überexpression der Notch intrazellulären Domäne in bestimmten Zelllinien des Adenokarzinoms der Mamma zu einer Reduktion von E-Cadherin, einem wichtigen Zelladhäsionsmolekul, und damit zu einer erhöhten Migrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen. Ferner wurde der Einfluss des Notch-Signalwegs auf die Mikroumgebung des Tumors gezeigt. Untersuchungen einer bestimmten Form des Mammakarzinoms demonstrieren die Abhängigkeit der Expression wichtiger pro-inflammatorischer Zytokine wie IL1 β und CCL2 sowie der Rekrutierung tumor-assoziiertes

Makrophagen vom Notch-Signalweg (Shen et al., 2017). Die starke Evidenz einer wichtigen Rolle des Notch-Signalwegs in der Karzinogenese stellt die Frage nach möglichen therapeutischen Interventionen. Lamy et al. (2017) haben in ihrem Review die Rolle dieses Signalwegs in der Entstehung und Entwicklung des Mammakarzinoms sowie im Überleben von Brustkrebs-Patienten dargestellt und sind auf erste klinische Studien mit Antikörpern gegen diverse Notch-Rezeptoren und –Liganden in verschiedenen Formen dieses Tumors eingegangen. Weitere Untersuchungen zu therapeutischen Eingriffen in den Notch-Signalweg haben trotz einer vielversprechenden Ausgangssituation gezeigt, dass noch einige Probleme einer erfolgreichen Entwicklung von Notch-Inhibitoren im Weg stehen. Dieser Signalweg ist sehr komplex und noch nicht vollständig verstanden. Es gibt dabei verschiedene Möglichkeiten den Notch-Signalweg zu inhibieren, weshalb unterschiedliche Ansätze ausprobiert und ggf. kombiniert werden müssen. Ferner gibt es, um beim Beispiel des Mammakarzinoms zu bleiben, den Bedarf an hochspezifischen Antikörpern, die die individuelle Notch-Aktivität in den unterschiedlichen Brustkrebsformen detektieren und quantifizieren (Han et al., 2011).

Der Einfluss des Notch-Signalwegs auf die in dieser wissenschaftlichen Arbeit untersuchten Tumore ist in Teilen untersucht worden. Gao et al. (2017) zeigen in ihrem Review die Bedeutung dieses Signalweges in der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms. Dabei sind sie auch auf die Inhibition des Notch-Signalweges als mögliche therapeutische Strategie eingegangen. Als weiteren therapeutischen Ansatz nennen sie die Beeinflussung der Notch-Signalweg kontrollierenden Signaltransduktionen. Im gleichen Jahr veröffentlichten Cigliano et al. (2017) ein Review über den Einfluss dieses Signalweges auf Gallengangskarzinome. In Einklang mit Gao et al. (2017) wurde die Bedeutung für die Tumorentstehung und -aggressivität dargestellt. Ein Vergleich dieser Tumorentitäten mit Untersuchung wichtiger Schlüsselproteine des Notch-Signalweges ist jedoch noch nicht erfolgt.

Im Folgenden wird auf die in der wissenschaftlichen Arbeit untersuchten Antigene eingegangen.

2.4.1 Notch1 und Notch4

Beide Rezeptoren sind transmembranöse Proteine mit einer extra- und intrazellulären Domäne. Säugetiere besitzen insgesamt vier verschiedene Notch-Rezeptoren: Notch1, Notch2, Notch3, und Notch4 (Platonova et al., 2017). Tierversuche haben gezeigt, dass Notch1 eine wichtige Rolle in der embryologischen Entwicklung des Pankreas spielt. Ein zugrunde liegender Mechanismus dafür ist die durch Notch1 getriggerte Selbsterneuerung pankreatischer Progenitorzellen. Nach der vollständigen Entwicklung des Pankreas wird die Notch1 Aktivität herunterreguliert, obgleich die Oberflächenexpression dieses Proteins hochreguliert wird. Ferner zeigt sich in einem untersuchten Kollektiv von Pankreaskarzinomen eine Überexpression von Notch1, jedoch nicht in den Proben pankreatischer intraepithelialer Neoplasien. Dies deutet darauf hin, dass Notch1 erst in der späteren Karzinogenese des Pankreaskarzinoms eine Rolle

spielt (Hu et al., 2013). Auch Notch4 scheint in Pankreaskarzinomen verstärkt exprimiert zu sein, in *in vitro* Experimenten führt eine Inhibition von Notch4 zu einer geringeren Invasions- und Migrationsfähigkeit pankreatischer Tumorzellen (Qian et al., 2016). Auch in intrahepatischen Karzinomen ist Notch1 überexprimiert und mit Merkmalen aggressiven Tumorverhaltens sowie verminderter Chemotherapie-Sensitivität assoziiert (Wu et al., 2014a). Aoki et al. (2016) zeigen eine erhöhte Expression von Notch1 und Notch4 in extrahepatischen Gallengangstumoren, demonstriert wird u.a. eine Korrelation zwischen erhöhter Notch1 Aktivität und schlechter Differenzierung extrahepatischer Gallengangstumore sowie kürzerem Überleben.

2.4.2 ADAM17

Die Disintegrin-Metalloproteinasen (ADAMs) gehören zur Superfamilie der Zink-Metalloproteinasen, liegen extrazellulär und besitzen vielfältige proteolytische Funktionen beispielsweise bei der Zelladhäsion sowie bei der Freisetzung von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren von der Zelloberfläche (Seals und Courtneidge, 2003). Die im Kapitel Notch-Signalweg beschriebenen α -Sekretasen gehören zur Gruppe der ADAMs und spalten den ligandenbindenden Teils der Notch-Rezeptoren ab (Zolkiewska, 2009). ADAMs sind Transmembranproteine mit verschiedenen Domänen. Sie besitzen häufig eine N-Terminale Prodomäne, welche zur Aktivierung der Proteinase abgespalten werden muss, eine Zink-abhängige Metalloprotease, im extrazellulären Raum oftmals eine EGF-, Cystein- und Disintegrin-Domäne, eine Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre C-Domäne (Cao et al., 2002). Beim Menschen sind bisher 32 ADAM-Typen identifiziert worden, wobei aufgrund unterschiedlicher Splicing- und Prozessierungsarten noch weitere ADAM-Typen mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften existieren. ADAM17 ist eins der am besten untersuchten Metalloproteinasen und wird auch als TACE bezeichnet, tumor-necrosis-factor- α converting enzyme. Der Name rührt daher, dass ADAM17 das Zellmembran-gebundene pro-TNF- α spaltet und damit das inflammatorische Zytokin TNF- α freisetzt. Doch auch andere Zytokine (z.B. TGF- α), Zytokin-Rezeptoren (z.B. IL-6-Rezeptor), Liganden (z.B. L-Selektin) und Adhäsionsproteine (z.B. VCAM-1) werden von ADAM17 gespalten. ADAMs sind an der embryologischen Entwicklung und am Wachstum beteiligt, spielen aber auch in diversen Krankheitsprozessen wie Entzündungen (z.B. bei Rheumatoider Arthritis) und der Tumorentstehung eine Rolle (Haubeck, 2013). Von den über 80 bekannten Substraten von ADAM17 sind ein Großteil davon Entzündungsmediatoren und Karzinogenese-relevante Moleküle, die beispielsweise an der Immunüberwachung von Tumoren beteiligt sind (Moss und Minond, 2017). Ringel et al. (2006) zeigen in ihren Untersuchungen, dass ADAM17 sowohl in fortgeschrittenen pankreatisch intraepithelialen Neoplasien als auch in Adenokarzinomen des Pankreas überexprimiert ist und diese Überexpression mit einer erhöhten Invasionsfähigkeit der Pankreastumore korreliert. Eine weitere Studie zeigt den Zusammenhang zwischen einer Überexpression von ADAM17 in hilären Gallengangskarzinomen und einer vermehrten Tumorprogression (Jiao et al., 2018). Aufgrund der Beteiligung von ADAM17 an diversen

Krankheitsprozessen wie Rheumatoider Arthritis, Sepsis, verschiedenen Tumorentitäten und sogar hypertropher Kardiomyopathie, ist es als mögliches therapeutisches Zielprotein in den Fokus der medizinischen Forschung geraten. Erste Ergebnisse aus klinischen Studien mit Inhibitoren dieser Protease waren jedoch ernüchternd und führten zu einem Rückgang des Forschungsinteresses von Pharmakonzernen, ein Grund dafür ist die Vielzahl an Substraten und die damit einhergehend hohe Rate an unerwünschten Nebenwirkungen bei der Inhibition von ADAM17. Dennoch zeigen sich neue hoffnungsvolle Einsatzgebiete in der Tumorthherapie (Moss und Minond, 2017).

2.4.3 Musashi (MSI)

Musashi ist ein Stammzellmarker und mRNA-Bindungsprotein, das sowohl in gesunden als auch in Tumorzellen vorkommt. Durch Inaktivierung von NUMB, einem Notch-Signalweg-Inhibitor, kommt es zu einer Stimulation des Notch-Signaltransduktionsweges (Pastò et al., 2014). Musashi bindet dabei an die mRNA von NUMB, wodurch eine Proteintranslation nicht mehr möglich ist. Der Notch-Signalweg kann auch durch einen proteasomalen Abbau der Notch intrazellulären Domäne inhibiert werden. Untersuchungen in bestimmten Krebsstammzellen haben gezeigt, dass MSI-1 zu einer Herabregulation des 26S-Proteasoms durch Bindung an die mRNA von NF-YA (Nuclear Transcription Factor Y Subunit Alpha) führt, einem Transkriptionsfaktor, der die Bildung der 26S-Proteasomunterheit reguliert. Durch die geringere Expression des Proteasoms wird weniger NID abgebaut und der Notch-Signalweg bleibt aktiv (Lagadec et al., 2014). Sheng et al. (2017) zeigen, dass eine Überexpression von MSI-2 in Pankreaskarzinomen in Abhängigkeit weiterer für die Karzinogenese relevanter Proteine sowohl mit einer schlechten Prognose als auch einer Chemotherapie-Resistenz assoziiert ist.

2.4.4 HES1

Der Transkriptionsfaktor HES1 (Hairy and enhancer of split-1) ist eines der Zielproteine, das bei Aktivierung des Notch-Signalwegs verstärkt exprimiert wird und liegt an der Schnittstelle verschiedener Signaltransduktionswege, beispielsweise dem Wnt-Signalweg (Kay et al., 2017). HES1 beeinflusst viele wichtige physiologische Prozesse, beispielsweise die Zelldifferenzierung, Apoptose und den Zellzyklusarrest (Liu et al., 2015). Während der embryologischen Entwicklung vieler Organe, beispielsweise des Pankreas oder des Nervensystems, spielt der Notch1-HES1 Signalweg eine wichtige Rolle; er reguliert u.a. Differenzierungsvorgänge und Schicksalsentscheidungen von Stammzellen. Obgleich der Notch1-HES1-Signalweg in der embryologischen Entwicklung des Pankreas aktiviert ist, findet sich die Expression dieses Proteins auch in Pankreaskarzinomen wieder, hinweisend auf eine Funktion von HES1 in der Karzinogenese (Hu et al., 2013). Auch in intrahepatischen Cholangiokarzinomen spielt HES1

eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung (Matsumori et al., 2018). Eine vermehrte Expression von HES1 ist das Ergebnis einer erhöhten Notch-Signalweg-Aktivität, somit möglicherweise zum Tumorwachstum beitragend. Ferner inhibiert die Überexpression von HES1 eine Differenzierung von Tumorstammzellen und trägt damit zu deren Erhalt bei, spielt eine Rolle in der Metastasierung und führt zur Chemotherapieresistenz durch Antagonisierung der medikamenten-induzierten Apoptose (Liu et al., 2015). Aufgrund der wichtigen Rolle von HES1 in der Kanzerogenese diverser Tumore ist es ein interessantes Zielprotein in der Tumorthherapie und erste präklinische Untersuchungen scheinen diese Annahme zu unterstützen. Goto et al. (2017) zeigen z.B., dass eine Inhibition von HES1 in Tumorstammzellen neben einer sofortigen Apoptose auch eine limitierte Tumorbildung bewirkt und somit zur unmittelbaren Tumorregression beiträgt, ohne dabei die Hämostase normaler Stammzellen zu stören.

2.4.5 CD44

CD44 ist ein transmembranes Oberflächenprotein variabler Größe (80-100 kD) und dient primär der Zelladhäsion. Es ist ein u.a. ein Rezeptor für Epithelzellstrukturen und Hyaluronsäure, einem wichtigen Bestandteil der Extrazellulärmaxtrix (Pichler und Peter, 2006) und wird auf diversen Tumorstammzellen exprimiert (Morath et al., 2016). Zudem ist CD44 ein Korezeptor für verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine. Zentrale Vorgänge wie Zelldifferenzierung, -proliferation oder -migration werden von diesem Oberflächenprotein beeinflusst und zeigen somit seine Bedeutung in der Tumorentstehung und -progression. Die besonders durch unterschiedliche Splicing-Formen entstandenen CD44-Isomere, genannt variante Isomere (vCD44), sind gewebspezifisch und tumorassoziiert, während das so genannte Standard-CD44 (sCD44) auf allen hämatopoetischen Stammzellen und in fast jedem Gewebe exprimiert wird (Yamada et al., 2018). Es gibt eine Notch1/CD44-Achse, wobei es zu einer direkten Transkription von CD44 durch Notch1 kommt (García-Peydró et al., 2019). Beide Stammzellmarker korrelieren u.a. mit einer schlechten Prognose beim kolorektalen Karzinom (Mohamed et al., 2019). Li et al. (2015) zeigen in ihren Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen einer Überexpression von CD44 und einer erhöhten Fernmetastasierungsrate sowie weiteren Merkmalen aggressiven Tumorverhaltens im Pankreaskarzinom. In Gallengangskarzinomen ist eine verstärkte CD44-Expression mit einer schlechten Prognose der Patienten assoziiert und es gibt Hinweise auf eine wichtige Rolle von CD44 in der frühen Phase der Karzinogenese sowie während der späteren Progression des Tumors (Kunlaba et al., 2012).

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientenkollektiv

Das in dieser wissenschaftlichen Arbeit untersuchte Material der Patientenkohorte stammt aus der Gewebebank der Chirurgischen Klinik Campus Virchow-Klinikum der Medizinischen Fakultät Charité Universitätsmedizin Berlin. Gemäß den Richtlinien der Ethikkommission sind nach schriftlicher Einwilligung der Patienten die Proben in die Biobank aufgenommen und klinische Daten erfasst worden. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité unter der Nummer EA1/292/16 genehmigt.

Das in dieser wissenschaftlichen Arbeit untersuchte Patientenkollektiv bestehend aus insgesamt 60 Proben von Patienten mit Pankreaskopf- (n=14), extrahepatischen (n=22) und intrahepatischen (n=24) Cholangiokarzinomen umfasst 21 Männer und 39 Frauen im Alter von 41 bis 83 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Während der Operation wurde sowohl Tumor- als auch Normalgewebe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In Stickstofftanks erfolgte dann der Transport zur Gewebebank mit genauer Dokumentation probenassoziierter Daten, beispielsweise der Art und Anzahl der vorliegenden Patientenproben. Dort wurden die Proben in Gefrierschränken bei -80°C gelagert. In einigen Fällen lag für die Analyse nur Tumor- oder Normalgewebe vor. Dies ist meist dadurch zu erklären, dass die Asservierung von beiden Probentypen nicht möglich war.

3.1.2 Puffer

Für die immunhistochemische Färbung wurde ein TBST-Puffer verwendet. Dazu wurden 9,0 g Tris-Base (Molekulargewicht: 121,10 g/mol, AppliChem), 68,5 g Tris-HCL (Molekulargewicht: 157,6 g/mol, ROTH) und 87,8 g NaCl (Molekulargewicht: 58,44 g/mol, ROTH) in einen Messzylinder gegeben und mit 1 L Aqua dest. mittels eines Laborrührers so lange vermischt, bis sich alle festen Bestandteile auflösten. Ferner wurde 1 ml Tween 20 (AppliChem) zu der 1 L Lösung hinzugegeben (0,1%). Der pH-Wert wurde mittels pH-Meter (WTW, inolab Multi 9310 IDS) zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt. Die Lagerung der Pufferlösung erfolgte bei 4°C .

3.1.3 Antikörper

Im Folgenden werden in Tabelle 10 und 11 die für die immunhistochemische Färbung verwendeten Primärantikörper sowie das entsprechende Kontrollgewebe dargestellt. Tabelle 12 zeigt den verwendeten Sekundärantikörper.

Tabelle 10: Primärantikörper

Antikörper	Klonalität	Wirt	Lagerung	Verdünnung	Hersteller/Nummer
Notch1	polyklonal	Kaninchen	-20°C	1:250	Cell Signaling#(D6F11)XP (R)
Notch4	polyklonal	Kaninchen	-20°C	1:500	avivasysbio#ARP320 52-P050
ADAM17	polyklonal	Kaninchen	4°C	1:500	ABGENT#AP1492a
MSI	polyklonal	Kaninchen	4°C	1:500	ANTIBODIES#ABIN 953550
HES1	polyklonal	Kaninchen	-20°C	1:250	St. John's#STJ23938
CD44	monoklonal	Maus	4°C	1:500	eBioscience#BMS150

Tabelle 11: Kontrollgewebe für Primärantikörper

Antikörper	Kontrollgewebe	Färbung
Notch1	Hirn	Neuronen
Notch4	Placenta	Gefäße der Dezidua
ADAM17	Kolon	Kolonepithel
MSI	Hirn	Neuronen
HES1	Plazenta	Gefäße
CD44	Magen	Fibrozyten

Tabelle 12: Sekundärantikörper

Kit	Wirt	Lagerung	Verdünnung	Hersteller/Nummer
LSAB2	Maus, Kaninchen	4°C	Für Tumorgewebe: keine Für Normalgewebe: 1:2	DAKO#K0-690

3.2 Methoden

3.2.1 Anfertigung der Kryoschnitte

Im ersten Schritt wurden die bei -80°C gelagerten Patientenproben zu mikroskopischen Präparaten verarbeitet. Dazu wurden die Proben aus der Gewebebank entnommen, in Stickstofftanks in das Labor gebracht und in dem Kryostaten (Thermo Fisher Scientific, Cryostar) zwischengelagert. Die Temperatur des Kryostaten ist dabei auf -20°C eingestellt

worden. Anschließend wurden die Proben aus den Proberöhrchen entnommen und mittels eines speziellen Einbettmediums (Sakura, Tissue-Tek O.C.T.) fixiert. In fixierter Form wurden die Proben dann mit einem für das Mikrotom geeigneten Messer (Feather Microtome blade, C35) auf 4 µm Dicke geschnitten und dann auf die Objektträger (Superfrost Plus, R. Langenbrinck GmbH) aufgetragen. Jeweils zwei Gewebeschnitte kamen auf einen Objektträger. Nach Fertigstellung der Kryoschnitte ist das restliche Patientenmaterial aus dem gefrorenen Einbettmedium gelöst und wieder bei -80°C gelagert worden. Nun wurden die Schnitte für 10 Minuten zur Fixierung auf die Objektträger in eine Acetonlösung (ROTH) getaucht und trockneten danach unter einen Abzug für weitere 20 Minuten. Die fertigen Kryoschnitte wurden dann bei -20°C im Gefrierschrank (Thermo Fisher Scientific) bis zur immunhistochemischen Färbung aufbewahrt.

3.2.2 Immunhistochemische Färbung

In dieser wissenschaftlichen Arbeit erfolgte die immunhistochemische Färbung nach der LSAB-Methode. Bei dieser Methode bindet zunächst ein Primärantikörper spezifisch an das zu untersuchende Antigen. Danach wird ein biotinylierter Sekundärantikörper hinzugegeben, der an den Primärantikörper bindet. Im weiteren Verlauf kommt enzymmarkiertes, in diesem Fall mit HRP (Meerrettich-Peroxidase) konjugiertes Streptavidin hinzu, welches gegen das Biotin des Sekundärantikörpers gerichtet ist. Es kommt zu einer Enzym-Substrat-Reaktion zwischen Streptavidin und Biotin (Hantschke und Palmedo, 2016). Das Enzym HRP ermöglicht dabei die Substraterkennung mit einem Chromogen. Wird nun ein bestimmtes Chromogen, in diesem Fall 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), hinzugegeben, entsteht durch Präzipitation des DAB eine spezifische braune Färbung des Gewebes. Die braune Farbe ist ggf. schon makroskopisch, sonst nur unter einem Lichtmikroskop erkennbar und markiert das Vorhandensein von dem jeweiligen Antigen (Lang, 2013). Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der in dieser wissenschaftlichen Arbeit angewandten LSAB-Methode zur Färbung von Tumorgewebe des Pankreaskopf- und Cholangiokarzinoms sowie Normalgewebe des Pankreaskopfes und der Gallengänge erläutert.

Vor Beginn der Färbung wurden die Objektträger aus dem Kühlschrank geholt und zum Trocknen 10 Minuten unter einen Abzug gelegt. Das Gewebe auf dem Objektträger wurde dann mit einem Dako-Pen (Dako S2002) umrandet und die Kryoschnitte für ca. 5 Minuten in TBST-Puffer gelegt.

Nun mussten im ersten Schritt Blockierungslösungen auf das Gewebe aufgetragen werden, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren. Zunächst erfolgte der Peroxidase-Block (zur Blockierung endogener Peroxidasen). Beide Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur mit der Lösung (DAKO 2023) inkubiert. Anschließend wurden die Kryoschnitte in TBST-Puffer abgespült und kräftig horizontal auf Papiertüchern abgeklopft.

Es folgte nun die Applikation der Proteinblockierungslösung (DAKO X0909). Die Inkubation erfolgte auf beiden Gewebeschnitten für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Objektträger wieder mit TBST-Puffer abgespült und auf Papiertüchern abgeklopft.

Bei der LSAB-Methode spielt die Streptavidin-Biotin-Reaktion eine zentrale Rolle, weshalb endogenes Biotin, Biotin-Rezeptoren und Streptavidin-Bindungsstellen blockiert werden müssen. Dafür wurde ein bei 4°C gelagertes Avidin-Biotin-Blockierungs-Kit (life technologies 004303) auf beide Gewebeschnitte der Objektträger aufgetragen. Es besteht aus zwei Lösungen: Lösung A (Avidin) und Lösung B (Biotin). Erst wurde das Gewebe 10 Minuten mit Lösung A, dann 10 Minuten mit Lösung B bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger wieder in TBST-Puffer gespült und kräftig auf einem Papiertuch abgeklopft.

Nun sind endogene Hintergrundreaktionen im Gewebe weitestgehend blockiert worden und die Primärantikörper konnten appliziert werden.

Um die notwendige Verdünnung zu erreichen, wurde der jeweilige Antikörper in einem entsprechenden Verhältnis mit einem Antikörper-Diluenten (ROTH) vermischt. Die Positivkontrolle wurde 45 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert, die Negativkontrolle hingegen 45 Minuten nur mit dem Antikörper-Diluenten. Nach erfolgter Inkubation wurden die Objektträger zweimal für ca. 3 Minuten in TBST-Puffer gewaschen.

Als nächster wichtiger Reaktionsschritt erfolgte die Gabe des biotinylierten Sekundärantikörpers LINK (DAKO K0690). Sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrolle wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Hier erfolgte ein wichtiger Unterschied beim Färbeprotokoll zwischen Tumor- und Normalgewebe. Während der Sekundärantikörper direkt auf das Tumorgewebe aufgetragen werden konnte, musste beim Normalgewebe der Sekundärantikörper vor Applikation auf das Gewebe 1:2 mit TBST-Puffer verdünnt werden. Anschließend wurden die Objektträger zweimal für ca. 3 Minuten in TBST-Puffer gewaschen.

Es erfolgte anschließend die Inkubation der Gewebeschnitte mit Streptavidin-HRP (DAKO K0690) für 20 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Kryoschnitte wieder zweimal für ca. 3 Minuten mit TBST-Puffer gespült.

Der letzte notwendige Schritt der Reaktionskette war die Gabe der Entwicklungslösung (DAKO K3468). Das Kit besteht aus DAB Substrat-Puffer und dem Substrat DAB Chromogen. 1 ml Substrat Puffer und 1 Tropfen Chromogen wurden mittels eines Vortexmischers (Scientific industries, Vortex-Genie 2) gut vermischt und anschließend 1:2 mit TBST-Puffer verdünnt. Nun wurde die Lösung auf die Objektträger aufgetragen. Bei makroskopisch sichtbar leichter Braunfärbung wurde mikroskopiert und bei eindeutiger Farbreaktion die Entwicklung durch Abspülen der Objektträger mit Pufferlösung gestoppt. Die Entwicklung konnte von Sekunden bis Minuten reichen.

Zur Sichtbarmachung der Zellstruktur sowie der Zellmembranen folgte drei Minuten lang die Gegenfärbung der Objektträger mit Mayers Hämotoxylin (A4840) und anschließend eine Abspülung mit lauwarmem Leitungswasser. Nun war die immunhistochemische Färbung beendet und mittels Aquatex (Merck) wurden die Objektträger mit Deckgläschen (R. Langenbrinck GmbH) eingedeckt. Sobald die Objektträger ausreichend getrocknet waren, konnte mit der Lichtmikroskopie (Zeiss, Primo Star) begonnen werden.

3.2.3 Fotografieren des Gewebes

Um die mikroskopischen Präparate in dieser wissenschaftlichen Arbeit mit einer Software zur Analyse biologischer Proben auszuwerten, wurden digitale Bilder der Gewebeschnitte erstellt. Mit Hilfe eines Keyence-Mikroskops (Biorevo BZ-9000) wurden alle Gewebeschnitte sowohl des Tumor- als auch des Normalgewebes abfotografiert und als digitale jpg-Dateien gespeichert. Dabei wurde mit 200facher Vergrößerung, Weißabgleich und Phasenkontrast gearbeitet. Von jeder Positiv- und stichprobenmäßig von der Negativkontrolle wurden fünf zufällig ausgewählte Foci des Gewebes fotografiert. So sollte das angefärbte Gewebe möglichst in seiner Ganzheit dargestellt und später ausgewertet werden.

3.2.4 Immunhistochemische Auswertung mit ImageJ

Die Software ImageJ (NIH) ist ein in der Wissenschaft häufig verwendetes Bildanalyse- und -verarbeitungsprogramm. Das Programm bietet eine Vielzahl an Möglichkeiten der Bildanalyse und ist individuell programmierbar. In dieser wissenschaftlichen Arbeit ist mit dem zu ImageJ gehörenden Programm Fiji gearbeitet worden, welches eine Vielzahl an plugins zur Bildanalyse speziell biologischer Proben vereint (Fiji, 2018).

Zunächst wurde eine jpg-Datei ausgewählt und in das Fiji-Programm eingelesen. Der erste Befehl lautete:

Image → Adjust → Color Threshold

Hier konnten der Farbton, die Sättigung und Helligkeit des Bildes individuell eingestellt werden.

Um die Bildanalyse zu vereinfachen, konnte ein Makro geschrieben werden.

Plugins → Macros → Recorder

Als erster Befehl für das Makro wurde die Skalierung für die Bildanalyse festgelegt:

Analyze → Set scale

Der nächste Befehl für das Makro betraf die Analyse der Bildpixel und die Form der zu analysierenden Strukturen:

Analyze → *Analyze particles*

Nun wurde durch den Befehl *Create* das Makro endgültig erstellt.

Zunächst wurde die Gesamtfläche des Bildes in Pixel berechnet. Mittels Adjustierung der Funktionen der Color Threshold konnte die zellfreie Fläche und die Braunfläche in Pixel berechnet werden. Die Braunfärbung in Prozent berechnete sich dann aus der Formel:

$$[\text{Braunfärbung in Pixel}] / [\text{Gesamtfläche in Pixel} - \text{zellfreie Fläche in Pixel}] * 100$$

Somit ergab sich ein Prozentwert für jedes untersuchte Bild. Da von jeder Probe 5 Foci fotografiert worden sind, ergaben sich pro untersuchtes Antigen pro Patient jeweils 5 verschiedene Prozentwerte für die Braunfärbung der Probe. Aus diesen fünf Werten wurde dann ein Mittelwert errechnet. Das Gleiche gilt für die Bewertung der Intensität der Braunfärbung. Der in dieser wissenschaftlichen Arbeit zu errechnende semiquantitativer Score setzte sich folgendermaßen zusammen:

IHC-Score = Prozentsatz angefärbter (positiver) Zellen + Intensität angefärbter (positiver) Zellen

1. Prozentsatz angefärbter (positiver) Zellen: 0-4
 - 0: negativ
 - 1: positive Anfärbung in 1% - 25% der Zellen
 - 2: positive Anfärbung in 26% - 50% der Zellen
 - 3: positive Anfärbung in 51% - 75% der Zellen
 - 4: positive Anfärbung in 76% - 100% der Zellen

2. Intensität angefärbter (positiver) Zellen: 0-3
 - 0: negativ
 - 1: schwach positiv
 - 2: moderat positiv
 - 3: stark positiv

Es folgen in Abbildung 2 beispielhaft Referenzbilder für die einzelnen Intensitäts-Scores.

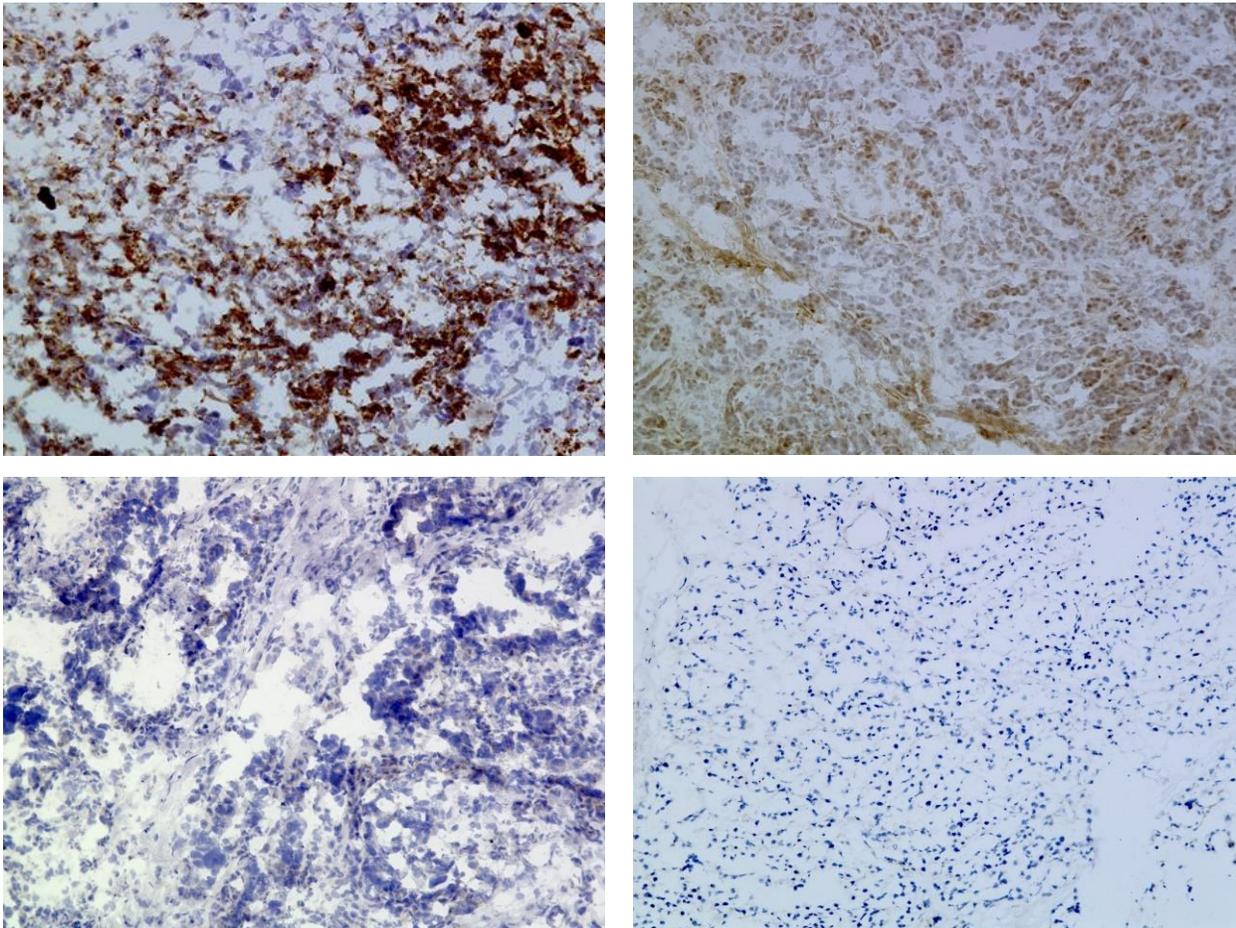


Abbildung 2: Referenzbilder für den Intensitäts-Score: links oben - stark positiv (3), rechts oben - moderat positiv (2), links unten - schwach positiv (1), rechts unten - negativ (0)

Dieser semiquantitative Score wurde für jede Probe sowohl des Tumor- als auch des Normalgewebes berechnet.

3.2.5 Klinische Datenerhebung

Die Erhebung der klinischen Daten des Patientenkollektivs erfolgte hauptsächlich über die Verwendung von SAP und GTDS. Das SAP ist eine elektronische Patientenakte, die in vielen Krankenhäusern verwendet wird. Über den klinischen Arbeitsplatz können hierbei sämtliche Befunde, Laborwerte und Prozeduren nachvollzogen werden. Ein Problem besteht jedoch darin, dass vor allem bei Patienten, die vor dem Jahre 2000 stationär aufgenommen worden sind, mitunter keine oder unvollständige Dokumente im System hinterlegt sind. Dies liegt an einer Umstellung des klinischen Dokumentationssystems mit unvollständiger Archivierung von

Dokumenten vor der Umstellung. Bei diesen Patienten wurde eine Akteneinsicht im Altarchiv der Charité vorgenommen (Papierakten). Mit dem Tumordokumentationssystem GTDS, das umfangreich Daten zum onkologischen Verlauf von Patienten liefert sowie u.a. bereits zu wissenschaftlichen Zwecken genutzt wird, konnten zum Teil fehlende Daten von SAP eruiert und insbesondere Todesdaten oder das Datum des letzten follow-ups ermittelt werden.

Die klinische Datenerhebung konzentrierte sich dabei auf folgende Parameter: Geschlecht, Alter bei Diagnose, Vorhandensein anderer Tumorerkrankungen, TNM-Status und daraus folgend UICC Stadien, das pathologische Grading, Vorhandensein einer Lymphangiosis carcinomatosa und die Überlebenszeit ab dem Zeitpunkt der Diagnose in Tagen.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Datenauswertung in dieser wissenschaftlichen Arbeit erfolgte mit der Software SPSS Version 25.0.

Um festzustellen, ob sich die immunhistochemischen semiquantitativen Scores von Normal- und Tumorgewebe unterscheiden, wurden die Mittelwerte aller Scores für jedes Antigen berechnet und miteinander verglichen. Im nächsten Schritt wurde mittels des Wilcoxon-Tests die Signifikanz des Unterschiedes der IHC-Scores von Tumor- und Normalgewebe für jedes Antigen bestimmt.

Bei den klinischen Parametern Geschlecht, Alter bei Diagnose, Vorhandensein anderer Malignitäten, TNM-Status und daraus folgend UICC Stadien, das pathologische Grading, Vorhandensein einer Lymphangiosis carcinomatosa und die Überlebenszeit ab dem Zeitpunkt der Diagnose in Tagen sowie bei den Differenzen der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe der sechs Antigene wurde mittels des Kruskal-Wallis-Tests die Signifikanz der Unterschiede zwischen den drei Tumorentitäten Pankreaskopf-, extrahepatisches und intrahepatisches Cholangiokarzinom errechnet.

Ferner wurde die Korrelation der klinischen Parameter und der Differenz der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe mit dem Überleben des Patientenkollektivs zum einen tumorentitätenübergreifend und zum anderen für jede Tumorentität einzeln betrachtet. Jeder Sprung in den Überlebenszeitkurven steht für einen Todeszeitpunkt eines Patienten und die zensierten Fälle entstehen dadurch, dass die Patienten entweder noch am Leben sind oder die Todeszeitpunkte in den hier verfügbaren Datenbanken nicht verzeichnet waren. Statistisch wird mittels des Log Rank (Mantel-Cox) Test berechnet, ob mindestens ein Parameter (klinischer Parameter oder Differenz der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe) zu einem längeren oder kürzeren Überleben führt als die anderen Parameter. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0.05$ wird angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Vergleich des Notch-Signalweges im Tumor- und Normalgewebe

Die erste zentrale Fragestellung dieser Arbeit lautet, ob der Notch-Signalweg in den drei Tumorentitäten unterschiedlich stark ausgeprägt ist und ein Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben besteht. Daher erfolgte eine immunhistochemische Anfärbung wichtiger Signalproteine des Notch-Signalweges sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe.

In der Abbildung 3 ist die Verteilung der IHC-Scores der sechs Antigene für das Normalgewebe (N) und in der Abbildung 4 für das Tumorgewebe (T) in Form eines Boxplot-Diagramms dargestellt.

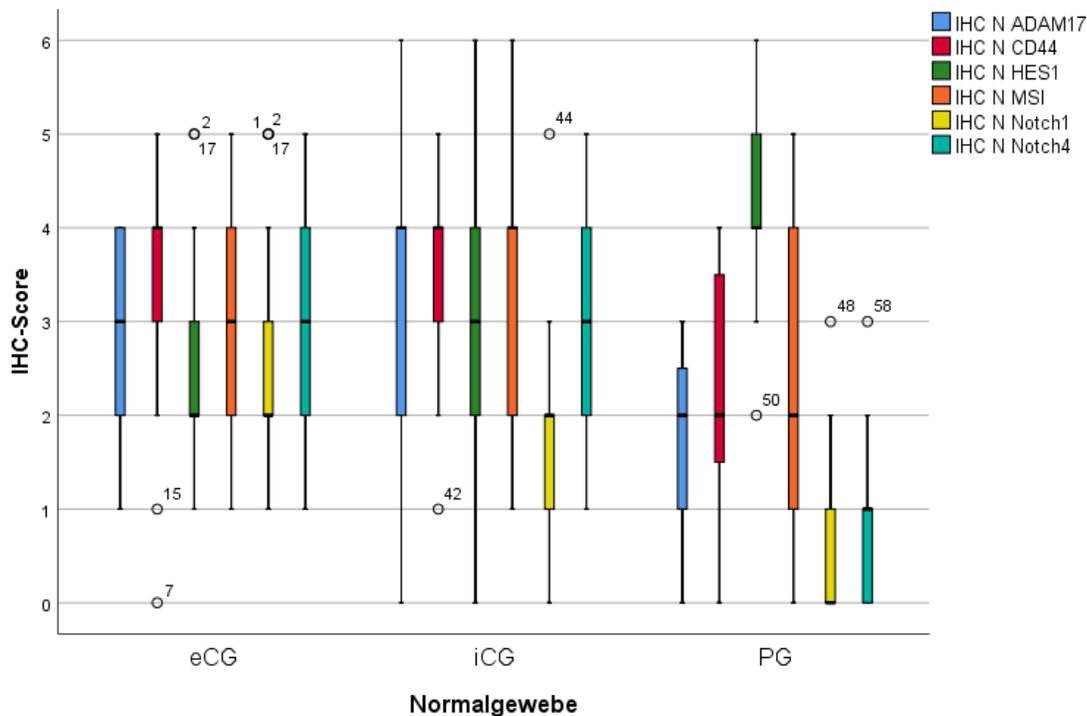


Abbildung 3: Verteilung der IHC-Scores im Normalgewebe

N=Normalgewebe, *IHC*=Immunhistochemischer Score, *eCG*=extrahepatisches Cholangiogewebe, *iCG*=intrahepatisches Cholangiogewebe, *PG*=Pankreasgewebe

Die Boxen repräsentieren für die jeweiligen Tumorentitäten den IHC-Score-Bereich, in dem die mittleren 50% der Scores liegen. Die dicke horizontale Linie steht für das 50%-Perzentil. Die obere bzw. untere Grenze der Box steht jeweils für das 75%- bzw. 25%-Perzentil der IHC-Scores des jeweiligen Normal- bzw. Tumorgewebes. Die dünnen Querstriche der Boxen („Whiskers“)

markieren den jeweils niedrigsten bzw. höchsten IHC-Score in der jeweiligen Entität, ohne dass der Score als Ausreißer gewertet wird. Die runden Kreise stellen Ausreißerwerte dar. Im Programm SPSS sind sie durch einen 1,5-fachen Abstand über- oder unterhalb zur Box, also den mittleren 50% der IHC-Scores, gekennzeichnet (Brosius, 2011). Die Ausreißer sind dennoch in die statistische Wertung eingeflossen.

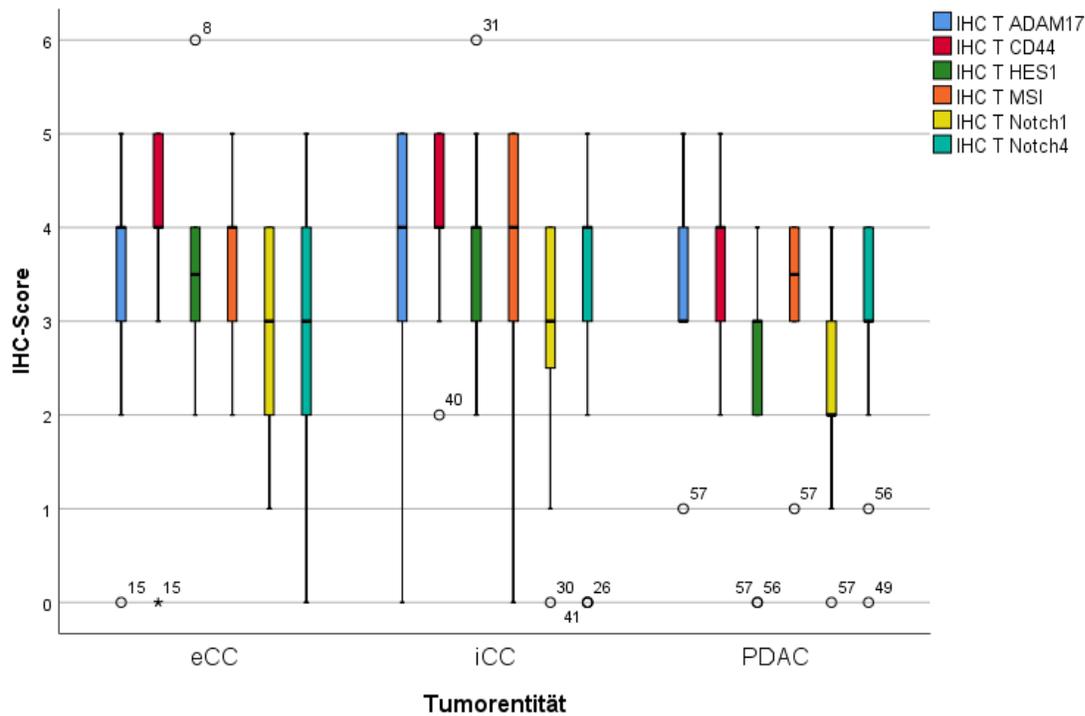


Abbildung 4: Verteilung der IHC-Scores im Tumorgewebe

T=Tumorgewebe, IHC=Immunhistochemischer Score, eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, PDAC=Pankreaskarzinom

Es folgen für jedes Antigen beispielhaft in den Abbildungen 5 bis 16 Aufnahmen vom Normal- und vom Tumorgewebe.

1. ADAM17:

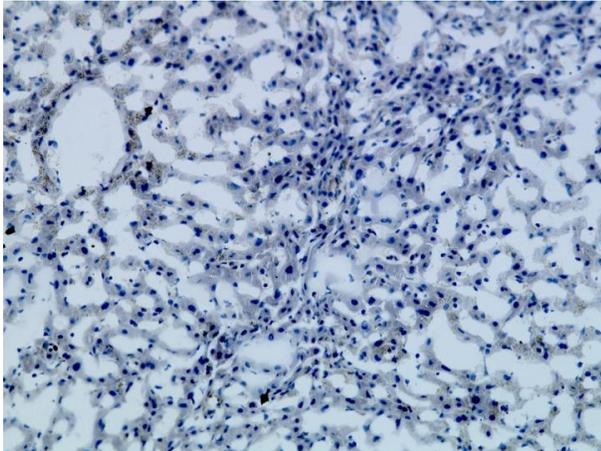


Abbildung 5: ADAM17-Färbung der Zellmembranen und des Zytoplasmas extrahepatischer Gallengänge im Normalgewebe (200x Vergrößerung)

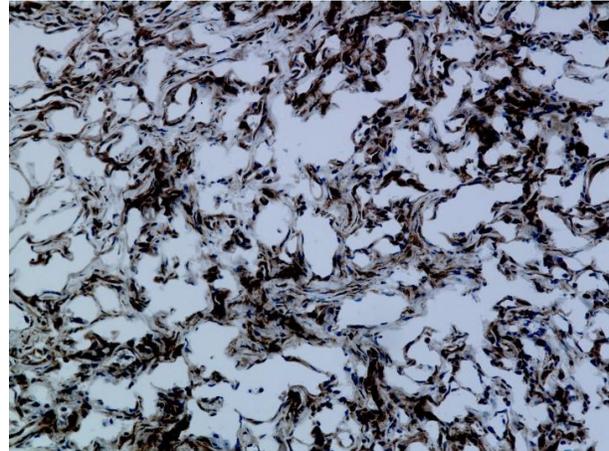


Abbildung 6: ADAM17-Färbung der Zellmembranen und des Zytoplasmas im extrahepatischen Cholangiokarzinom (200x Vergrößerung)

2. CD44:

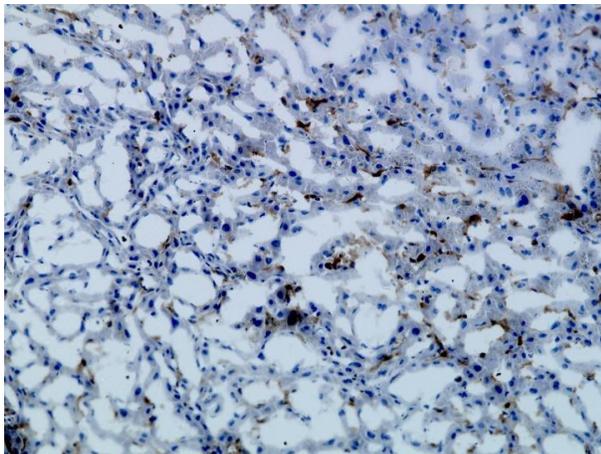


Abbildung 7: CD44-Färbung der Zellmembranen und des Zytoplasmas extrahepatischer Gallengänge im Normalgewebe (200x Vergrößerung)

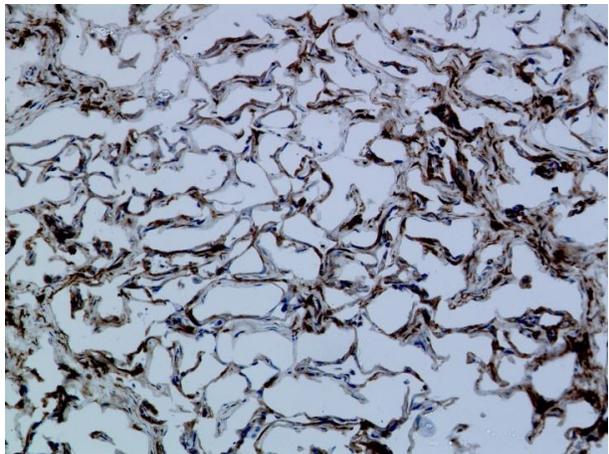


Abbildung 8: CD44-Färbung der Zellmembranen und des Zytoplasmas im extrahepatischen Cholangiokarzinom (200x Vergrößerung)

3. HES1:

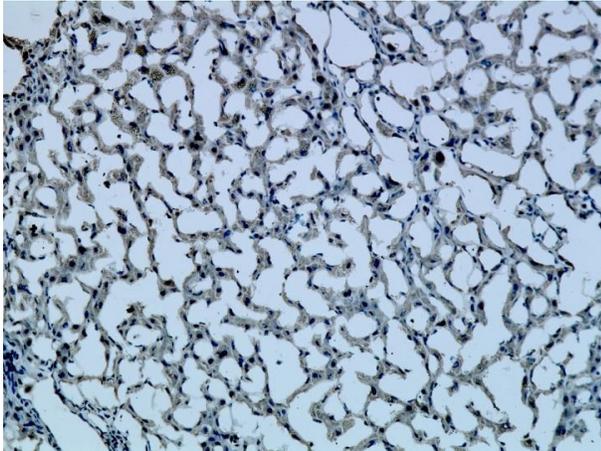


Abbildung 9: HES1-Färbung der Zellkerne und des Zytoplasmas intrahepatischer Gallengänge im Normalgewebe (200x Vergrößerung)

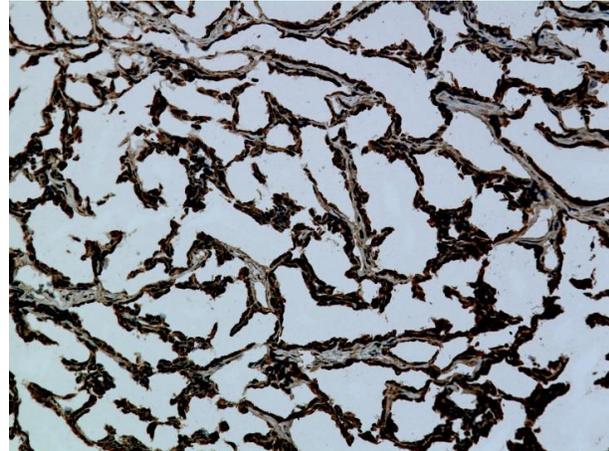


Abbildung 10: HES1-Färbung der Zellkerne und des Zytoplasmas im intrahepatischen Cholangiokarzinom (200x Vergrößerung)

4. MSI:

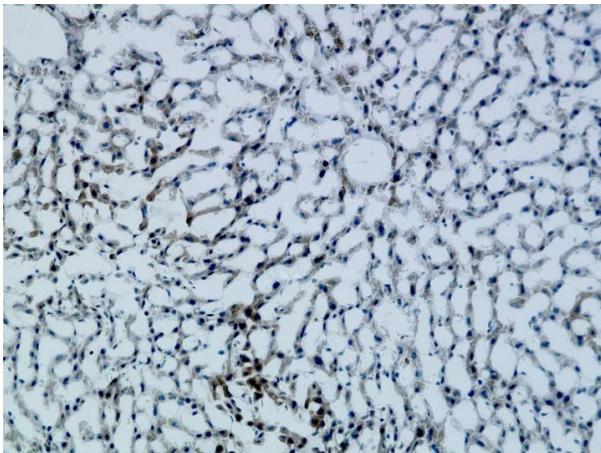


Abbildung 11: MSI-Färbung der Zellkerne und des Zytoplasmas intrahepatischer Gallengänge im Normalgewebe (200x Vergrößerung)

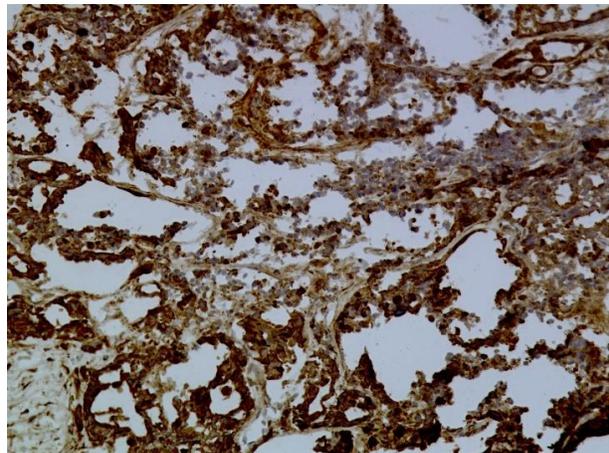


Abbildung 12: MSI-Färbung der Zellkerne und des Zytoplasmas im intrahepatischen Cholangiokarzinom (200x Vergrößerung)

5. Notch1:

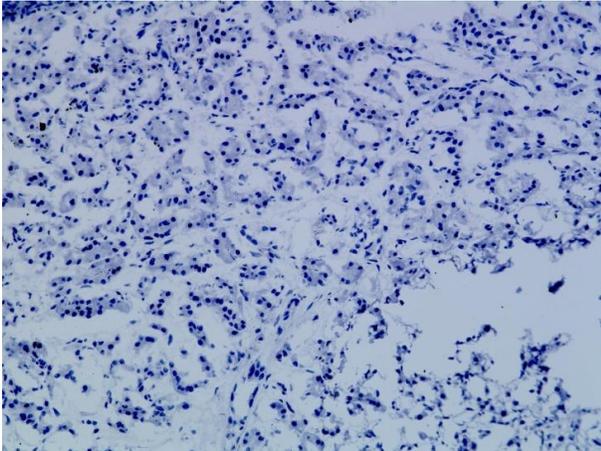


Abbildung 13: Notch1-Färbung des Zytoplasmas des Pankreaskopfes im Normalgewebe (hier keine Färbung erkennbar) (200x Vergrößerung)

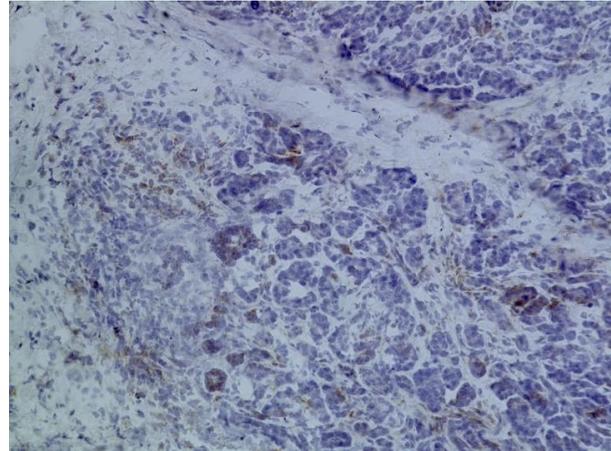


Abbildung 14: Notch1-Färbung des Zytoplasmas im Pankreaskopfkarzinom (200x Vergrößerung)

6. Notch4:

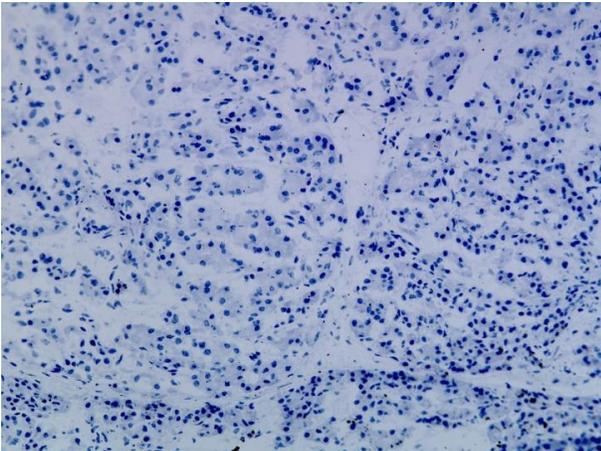


Abbildung 15: Notch4-Färbung des Zytoplasmas des Pankreaskopfes im Normalgewebe (hier keine Färbung erkennbar) (200x Vergrößerung)

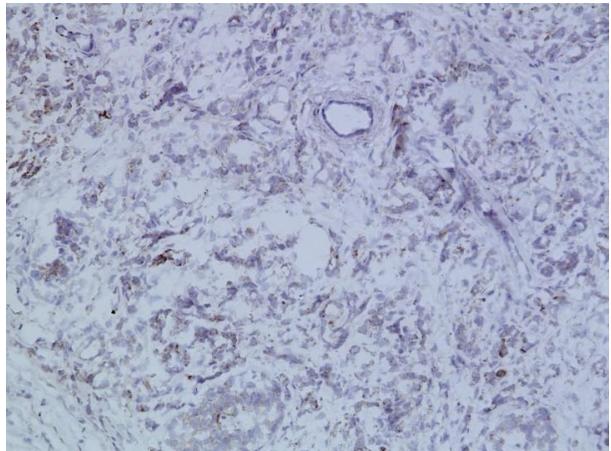


Abbildung 16: Notch4-Färbung des Zytoplasmas im Pankreaskopfkarzinom (200x Vergrößerung)

Tabelle 13 zeigt die Mittelwerte der IHC-Scores für die einzelnen Signalantigene im Normal- und im Tumorgewebe nach Tumorentität sortiert.

Tabelle 13: Vergleich der Mittelwerte der IHC-Scores im Tumor- und Normalgewebe

Normalgewebe / Tumorentität		IHC N ADAM17	IHC T ADAM17	IHC N CD44	IHC T CD44	IHC N HES1	IHC T HES1	IHC N MSI	IHC T MSI	IHC N Notch1	IHC T Notch1	IHC N Notch4	IHC T Notch4
eCG / eCC	Mittelwert	2,95	3,50	3,43	3,94	2,67	3,44	3,10	3,72	2,57	2,83	3,05	2,78
	n	21	18	21	18	21	18	21	18	21	18	21	18
	Std.- Abweichung	1,161	1,200	1,165	1,162	1,197	,984	1,136	,958	1,248	1,150	1,203	1,215
iCG / iCC	Mittelwert	3,17	3,78	3,48	4,04	3,09	3,52	3,30	3,91	1,78	2,87	2,96	3,22
	n	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	Std.- Abweichung	1,775	1,204	,994	,825	1,535	1,039	1,329	1,345	1,043	1,100	1,186	1,536
PG / PDAC	Mittelwert	1,73	3,43	2,27	3,64	4,27	2,50	2,55	3,36	,64	2,21	,91	2,86
	n	11	14	11	14	11	14	11	14	11	14	11	14
	Std.- Abweichung	1,009	1,016	1,489	,929	1,104	1,225	1,916	,842	1,027	1,051	,944	1,167
Insgesamt	Mittelwert	2,80	3,60	3,22	3,91	3,16	3,24	3,07	3,71	1,85	2,69	2,58	2,98
	n	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55
	Std.- Abweichung	1,508	1,148	1,243	,967	1,437	1,138	1,399	1,117	1,311	1,120	1,410	1,340

eCG=extrahepatisches Cholangiogewebe, eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, iCG=intrahepatisches Cholangiogewebe, iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, PG=Pankreasgewebe, PDAC=Pankreaskarzinom, n=Anzahl der Proben, Std.-Abweichung=Standard-Abweichung, IHC N=IHC-Score Normalgewebe, IHC T=IHC-Score Tumorgewebe

Werden die Mittelwerte der IHC-Scores der einzelnen Antigene miteinander verglichen, so sind bei einer tumorentitätenübergreifenden Betrachtung die Mittelwerte im Tumorgewebe immer höher als im Normalgewebe. Dies lässt darauf schließen, dass im Tumorgewebe überwiegend eine höhere Expression der Signalproteine vorliegt.

Mittels des Wilcoxon-Tests wird im nächsten Schritt untersucht, ob die Unterschiede der IHC-Scores zwischen Tumor- und Normalgewebe statistisch signifikant sind, s. Tabelle 14.

Tabelle 14: Signifikanz der Unterschiede der IHC-Scores im Normal- und Tumorgewebe

Normalgewebe / Tumorentität	IHC N ADAM17 / IHC T ADAM17	IHC N CD44 / IHC T CD44	IHC N HES1 / IHC T HES1	IHC N MSI / IHC T MSI	IHC N Notch1 / IHC T Notch1	IHC N Notch4 / IHC T Notch4
eCG / eCC Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,114	,032	,064	,088	,452	,591
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,142	,043	,062	,100	,472	,629
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,071	,021	,031	,050	,236	,314
Punkt- Wahrscheinlichkeit	,021	,015	,005	,013	,021	,026
iCG / iCC Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,148	,022	,286	,112	,001	,149
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,164	,026	,299	,122	,000	,155
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,082	,013	,149	,061	,000	,078
Punkt- Wahrscheinlichkeit	,013	,008	,006	,008	,000	,004
PG / PDAC Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,011	,011	,011	,084	,010	,009
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,008	,012	,012	,125	,012	,008
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,004	,006	,006	,063	,006	,004
Punkt- Wahrscheinlichkeit	,004	,005	,005	,039	,004	,003

Wilcoxon-Test

eCG= extrahepatisches Cholangiogewebe, eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, iCG=intrahepatisches Cholangiogewebe, iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, PG=Pankreasgewebe, PDAC=Pankreaskarzinom, IHC N=IHC-Score Normalgewebe, IHC T=IHC-Score Tumorgewebe, fett: statistisch signifikant

Es wird hierbei die exakte 2-seitige Signifikanz betrachtet. Die exakte Signifikanz wird in diesem Fall herangezogen, da unabhängig von der Fallzahlgröße sowie möglicher Unausgewogenheit der Daten eine zuverlässige statistische Aussage getätigt werden kann, 2-seitig wegen einer ungerichteten Hypothese. Hierbei wird ein Signifikanzniveau von $p \leq 0.05$ angenommen.

In der Gruppe der extrahepatischen Cholangiokarzinome ist der Unterschied der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe für das Antigen CD44 ($p=0,043$) statistisch signifikant. Für die intrahepatischen Cholangiokarzinome besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe bei den Antigenen CD44 ($p=0,026$) und Notch1 ($p<0,001$) und bei den Pankreaskopfkarzinomen bei ADAM17 ($p=0,008$), CD44 ($p=0,012$), HES1 ($p=0,012$), Notch1 ($p=0,012$) und Notch4 ($p=0,008$).

4.2 Vergleich der klinischen Parameter und der Antigen-Expressionen in den drei Tumorentitäten

In dieser Arbeit soll ferner untersucht werden, inwiefern sich die drei Tumorentitäten hinsichtlich klinischer Parameter und Expressionsmuster der Antigene des Notch-Signalweges unterscheiden.

Es folgt in Tabelle 15 eine Übersicht der klinischen Parameter des Patientenkollektivs. Einige klinische Parameter (u.a. Geschlecht, Vorhandensein anderer Malignitäten, TNM-Status und daraus folgend UICC Stadien, das pathologische Grading und Vorliegen einer Lymphangiosis carcinomatosa) wurden innerhalb der drei Tumorentitäten verglichen und die statistische Signifikanz dieser Unterschiede ermittelt.

Tabelle 15: Übersicht über klinische Parameter und statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den drei Tumorentitäten

Klinische Parameter	eCC (n=22)	iCC (n=24)	PDAC (n=14)	p-Wert
Geschlecht				0,170
weiblich	13 (59%)	19 (79%)	7 (50%)	
männlich	9 (41%)	5 (21%)	7 (50%)	
Durchschnitt Alter bei Diagnose (Altersspanne)	62,8 (46-83)	64,3 (39-79)	60,1 (43-80)	0,524
Durchschnittliche Überlebenstage	404	863	613	0,658
Andere Malignitäten				0,136
ja	2 (9%)	7 (29%)	1 (7%)	
nein	20 (91%)	17 (71%)	13 (93%)	
UICC				0,638
UICC I-IB	1 (5%)	5 (21%)	0 (0%)	
UICC II-IIB	8 (36%)	5 (21%)	10 (71%)	
UICC III-IIIb	9 (41%)	2 (8%)	0 (0%)	
UICC IV-IVb	4 (18%)	12 (50%)	4 (19%)	
T				0,011
T1	2 (9%)	8 (33%)	1 (7%)	
T2	8 (36%)	7 (29%)	0 (0%)	
T3	10 (45%)	7 (29%)	12 (86%)	
T4	2 (9%)	1 (4%)	0 (0%)	
N				0,060
N0	9 (41%)	14 (58%)	3 (21%)	
N1	11 (50%)	8 (33%)	10 (71%)	
N2	2 (9%)	0 (0%)	0 (0%)	
M				0,289
M0	20 (91%)	19 (79%)	9 (64%)	
M1	2 (9%)	5 (21%)	4 (29%)	
G				0,478
G0	2 (9%)	0 (0%)	0 (0%)	
G1	1 (5%)	1 (4%)	0 (0%)	
G2	13 (59%)	16 (67%)	8 (57%)	
G3	6 (27%)	5 (21%)	5 (36%)	
LC				0,024
ja	9 (41%)	8 (33%)	11 (79%)	
nein	13 (59%)	16 (67%)	3 (21%)	

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, PDAC=Pankreaskarzinom, UICC= Tumor-Klassifikationssystem, T=Tumorausdehnung, N=Lymphknotenbefall, M=Fernmetastasen, G=Grading, LC=Lymphangiosis carcinomatosa, n=Anzahl der Proben, fett: statistisch signifikant

Im Folgenden werden diejenigen klinischen Parameter dargestellt, bei denen ein statistisch signifikanter Unterschied mittels des Kruskal-Wallis-Tests ermittelt worden ist.

4.2.1 Vergleich der klinischen Parameter in den drei Tumorentitäten

4.2.1.1 Vergleich der T-Stadien in den Tumorentitäten

Zunächst erfolgt in der Abbildung 17 eine Übersicht der Tumorausdehnungen in den entsprechenden Tumorentitäten.

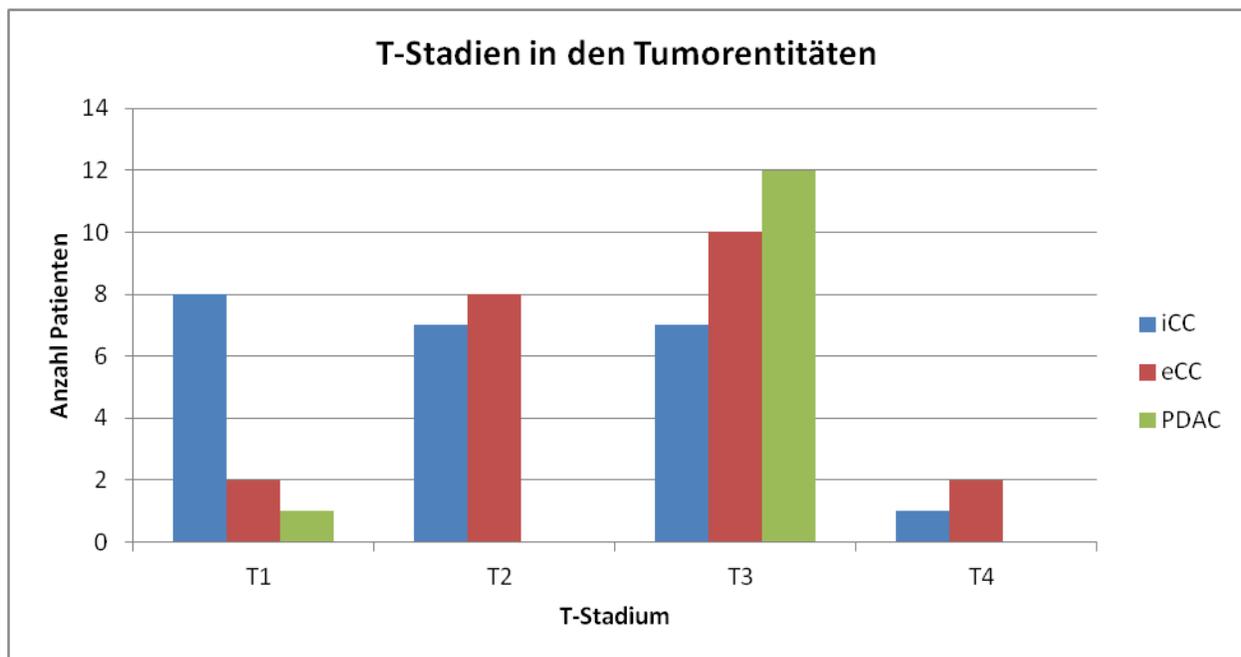


Abbildung 17: T-Stadien in den Tumorentitäten

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, *eCC*=extrahepatisches Cholangiokarzinom, *PDAC*=Pankreaskarzinom

Um bestimmte klinische Parameter innerhalb der drei Tumorentitäten zu vergleichen, wurde der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Prinzipiell kann mit diesem Test bestimmt werden, ob sich zentrale Tendenzen der klinischen Parameter innerhalb der Entitäten (eCC, iCC, PDAC) unterscheiden. Dabei wird nicht mit den richtigen Daten bspw. dem entsprechenden T-Stadium (pT) gerechnet, sondern es werden Ränge gebildet. Das heißt, dass die Daten (z.B. das T-Stadium) zunächst gruppenübergreifend (nach Tumorentität) gemäß ihrer Größe (vom niedrigsten zum höchsten ansteigend) aufgereiht und anschließend für jede Gruppe einzeln von 1 ausgehend rangiert werden. Die Ränge werden dann für jede Tumorentität aufaddiert. Dadurch entsteht eine Rangsumme für jede Tumorentität. Wird diese Rangsumme durch die Gruppengröße geteilt,

entsteht der mittlere Rang. Anschließend kann die jeweilige Signifikanz berechnet werden. (Universität Zürich, 2018).

In der Tabelle 16 ist neben der Auflistung der mittleren Ränge die Signifikanz der innerhalb der drei Tumorentitäten vorliegenden pathologisch ermittelten Tumorausdehnungen (pT) dargestellt. Der p-Wert von $p=0,011$ (exakte Signifikanz) zeigt, dass sich die pT-Werte innerhalb der drei Tumorentitäten statistisch signifikant unterscheiden.

Tabelle 16: Kruskal-Wallis-Test der Tumorausdehnungen in den drei Tumorentitäten

Klinischer Parameter	Tumorentität	n	Mittlerer Rang
pT	eCC	22	31,27
	iCC	23	22,83
	PDAC	13	38,31
	Gesamt	58	

Asymptotische Signifikanz	,013
Exakte Signifikanz	,011
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000

pT=pathologische Tumorausdehnung. eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, PDAC=Pankreaskarzinom, n=Anzahl der Proben

4.2.1.2 Vergleich der Lymphangiosis carcinomatosa in den Tumorentitäten

Es folgt eine Übersicht in Abbildung 18 über das Vorhandensein einer Lymphangiosis carcinomatosa in den jeweiligen Tumorentitäten.

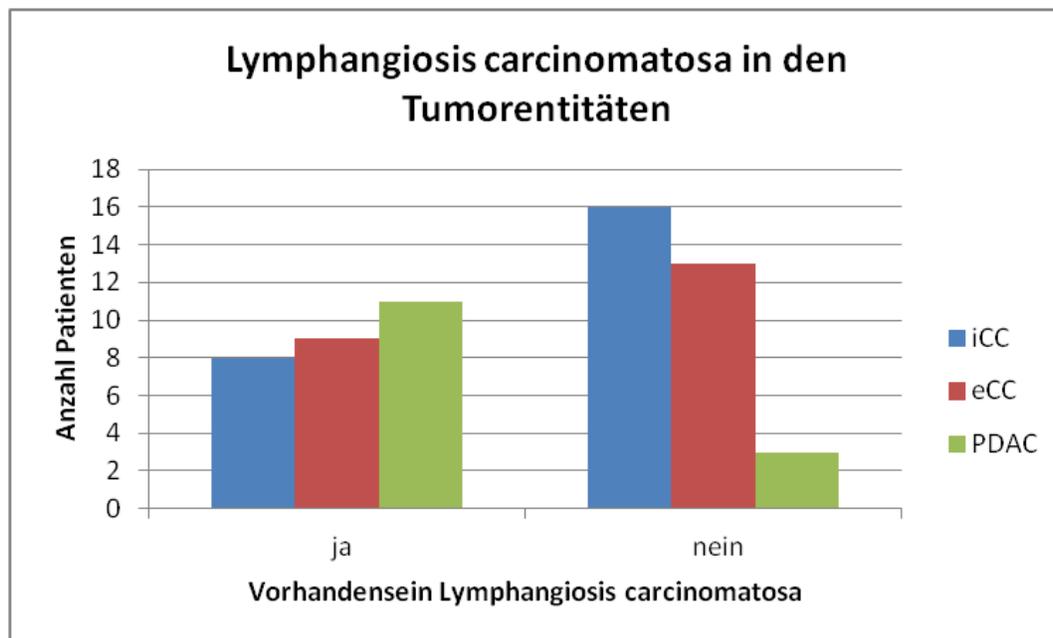


Abbildung 18: Lymphangiosis carcinomatosa in den Tumorentitäten

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, PDAC=Pankreaskarzinom

Auch das Vorhandensein bzw. nicht Vorhandensein einer Lymphangiosis carcinomatosa (LC) innerhalb der drei Tumorentitäten ist statistisch signifikant ($p=0,024$), s. Tabelle 17.

Tabelle 17: Kruskal-Wallis-Test der Lymphangiosis carcinomatosa in den drei Tumorentitäten

Klinischer Parameter	Tumorentität	n	Mittlerer Rang
LC	eCC	22	28,77
	iCC	24	26,50
	PDAC	14	40,07
	Gesamt	60	

Asymptotische Signifikanz	,022
Exakte Signifikanz	,024
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,003

LC=Lymphangiosis carcinomatosa, eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, PDAC=Pankreaskarzinom, n=Anzahl der Proben

4.2.2 Vergleich der Antigen-Expressionen in den drei Tumorentitäten

Die zentrale Frage in dieser Arbeit lautet, ob eine vermehrte bzw. verminderte Expression von wichtigen Antigenen des Notch-Signalwegs einen Einfluss auf das Patientenüberleben hat. Die Differenz der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe ist für eine Aussage über die Aktivität des Notch-Signalwegs in den Tumorentitäten dabei entscheidend. Es ist wichtig zu wissen, wie sich die Antigenexpression im Normal- und im Tumorgewebe im Vergleich verhält. Beispielsweise ist es möglich, dass man eine hohe Antigenexpression in einem bestimmten Tumorgewebe vorfindet und diese mit einem negativen Einfluss auf das Patientenüberleben korreliert. Doch findet man auch eine hohe Antigenexpression im entsprechenden Normalgewebe, so gibt es keinen direkten Zusammenhang mehr zwischen Antigenexpression im Tumorgewebe und Patientenüberleben. Absolute Werte einer Antigenexpression in einem Tumorgewebe allein sind nicht aussagekräftig. Erst wenn man z.B. eine niedrige Antigenexpression im Normal- und eine hohe im Tumorgewebe nachweist, kann man einen potentiellen Zusammenhang zwischen Antigenexpression im Tumorgewebe und Patientenüberleben herstellen. Die Antigenexpression in dem Normalgewebe gilt demnach als Referenz. Für jede Tumorentität wurden drei Gruppen gebildet: Eine Gruppe von Patienten mit mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe (mehr). Eine Gruppe mit genauso viel Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe (gleich) und eine Gruppe mit weniger Antigenexpression im Tumorgewebe (weniger). Im Folgenden werden die Differenzgruppen der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe dargestellt, bei denen sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Tumorgruppen zeigt.

4.2.2.1 Vergleich der HES1 Expression in den Tumorentitäten

Zunächst erfolgt in der Abbildung 19 eine Übersicht der Differenzen der IHC-Scores von Tumor- und Normalgewebe für HES1.

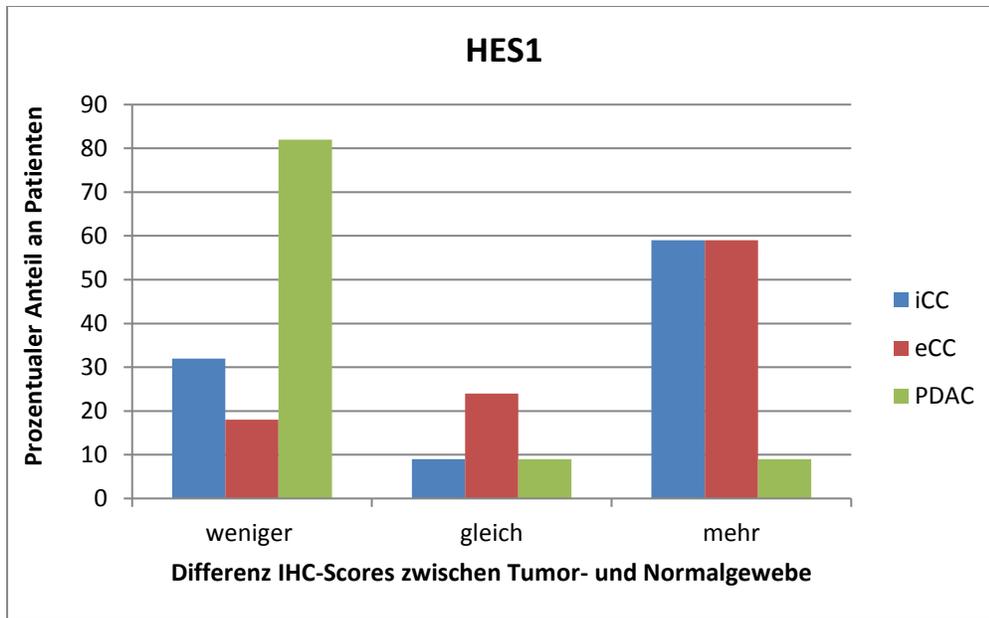


Abbildung 19: Differenz der IHC-Scores zwischen Tumor und Normalgewebe für das Antigen HES1

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, PDAC=Pankreaskarzinom

In der Tabelle 18 wird dargestellt, dass sich die Differenzen der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe für das Antigen HES1 statistisch signifikant unterscheiden. Auch hier wird die exakte Signifikanz betrachtet ($p=0,003$).

Tabelle 18: Kruskal-Wallis-Test der Differenzgruppen der IHC-Scores von HES1 in Tumor- zu Normalgewebe in den drei Tumorentitäten

	Tumorentität	n	Mittlerer Rang
Differenz IHC-Scores Tumor- und Normalgewebe für HES1 (Differenzgruppe)	eCC	17	29,82
	iCC	22	28,02
	PDAC	11	13,77
	Gesamt	50	

Asymptotische Signifikanz	,004
Exakte Signifikanz	,003
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, PDAC=Pankreaskarzinom, n=Anzahl der Proben

4.2.2.2 Vergleich der Notch4 Expression in den Tumorentitäten

In Abbildung 20 wird nochmal eine Übersicht über die Differenzen der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe für das Antigen Notch4 dargestellt.

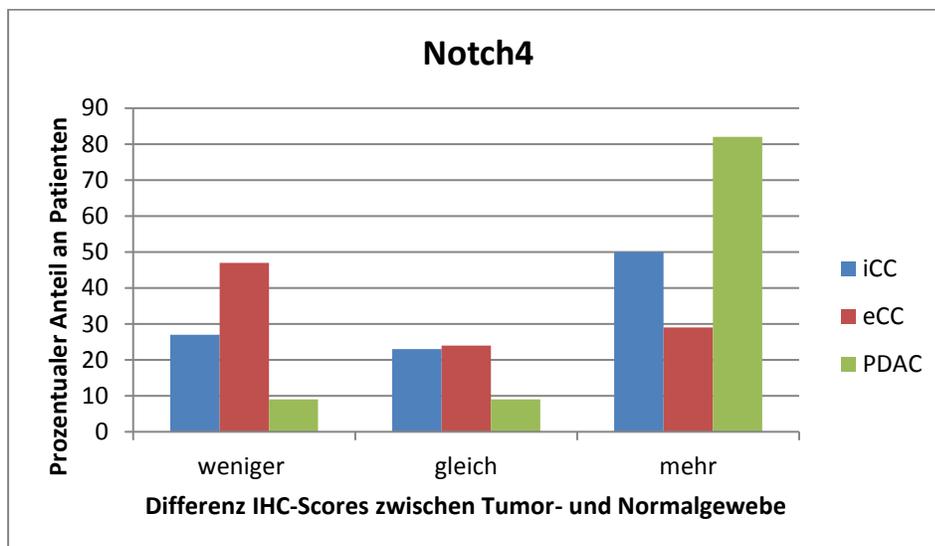


Abbildung 20: Differenz der IHC-Scores zwischen Tumor und Normalgewebe für das Antigen Notch4

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, *eCC*=extrahepatisches Cholangiokarzinom, *PDAC*=Pankreaskarzinom

Auch für das Antigen Notch4 zeigen sich zwischen extra- und intrahepatischen sowie Pankreaskarzinomen statistisch signifikante Differenzen der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe ($p=0,024$), s. Tabelle 19.

Tabelle 19: Kruskal-Wallis-Test der Differenzgruppen der IHC-Scores von Notch4 in Tumor- zu Normalgewebe in den drei Tumorentitäten

	Tumorentität	n	Mittlerer Rang
Differenz IHC-Scores Tumor- und Normalgewebe für Notch4 (Differenzgruppe)	eCC	17	19,76
	iCC	22	25,84
	PDAC	11	33,68
	Gesamt	50	
Asymptotische Signifikanz			,026
Exakte Signifikanz			,024
Punkt-Wahrscheinlichkeit			,000

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, *iCC*=intrahepatisches Cholangiokarzinom, *PDAC*=Pankreaskarzinom, *n*=Anzahl der Proben

4.2.2.3 Übersicht der Differenzen der Antigen-Expressionen im Tumor- und Normalgewebe

Es folgt eine Tabellenübersicht (s. Tabelle 20) über die Differenzen der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe in den jeweiligen Tumorentitäten mit dem entsprechenden p-Wert, der angibt, ob sich die Antigenexpressionen in den drei Tumorentitäten statistisch signifikant unterscheiden.

Tabelle 20: Übersicht über Differenzengruppen der IHC-Scores zwischen Tumor- und Normalgewebe und statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den drei Tumorentitäten

Antigene	Differenz IHC-Score Tumor- und Normalgewebe eCC (n=17)		Differenz IHC-Score Tumor- und Normalgewebe iCC (n=22)		Differenz IHC-Score Tumor- und Normalgewebe PDAC (n=11)		p-Wert
ADAM17	weniger	24%	weniger	32%	weniger	0%	0,254
	gleich	24%	gleich	18%	gleich	27%	
	mehr	53%	mehr	50%	mehr	73%	
CD44	weniger	12%	weniger	18%	weniger	9%	0,250
	gleich	41%	gleich	27%	gleich	9%	
	mehr	47%	mehr	55%	mehr	82%	
HES1	weniger	18%	weniger	32%	weniger	82%	0,003
	gleich	24%	gleich	9%	gleich	9%	
	mehr	59%	mehr	59%	mehr	9%	
MSI	weniger	29%	weniger	32%	weniger	18%	0,996
	gleich	12%	gleich	9%	gleich	27%	
	mehr	59%	mehr	59%	mehr	55%	
Notch1	weniger	29%	weniger	14%	weniger	9%	0,079
	gleich	24%	gleich	5%	gleich	18%	
	mehr	47%	mehr	82%	mehr	73%	
Notch4	weniger	47%	weniger	27%	weniger	9%	0,024
	gleich	24%	gleich	23%	gleich	9%	
	mehr	29%	mehr	50%	mehr	82%	

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, PDAC=Pankreaskarzinom, n=Anzahl der Proben, fett: statistisch signifikant

4.3 Korrelation klinischer Daten und Antigen-Expressionen mit dem Patientenüberleben

Eine weitere Fragestellung in dieser wissenschaftlichen Arbeit lautet, inwiefern die klinischen Parameter und Antigen-Expressionslevel in diesem Patientenkollektiv Einfluss auf das Patientenüberleben haben.

Tabelle 21 zeigt eine Übersicht über die klinischen Parameter und Differenzgruppen der Antigene (Differenz IHC-Score von Tumor- und Normalgewebe) mit Angabe der statistischen Signifikanz der Überlebenszeitkurven tumorentitätenübergreifend und in Tabelle 22 für jede Tumorentität einzeln.

Tabelle 21: Übersicht über die statistische Signifikanz der Kaplan-Meier-Kurven der klinischen Parameter und Antigen-Expressionen tumorentitätenübergreifend

Parameter	Alle Tumorentitäten (eCC, iCC, PDAC)
Geschlecht	p=0,431
Vorhandensein weiterer Malignitäten	p=0,486
UICC	p=0,150
pT	p=0,249
pN	p=0,319
pM	p=0,134
pG	p=0,017
LC	p=0,461
Differenzgruppe ADAM17	p=0,662
Differenzgruppe CD44	p=0,969
Differenzgruppe HES1	p=0,204
Differenzgruppe MSI	p=0,475
Differenzgruppe Notch1	p=0,162
Differenzgruppe Notch4	p=0,743

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, PDAC=Pankreaskarzinom, UICC=Tumorklassifikationssystem, pT=pathologische Tumorausdehnung, pN=pathologischer Lymphknotenbefall, pM=pathologische Fernmetastasen, pG=pathologisches Grading, LC=Lymphangiosis carcinomatosa, fett: statistisch signifikant

Tabelle 22: Übersicht über die statistische Signifikanz der Kaplan-Meier-Kurven der klinischen Parameter und Antigen-Expressionen für eCC, iCC und PDAC

Parameter	eCC	iCC	PDAC
Geschlecht	p=0,189	p=0,219	p=0,307
Vorhandensein weiterer Malignitäten	p=0,227	p=0,400	p=0,131
UICC	p=0,113	p=0,009	p=0,051
pT	p=0,573	p=0,023	p=0,700
pN	p=0,598	p=0,066	p=0,355
pM	p=0,275	p=0,785	p=0,054
pG	p=0,068	p=0,289	p=0,979
LC	p=0,731	p=0,507	p=0,953
Differenzgruppe ADAM17	p=0,977	p=0,562	p=0,724
Differenzgruppe CD44	p=0,766	p=0,499	p=0,079
Differenzgruppe HES1	p=0,319	p=0,162	p=0,887
Differenzgruppe MSI	p=0,931	p=0,093	p=0,089
Differenzgruppe Notch1	p=0,149	p=0,161	p=0,904
Differenzgruppe Notch4	p=0,614	p=0,925	p=0,079

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom, iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom, PDAC=Pankreaskarzinom, UICC=Tumorklassifikationssystem, pT=pathologische Tumorausdehnung, pN=pathologischer Lymphknotenbefall, pM=pathologische Fernmetastasen, pG=pathologisches Grading, LC=Lymphangiosis carcinomatosa, fett: statistisch signifikant

4.3.1 Korrelation klinischer Daten mit dem Patientenüberleben

Es werden im Folgenden exemplarisch die klinischen Parameter UICC, pathologisch ermitteltes Grading sowie die pathologisch ermittelte Tumorausdehnung präsentiert, bei denen entweder tumorentitätenübergreifend oder für eine Tumorentität einzeln ein statistisch signifikanter Unterschied der Kaplan-Meier-Kurven dargestellt werden konnte.

4.3.1.1 Korrelation UICC-Stadium mit dem Patientenüberleben

4.3.1.1.1 Korrelation UICC-Stadium mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

Als erster klinischer Parameter wird das UICC-Stadium, ein internationales Tumorklassifikationssystem, betrachtet. Beim Vergleich der UICC-Klassifikationen der drei Tumorentitäten miteinander bzw. der einzelnen Tumorentitäten wurden verschiedene UICC-Auflagen (5., 6. und 7.) miteinander verglichen. Dies liegt darin begründet, dass die Proben des Kollektivs über mehr als ein Jahrzehnt gesammelt und die jeweils aktuellen UICC-Versionen von den Pathologen als Klassifikationsgrundlage verwendet worden sind. Beim Vergleich der UICC-Stadien wurden vier Stadien (UICC I-IV) verglichen. Beim Übergang der UICC-Klassifikationen ineinander wurden bis auf z.B. neue Unterteilungen (beispielsweise T1a-b und vorher nur T1) sowie bei manchen Tumorentitäten tatsächlich neue Klassifikationskriterien (z.B. veränderte Größenangaben des Tumors) diese vier Stadien beibehalten. Bei dieser Auswertung geht es v.a. um die Frage, ob beispielweise Patienten im UICC-Stadium IV kürzer als im UICC-Stadium I leben und somit um die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Mortalität, dessen Trend durch die Anwendung verschiedener UICC-Auflagen nicht maßgeblich beeinflusst wird.

In der Tabelle 23 werden die Daten dargestellt, die der in Abbildung 21 dargestellten Kaplan-Meier-Kurve zugrunde liegen. Kum. Überleben steht hierbei für das kumulative Überleben.

In der Tabelle 23 sieht man jeweils, wie viele Patienten aus allen Tumorentitäten zusammen welches UICC-Stadium aufweisen. Dabei wird in der Tabelle nochmal unterschieden zwischen unzensiert und zensiert. Unzensiert sind diejenigen Patienten, deren Todesdatum bekannt ist. Zensiert sind all diejenigen Patienten, die zum Zeitpunkt der Auswertung noch leben oder deren Todeszeitpunkt in den zur Verfügung stehenden Datenbanken nicht verzeichnet waren. Die Prozentzahl der zensierten Fälle bezieht sich darauf, wie viele Patienten für jedes UICC-Stadium von der Gesamtzahl zensiert sind. Für das UICC Stadium IV sind z.B. 5 Patienten zensiert von insgesamt 20 Patienten, was prozentual 25% entspricht. 15 Patienten sind nicht zensiert, was bedeutet, dass von 75% der Patienten im UICC Stadium IV das Todesdatum bekannt ist. Insgesamt sind ca. 42% der Patienten aus allen UICC-Stadien gesamt betrachtet zensiert.

Tabelle 23: Daten für die tumorentitätenübergreifende Korrelation der UICC-Stadien mit dem Patientenüberleben

Tumorentitätenübergreifende UICC-Stadien

UICC	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
I	6	2	4	66,7%
II	23	13	10	43,5%
III	11	5	6	54,5%
IV	20	15	5	25,0%
Gesamt	60	35	25	41,7%

Eine tumorentitätenübergreifende Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben zeigt keine statistisch signifikanten Kaplan-Meier-Kurven ($p=0,150$), s. Tabelle 24.

Tabelle 24: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von UICC-Stadium und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,150

Abbildung 21 zeigt die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben in Monaten.

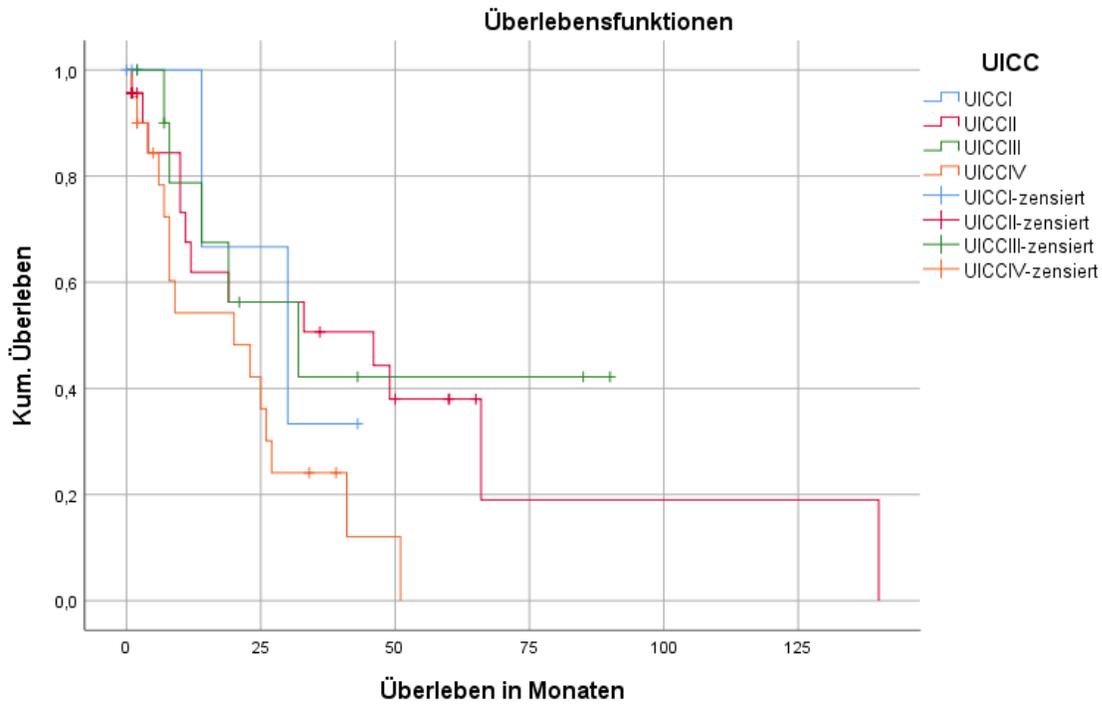


Abbildung 21: Tumorentitätenübergreifende Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben

In der Abbildung 21 wird deutlich, dass Patienten mit einem niedrigen UICC-Stadium, also einem weniger fortgeschrittenem Tumorleiden, länger überleben als Patienten mit einem hohen UICC-Stadium und damit einer weiter ausgedehnten Tumorerkrankung.

4.3.1.1.2 Korrelation UICC-Stadium mit dem Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome

Tabelle 25 zeigt die entsprechenden UICC-Stadien der Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom.

Tabelle 25: Daten für die Korrelation der UICC-Stadien mit dem Patientenüberleben für eCC

UICC für eCC

UICC	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
I	1	1	0	0,0%
II	8	4	4	50,0%
III	9	3	6	66,7%
IV	4	4	0	0,0%
Gesamt	22	12	10	45,5%

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom

In der folgenden Tabelle 26 wird die statistische Signifikanz dargestellt. Die Überlebenszeitkurven unterscheiden sich hierbei nicht statistisch signifikant ($p=0,113$).

Tabelle 26: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von UICC-Stadium und Patientenüberleben für eCC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,113

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom

In Abbildung 22 wird für die Gruppe der extrahepatischen Cholangiokarzinome darauf basierend die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben gezeigt.

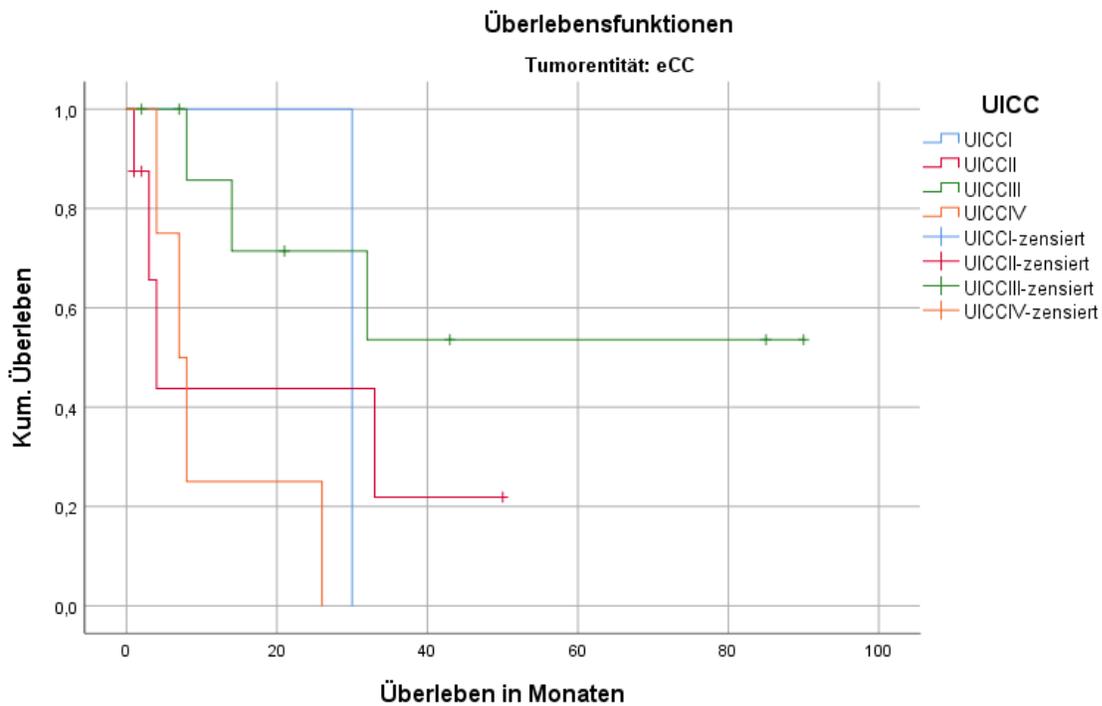


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben für Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom (eCC)

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen, dass Patienten mit einem hohen UICC-Stadium (IV) den kürzesten Überlebenszeitraum aufweisen (n=4). Patienten mit einem UICC Stadium III (n=9) leben in diesen Patientenkollektiv länger als Patienten mit einem UICC Stadium II (n=8).

4.3.1.1.3 Korrelation UICC-Stadium mit dem Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome

Tabelle 27 zeigt, wie viele Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom welches UICC-Stadium aufweisen.

Tabelle 27: Daten für die Korrelation der UICC-Stadien mit dem Patientenüberleben für iCC

UICC-Stadien für iCC

UICC	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
UICCI	5	1	4	80,0%
UICCII	5	2	3	60,0%
UICCIII	2	2	0	0,0%
UICCIIV	12	7	5	41,7%
Gesamt	24	12	12	50,0%

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom

In der folgenden Tabelle 28 wird die statistische Signifikanz dargestellt. Die Überlebenszeitkurven unterscheiden sich hierbei statistisch signifikant ($p=0,009$).

Tabelle 28: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von UICC-Stadium und Patientenüberleben für iCC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,009

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom

Für die Gruppe der intrahepatischen Cholangiokarzinome wird darauf basierend die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben demonstriert, s. Abbildung 23.

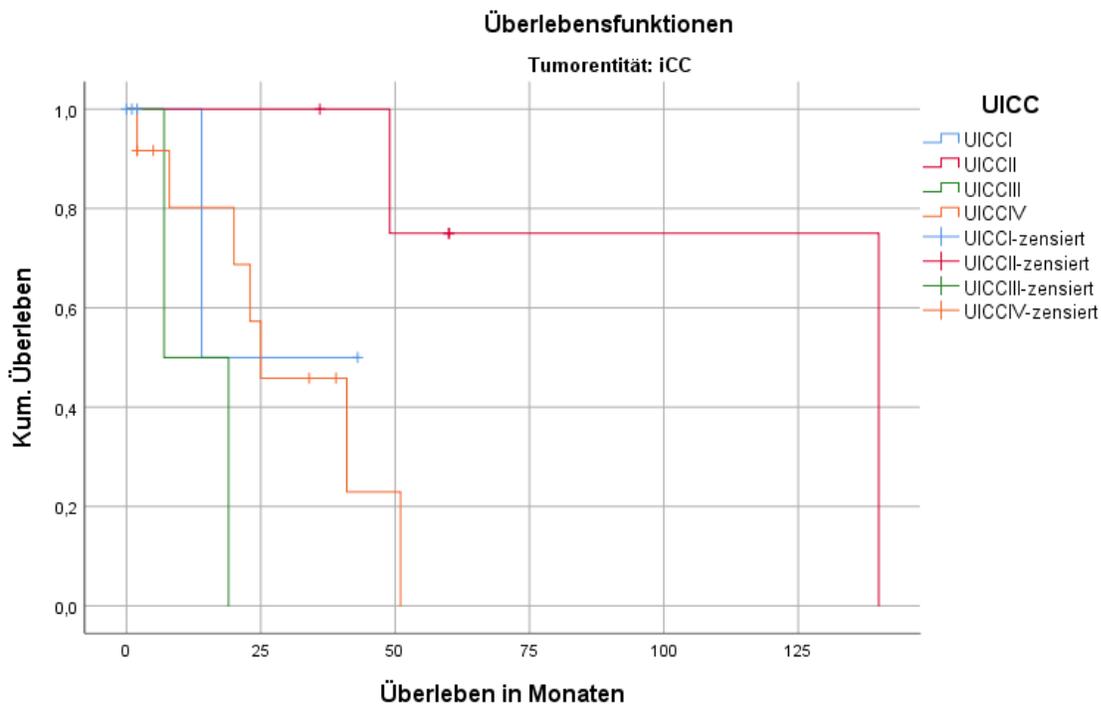


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben für Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom (iCC)

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen, dass die Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom im Stadium UICC II (n=5) am längsten überleben, während die Patienten im Stadium UICC III (n=2) den kürzesten Überlebenszeitraum vorweisen. Von der Fallzahlgröße befinden sich die meisten (n=12) im UICC Stadium IV.

4.3.1.1.4 Korrelation UICC-Stadium mit dem Patientenüberleben für Pankreaskarzinome

Tabelle 29 zeigt das jeweilige UICC-Stadium der Patienten mit Pankreaskarzinom.

Tabelle 29: Daten für die Korrelation der UICC-Stadien mit dem Patientenüberleben für PDAC

UICC-Stadien für PDAC

UICC	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
II	10	7	3	30,0%
IV	4	4	0	0,0%
Gesamt	14	11	3	21,4%

PDAC=Pankreaskarzinom

Die Tabelle 30 zeigt, dass die Überlebenszeitkurven sich statistisch signifikant unterscheiden ($p=0,051$).

Tabelle 30: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von UICC-Stadium und Patientenüberleben für PDAC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,051

PDAC=Pankreaskarzinom

In Abbildung 24 sieht man für die Gruppe der Pankreaskarzinome darauf basierend die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben.

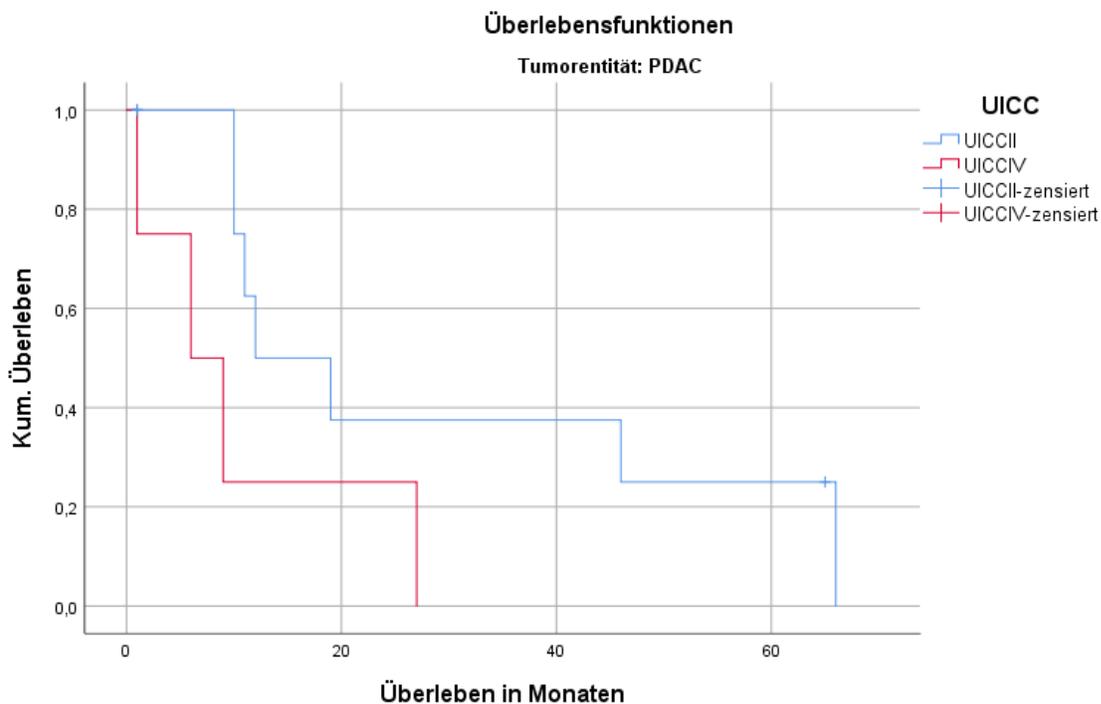


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen UICC-Stadium und Patientenüberleben für Patienten mit Pankreaskarzinom (PDAC)

In diesem Patientenkollektiv weisen alle Patienten entweder ein UICC Stadium II oder IV auf. Aus den Kaplan-Meier-Kurven wird ersichtlich, dass Patienten mit einem höheren UICC-Stadium (UICC IV, n=4) früher versterben als Patienten mit einem niedrigeren UICC-Stadium (UICC II, n=10).

Zusammenfassend konnte für die Gruppe der intrahepatischen Cholangio- und Pankreaskarzinome ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überleben und UICC-Stadium hergestellt werden.

4.3.1.2 Korrelation Grading mit dem Patientenüberleben

4.3.1.2.1 Korrelation Grading mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

Tabelle 31 zeigt, wie viele Patienten aus allen Tumorentitäten welches pathologisch ermittelte Grading aufweisen.

Tabelle 31: Daten für die tumorentitätenübergreifende Korrelation des Gradings mit dem Patientenüberleben

Tumorentitätenübergreifende Gradings

pG	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
0	2	2	0	0,0%
1	2	1	1	50,0%
2	37	15	22	59,5%
3	16	14	2	12,5%
Gesamt	57	32	25	43,9%

pG=pathologisches Grading

In der folgenden Tabelle 32 wird die statistische Signifikanz dargestellt. In diesem Fall besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenszeitkurven ($p=0,017$).

Tabelle 32: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Grading und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,017

Abbildung 25 zeigt eine tumorentitätenübergreifende Korrelation des pathologischen Gradings (pG), dem Differenzierungsgrad des Tumors, mit dem Überleben der Patienten.

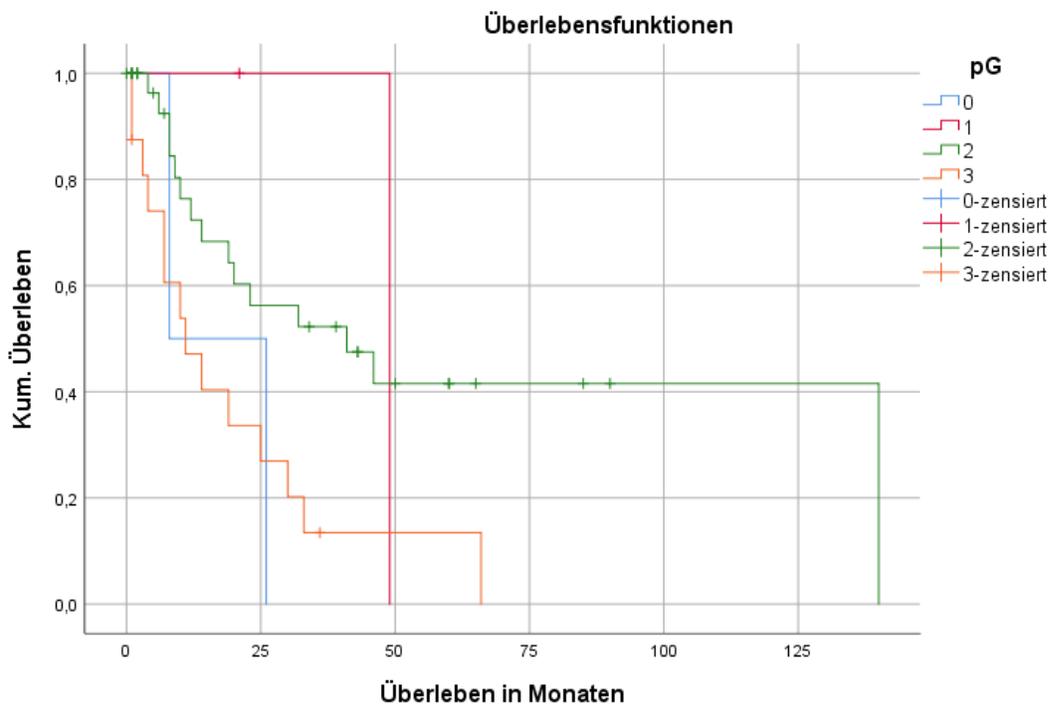


Abbildung 25: Tumorentitätenübergreifende Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Grading (pG) und Patientenüberleben

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen, dass Patienten mit einem hohen Grading (Grading 3, n=16) und damit einem schlechter differenzierten Tumor früher versterben als Patienten mit einem niedrigeren Grading und damit einem besser differenzierten Tumor.

4.3.1.2.2 Korrelation Grading mit dem Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome

In der Tabelle 33 sieht man das entsprechende Grading der Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom.

Tabelle 33: Daten für die Korrelation des Gradings mit dem Patientenüberleben für eCC

pG	Gesamtzahl	pG für eCC		
		unzensiert	n	zensiert Prozent
0	2	2	0	0,0%
1	1	0	1	100,0%
2	13	4	9	69,2%
3	6	6	0	0,0%
Gesamt	22	12	10	45,5%

pG=pathologisches Grading

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom

Aus Tabelle 34 wird deutlich, dass sich die Kaplan-Meier-Kurven nicht statistisch signifikant unterscheiden ($p=0,068$).

Tabelle 34: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Grading und Patientenüberleben für eCC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,068

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom

Die entsprechenden Überlebenszeitkurven sind in Abbildung 26 dargestellt.

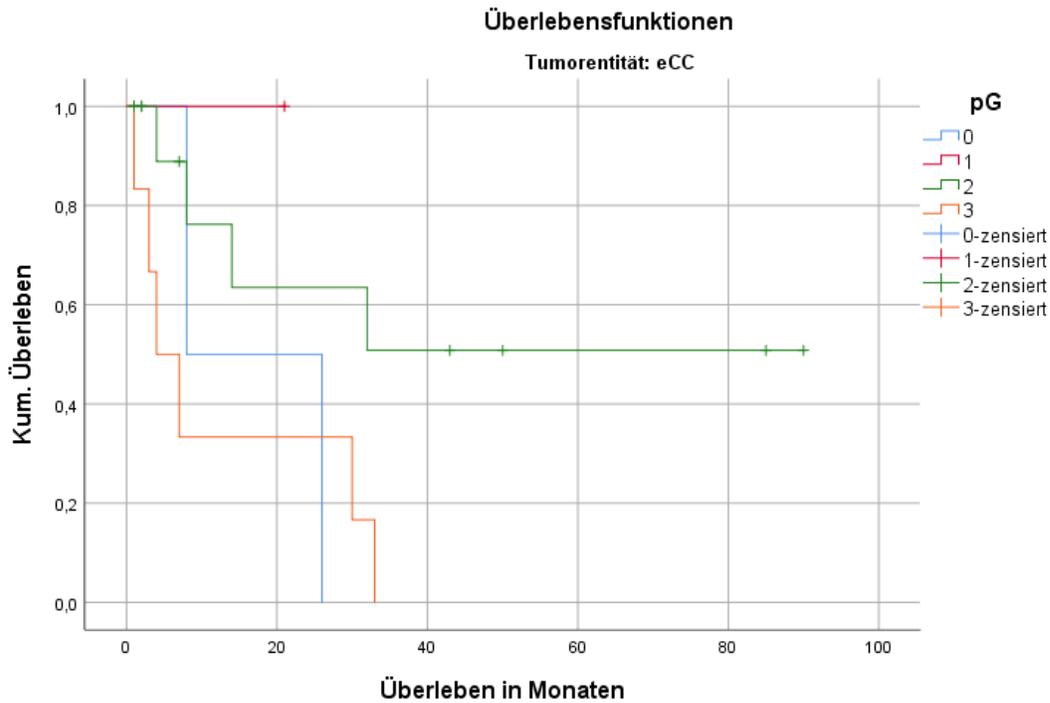


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Grading (pG) und Patientenüberleben für Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom (eCC)

Aus den Überlebenszeitkurven geht hervor, dass Patienten mit einem hohen Grading (Grading 3, n=6) und damit einem schlechter differenzierten Tumor am frühesten versterben. Das Grading 0 (n=2) und 1 (n=1) besteht nur bei wenigen Patienten, der Großteil der Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom weist ein Grading von 2 auf (n=13).

4.3.1.2.3 Korrelation Grading mit dem Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome

Welche Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom welches Grading aufweisen, wird in Tabelle 35 dargestellt.

Tabelle 35: Daten für die Korrelation des Gradings mit dem Patientenüberleben für iCC

pG	Gesamtzahl	pG für iCC		
		unzensiert	zensiert	Prozent
		n		
1	1	1	0	0,0%
2	16	6	10	62,5%
3	5	3	2	40,0%
Gesamt	22	10	12	54,5%

pG=pathologisches Grading

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom

Die Kaplan-Meier-Kurven unterscheiden sich nicht statistisch signifikant ($p=0,289$), s. Tabelle 36.

Tabelle 36: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Grading und Patientenüberleben für iCC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,289

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom

Abbildung 27 zeigt die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven.

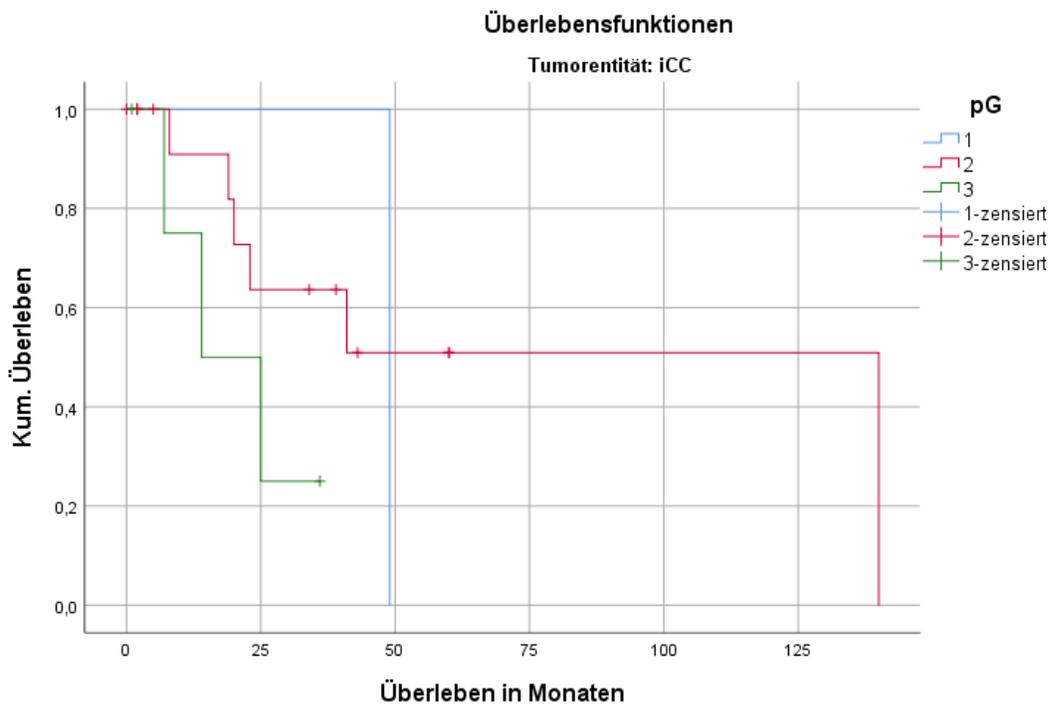


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Grading (pG) und Patientenüberleben für Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom (iCC)

Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom und einem höheren Grading des Tumors (Grading 3, n=5) leben kürzer als Patienten mit einem besser differenzierten Tumor (Grading 2, n=16).

4.3.1.2.4 Korrelation Grading mit dem Patientenüberleben für Pankreaskarzinome

Tabelle 37 zeigt, wie viele Patienten mit Pankreaskarzinom welches Grading aufweisen.

Tabelle 37: Daten für die Korrelation des Gradings mit dem Patientenüberleben für PDAC

pG für PDAC				
pG	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
2	8	5	3	37,5%
3	5	5	0	0,0%
Gesamt	13	10	3	23,1%

pG=pathologisches Grading

PDAC=Pankreaskarzinom

Die Überlebenszeitkurven unterscheiden sich hierbei nicht statistisch signifikant ($p=0,979$), s. Tabelle 38.

Tabelle 38: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Grading und Patientenüberleben für PDAC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,979

PDAC=Pankreaskarzinom

Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven sind in Abbildung 28 dargestellt.

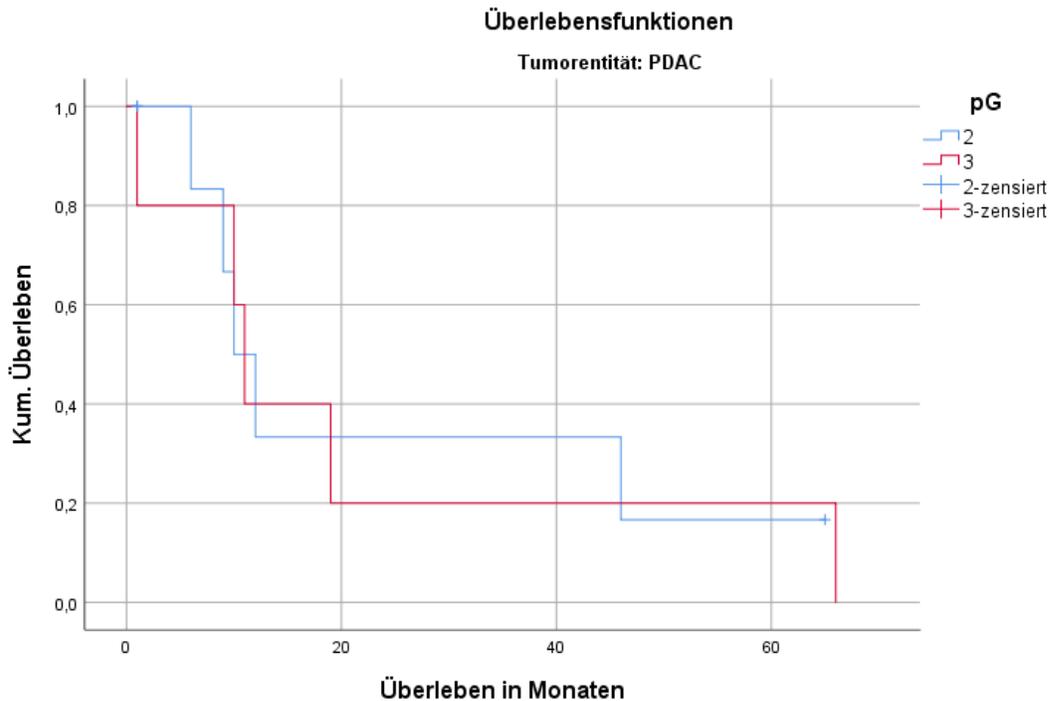


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Grading (pG) und Patientenüberleben für Patienten mit Pankreaskarzinom (PDAC)

Patienten im untersuchten Kollektiv mit Pankreaskarzinom weisen entweder ein Grading 2 (n=8) oder 3 auf (n=5). Die Kaplan-Meier-Kurven liegen eng aneinander, so dass keine klare Aussage bezüglich des Einflusses des Gradings auf das Patientenüberleben für diese Tumorentität getroffen werden kann.

Zusammenfassend konnte hier nur bei der tumorentitätenübergreifenden Betrachtung ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Grading und Patientenüberleben ermittelt werden.

4.3.1.3 Korrelation Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben

4.3.1.3.1 Korrelation Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

Tabelle 39 zeigt tumorentitätenübergreifend die jeweiligen pathologisch ermittelten T-Stadien.

Tabelle 39: Daten für die tumorentitätenübergreifende Korrelation der Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben

Tumorentitätenübergreifende Tumorausdehnungen				
pT	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
1	11	4	7	63,6%
2	15	8	7	46,7%
3	29	20	9	31,0%
4	3	2	1	33,3%
Gesamt	58	34	24	41,4%

pT= pathologische Tumorausdehnung

Die Überlebenszeitkurven unterscheiden sich nicht statistisch signifikant ($p=0,249$), s. Tabelle 40.

Tabelle 40: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Tumorausdehnung und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,249

Abbildung 29 zeigt eine tumorentitätenübergreifende Korrelation des pathologisch ermittelten T-Stadiums (pT) mit dem Überleben der Patienten.

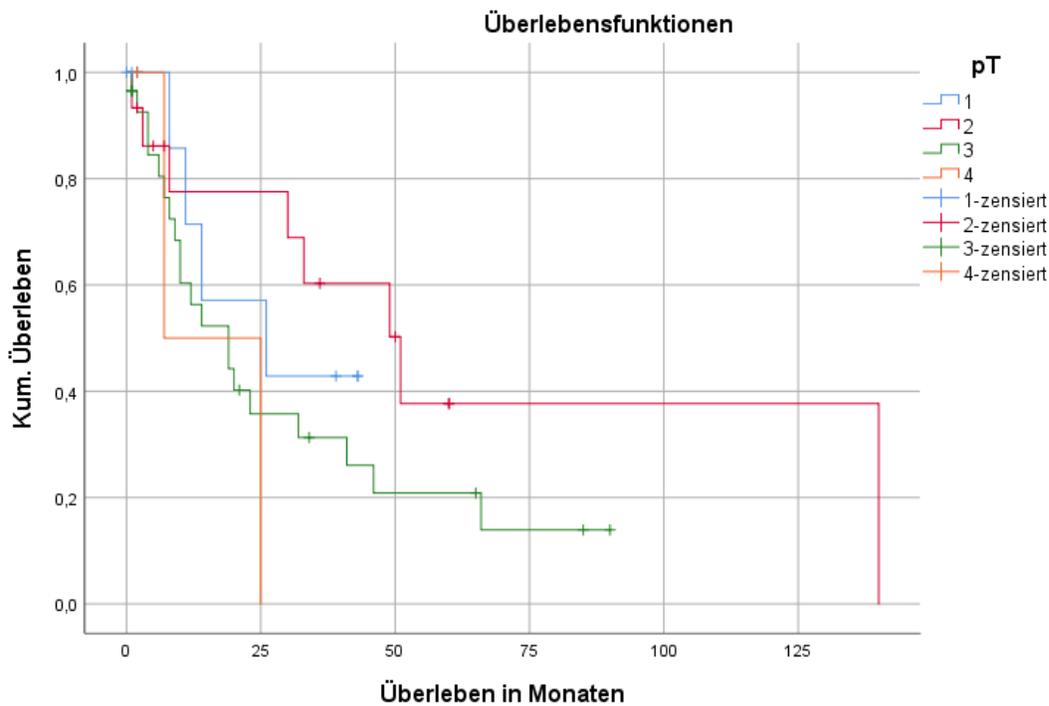


Abbildung 29: Tumorentitätenübergreifende Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Tumorausdehnung (pT) und Patientenüberleben

Aus der Abbildung 29 wird ersichtlich, dass Patienten mit einem geringeren pT-Stadium, also einer niedrigeren Tumorausdehnung, länger überleben als Patienten mit einem höheren pT-Stadium und damit einer ausgedehnteren Tumorerkrankung. In diesem Patientenkollektiv leben Patienten mit dem pT-Stadium von 2 (n=15) am längsten.

4.3.1.3.2 Korrelation Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome

Wie viele Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom jeweils welches pT-Stadium aufweisen, zeigt Tabelle 41.

Tabelle 41: Daten für die Korrelation der Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben für eCC

pT	Gesamtzahl	pT für eCC		
		unzensiert	zensiert	Prozent
		n		
1	2	1	1	50,0%
2	8	5	3	37,5%
3	10	5	5	50,0%
4	2	1	1	50,0%
Gesamt	22	12	10	45,5%

pT=pathologische Tumorausdehnung

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom

Die nachfolgende Tabelle 42 zeigt die statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven. In diesem Fall unterscheiden sie sich nicht statistisch signifikant ($p=0,573$).

Tabelle 42: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Tumorausdehnung und Patientenüberleben für eCC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,573

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom

Die Abbildung 30 zeigt die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven.

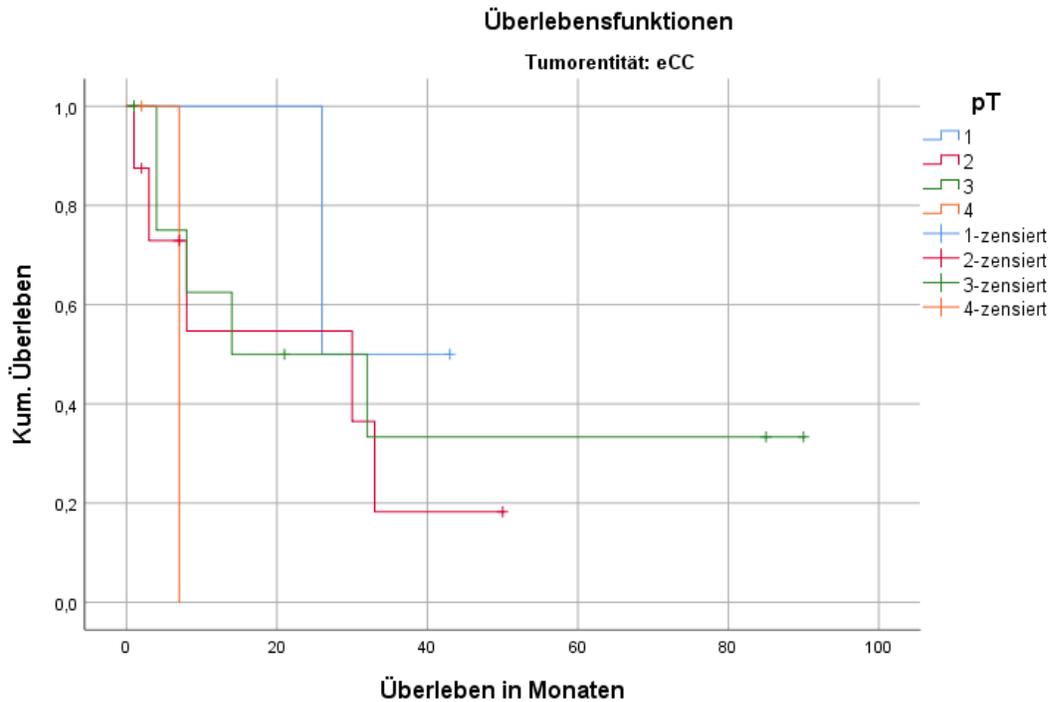


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Tumorausdehnung (pT) und Patientenüberleben für Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom (eCC)

Die meisten Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom befinden sich im Stadium 2 (n=8) und 3 (n=10). Die Kurven liegen eng aneinander, so dass keine klare Aussage bezüglich Auswirkung der Tumorausdehnung auf das Patientenüberleben hier getroffen werden kann.

4.3.1.3.3 Korrelation Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome

Tabelle 43 zeigt für die Gruppe der intrahepatischen Cholangiokarzinome den Zusammenhang zwischen Tumorausdehnung und Überleben.

Tabelle 43: Daten für die Korrelation der Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben für iCC

pT	Gesamtzahl	pT für iCC		
		unzensiert	zensiert	Prozent
		n		
1	8	2	6	75,0%
2	7	3	4	57,1%
3	7	6	1	14,3%
4	1	1	0	0,0%
Gesamt	23	12	11	47,8%

pT=pathologische Tumorausdehnung

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom

Mit einem p-Wert von $p=0,023$ zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenszeitkurven, s. Tabelle 44.

Tabelle 44: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Tumorausdehnung und Patientenüberleben für iCC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,023

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom

Die Kaplan-Meier-Kurven für den Zusammenhang zwischen pT-Stadium und Patientenüberleben für Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom werden in Abbildung 31 dargestellt.

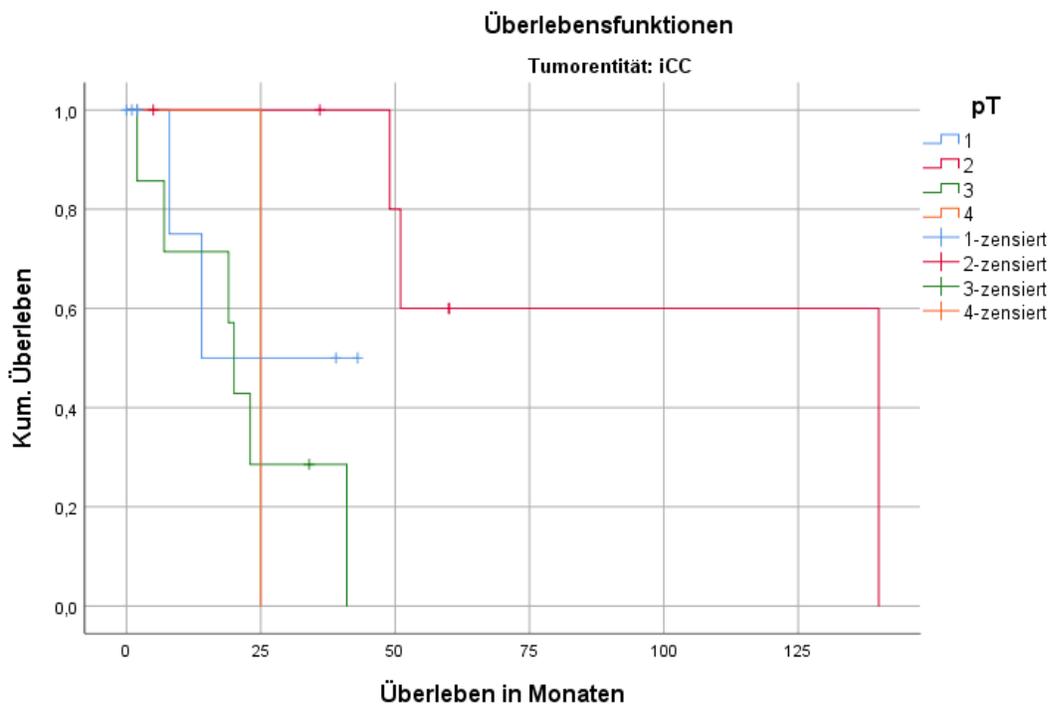


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Tumorausdehnung (pT) und Patientenüberleben für Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom (iCC)

In dieser Abbildung leben Patienten mit einem pT-Stadium von 2 (n=7) am längsten.

4.3.1.3.4 Korrelation Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben für Pankreaskarzinome

In der Tabelle 45 wird gezeigt, wie viele Patienten mit Pankreaskarzinom welches pT-Stadium aufweisen.

Tabelle 45: Daten für die Korrelation der Tumorausdehnung mit dem Patientenüberleben für PDAC

pT für PDAC				
pT	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
1	1	1	0	0,0%
3	12	9	3	25,0%
Gesamt	13	10	3	23,1%

pT=pathologische Tumorausdehnung

PDAC=Pankreaskarzinom

Die statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven wird in Tabelle 46 dargestellt. Sie unterscheiden sich nicht statistisch signifikant ($p=0,700$).

Tabelle 46: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Tumorausdehnung und Patientenüberleben für PDAC

	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,700

PDAC=Pankreaskarzinom

Die Korrelation zwischen Überleben der Patienten mit Pankreaskarzinom und pT-Stadium ist in Abbildung 32 dargestellt.

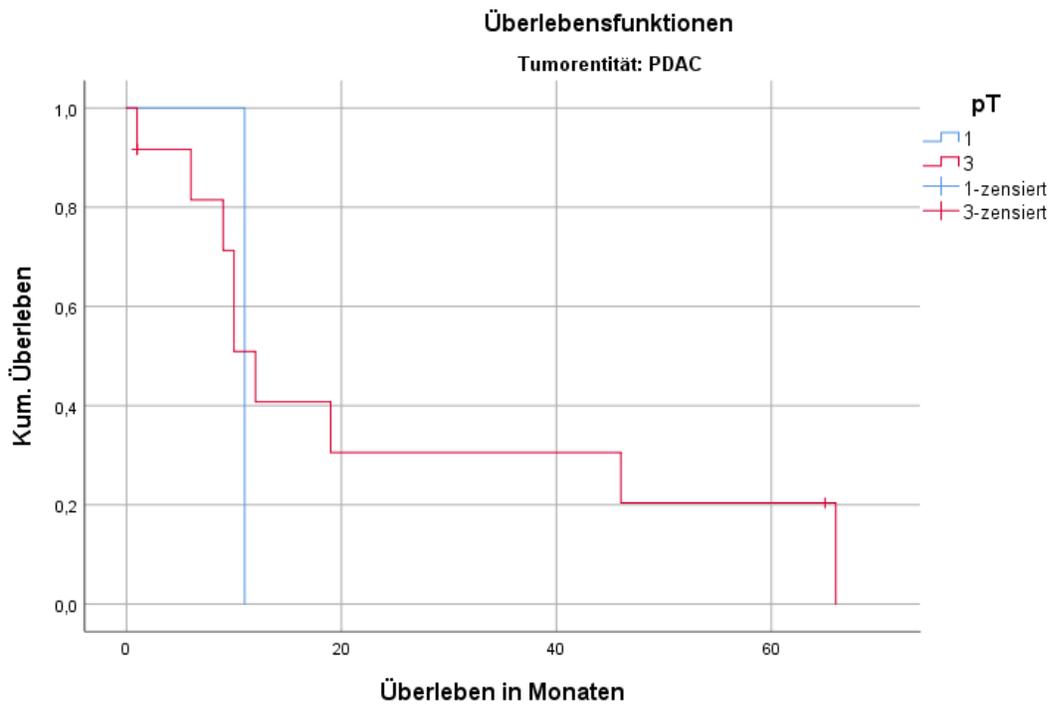


Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Tumorausdehnung (pT) und Patientenüberleben für Patienten mit Pankreaskarzinom (PDAC)

Bis auf einen Patienten weisen alle ein pT-Stadium von 3 auf (n=12). Es besteht somit ein hoher Unterschied bezüglich der Fallzahlgrößen.

Zusammenfassend konnte nur für die Gruppe der intrahepatischen Cholangiokarzinome ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Patientenüberleben und Tumorausdehnung ermittelt werden.

4.3.2 Korrelation der Antigen-Expressionen mit dem Patientenüberleben

Das Patientenkollektiv ist bei dieser Untersuchung kleiner als bei der Analyse der klinischen Parameter, da diejenigen Patienten, bei denen entweder Tumor- oder Normalgewebe fehlte, ausgeschlossen werden mussten. Für jedes Antigen gibt es drei Differenzgruppen (Differenz der Antigenexpression von Tumor- und Normalgewebe): Patienten mit mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe (mehr). Patienten mit gleich viel Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe (gleich) sowie Patienten mit weniger Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe (weniger).

Die Kaplan-Meier-Kurven für die Antigene ADAM17, Notch1 und Notch4 werden exemplarisch gezeigt.

4.3.2.1 Korrelation ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben

4.3.2.1.1 Korrelation ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

Die Tabelle 47 zeigt tumorentitätenübergreifend wie viele Patienten eine jeweils höhere, gleich große oder geringere Antigenexpression von ADAM17 im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe aufweisen.

Tabelle 47: Daten für die Korrelation der ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

ADAM17 Expression tumorentitätenübergreifend

Differenzgruppe_ADAM17	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
gleiche Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe	11	7	4	36,4%
mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	28	16	12	42,9%
weniger Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	11	7	4	36,4%
Gesamt	50	30	20	40,0%

In der Tabelle 48 wird die statistische Signifikanz der folgenden Überlebenszeitkurven dargestellt.

Tabelle 48: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von ADAM17 Expression und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,662

Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven werden in Abbildung 33 dargestellt.

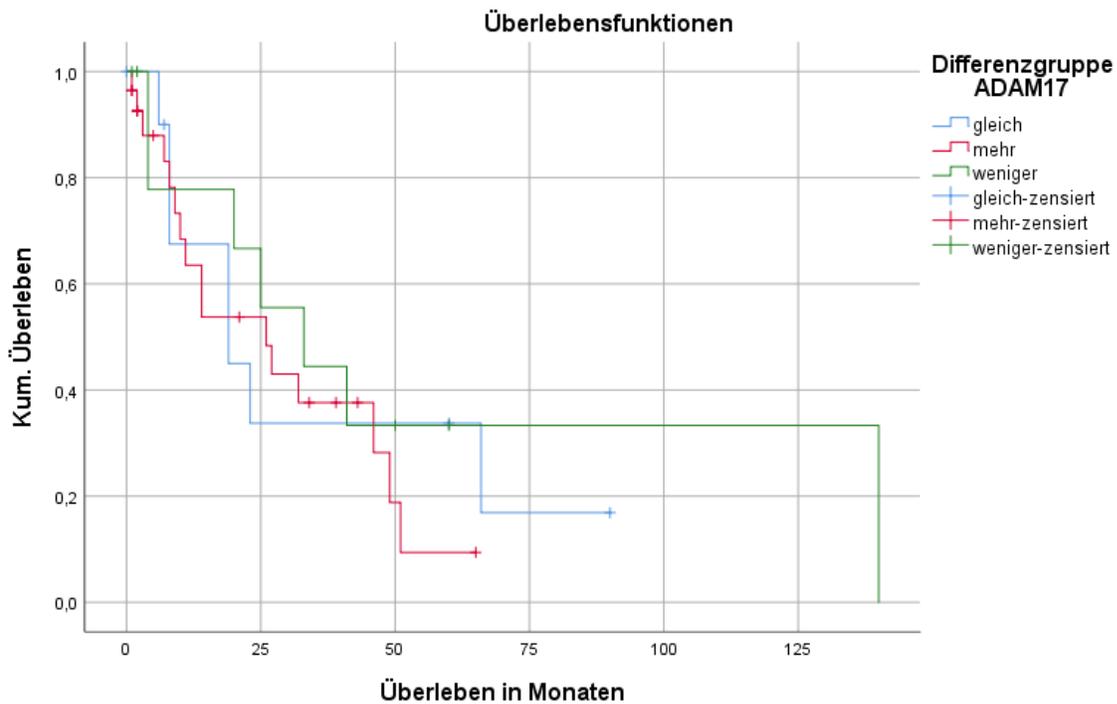


Abbildung 33: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen ADAM17 Expression und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

Patienten mit weniger ADAM17-Expression im Tumorgewebe (n=11) überleben verglichen mit den anderen beiden Differenzgruppen länger. Jedoch sind die Unterschiede nicht statistisch signifikant ($p=0,662$).

4.3.2.1.2 Korrelation ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome

Tabelle 49 zeigt, wie viele Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom jeweils mehr, gleich viel oder weniger ADAM17 im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe aufweisen.

Tabelle 49: Daten für die Korrelation der ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben für eCC

ADAM17 Expression für eCC				
Differenzgruppe_ADAM17	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
gleiche Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe	4	2	2	50,0%
mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	9	4	5	55,6%
weniger Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	4	3	1	25,0%
Gesamt	17	9	8	47,1%

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom

In Tabelle 50 wird dargestellt, ob sich die Überlebenszeitkurven der jeweiligen Differenzgruppen statistisch signifikant unterscheiden.

Tabelle 50: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von ADAM17 Expression und Patientenüberleben für eCC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,977

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom

Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven werden in Abbildung 34 gezeigt.

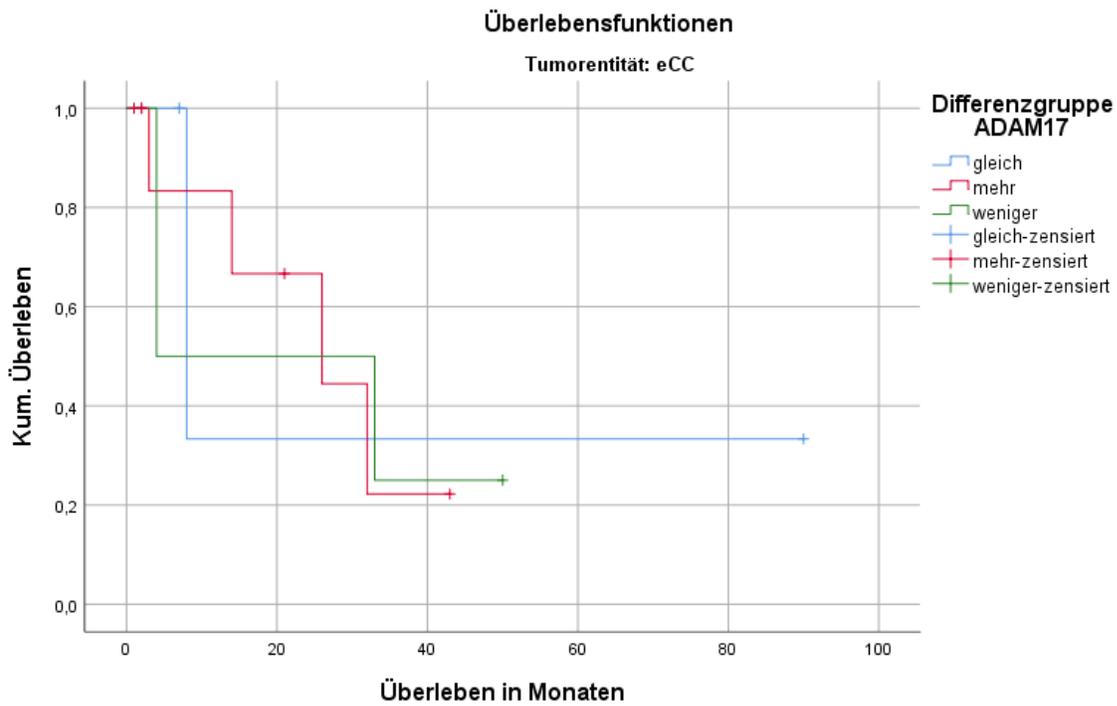


Abbildung 34: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen ADAM17 Expression und Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome (eCC)

Es lassen sich hier keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Überlebenszeitkurven für extrahepatische Cholangiokarzinome nachweisen ($p=0,997$).

4.3.2.1.3 Korrelation ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome

Wie viele Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom jeweils eine gleich große, geringere oder höhere ADAM17 Expression im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe aufweisen, ist in Tabelle 51 dargestellt.

Tabelle 51: Daten für die Korrelation der ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben für iCC

ADAM17 Expression für iCC				
Differenzgruppe_ADAM17	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
gleiche Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe	4	2	2	50,0%
mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	11	6	5	45,5%
weniger Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	7	4	3	42,9%
Gesamt	22	12	10	45,5%

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom

Die statistische Signifikanz der Kaplan-Meier-Kurven ist in Tabelle 52 abgebildet.

Tabelle 52: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von ADAM17 Expression und Patientenüberleben für iCC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,562

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom

Die Kaplan-Meier-Kurven werden in Abbildung 35 gezeigt.

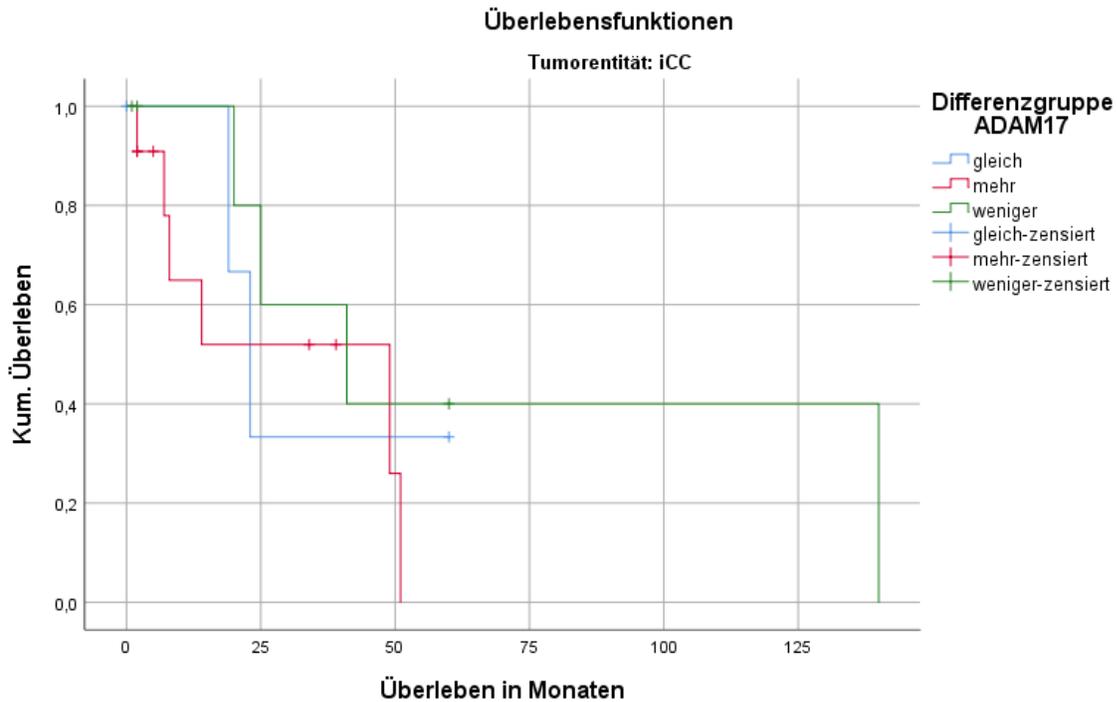


Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen ADAM17 Expression und Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome (iCC)

Abbildung 35 zeigt für die Gruppe der intrahepatischen Cholangiokarzinome den Zusammenhang zwischen den Differenzgruppen von ADAM17 und dem Überleben in Monaten. Patienten mit weniger ADAM17 Expression im Tumorgewebe (n=7) überleben länger als Patienten mit mehr Antigenexpression im Tumorgewebe (n=11). Mit einem p-Wert von $p=0,562$ zeigt sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenszeitkurven.

4.3.2.1.4 Korrelation ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben für Pankreaskarzinome

Tabelle 53 zeigt, wie viele Patienten mit Pankreaskarzinom jeweils gleich viel, weniger oder mehr ADAM17 im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe exprimieren.

Tabelle 53: Daten für die Korrelation der ADAM17 Expression mit dem Patientenüberleben für PDAC

ADAM17 Expression für PDAC				
Differenzgruppe_ADAM17	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
gleiche Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe	3	3	0	0,0%
mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	8	6	2	25,0%
Gesamt	11	9	2	18,2%

PDAC=Pankreaskarzinom

In der Tabelle 54 ist die berechnete statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven dargestellt.

Tabelle 54: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von ADAM17 Expression und Patientenüberleben für PDAC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,724

PDAC=Pankreaskarzinom

Abbildung 36 zeigt die Überlebenszeitkurven für Pankreaskarzinome abhängig von der ADAM17 Expression.

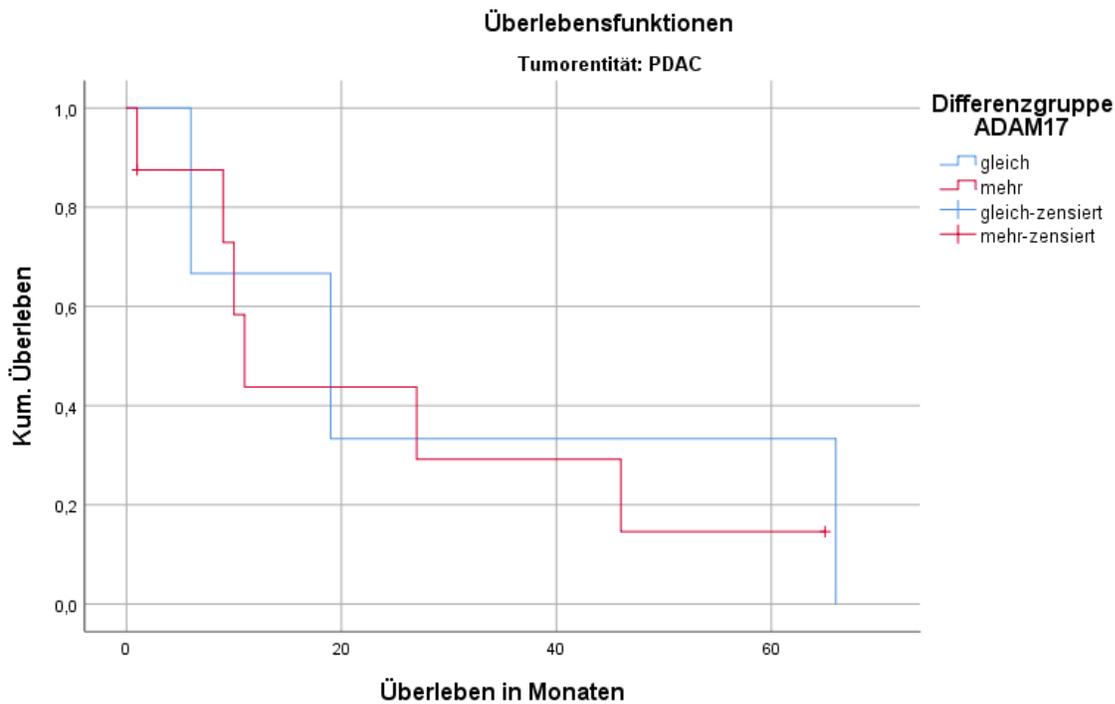


Abbildung 36: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen ADAM17 Expression und Patientenüberleben für Pankreaskarzinome (PDAC)

In der Gruppe der Pankreaskarzinome gibt es nur Patienten mit mehr ADAM17 Expression im Tumorgewebe (n=8) und Patienten mit gleich großer Antigenexpression (n=3). Die Überlebenszeitkurven unterscheiden sich nicht statistisch signifikant (p=0,724).

Insgesamt wird deutlich, dass es in diesem Patientenkollektiv keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Menge des exprimierten ADAM17 im Tumor- verglichen mit dem Normalgewebe und dem Patientenüberleben gibt.

4.3.2.2 Korrelation Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben

4.3.2.2.1 Korrelation Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

Tabelle 55 zeigt, wie viele Patienten mit extra- und intrahepatischem Cholangio- sowie Pankreaskarzinom eine höhere, geringere oder gleich große Antigenexpression von Notch1 im Tumor- verglichen mit dem Normalgewebe aufweisen.

Tabelle 55: Daten für die Korrelation der Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

Notch1 Expression tumorentitätenübergreifend

Differenzgruppe_Notch1	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
gleiche Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe	7	6	1	14,3%
mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	34	19	15	44,1%
weniger Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	9	5	4	44,4%
Gesamt	50	30	20	40,0%

In Tabelle 56 wird dargestellt, ob die Überlebenszeitkurven sich statistisch signifikant unterscheiden.

Tabelle 56: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch1 Expression und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,162

Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven werden in Abbildung 37 dargestellt.

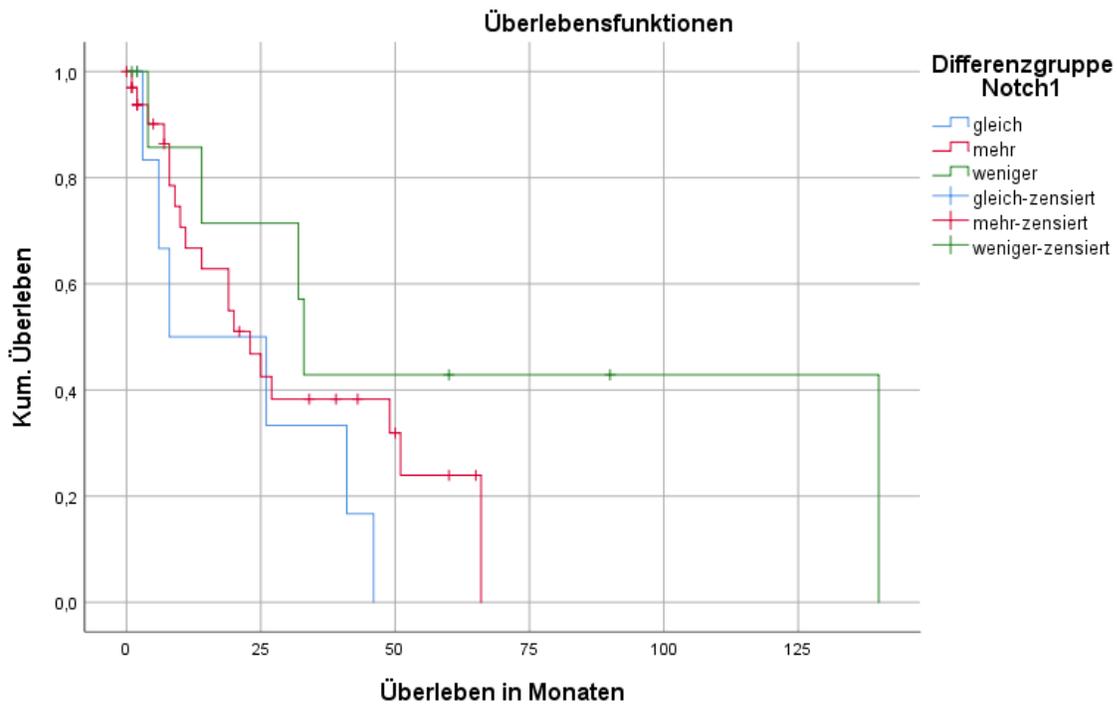


Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch1 Expression und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

Die tumorentitätenübergreifende Betrachtung der Überlebenszeitkurven zeigt, dass Patienten mit einer geringeren Notch1 Expression im Tumor- als im Normalgewebe (n=9) länger überleben als Patienten mit einer höheren Notch1 Expression im Tumorgewebe (n=34). Am kürzesten überleben Patienten mit einer gleich hohen Notch1 Expression im Tumor- und Normalgewebe (n=7). Es besteht jedoch keine statistische Signifikanz zwischen den Überlebenszeitkurven ($p=0,162$).

4.3.2.2.2 Korrelation Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome

Wie viele Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom mehr, gleich viel oder weniger Notch1 im Tumor- verglichen mit dem Normalgewebe exprimieren, wird in Tabelle 57 dargestellt.

Tabelle 57: Daten für die Korrelation der Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben für eCC

Notch1 Expression für eCC				
Differenzgruppe_Notch1	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
gleiche Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe	4	3	1	25,0%
mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	8	2	6	75,0%
weniger Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	5	4	1	20,0%
Gesamt	17	9	8	47,1%

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom

Die statistische Signifikanz der Kaplan-Meier-Kurven ist in Tabelle 58 abgebildet.

Tabelle 58: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch1 Expression und Patientenüberleben für eCC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,149

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom

Abbildung 38 zeigt die Korrelation der Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben.

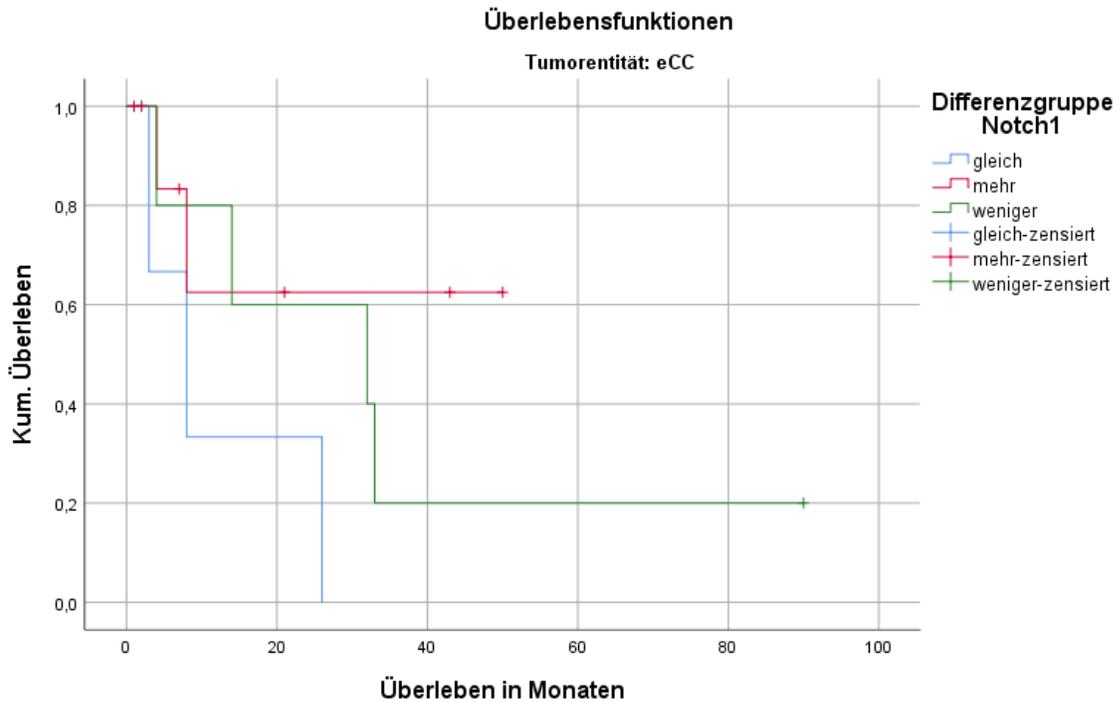


Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch1 Expression und Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome (eCC)

Es zeigt sich in der Abbildung 38, dass Patienten mit weniger Notch1 Expression im Tumor- als im Normalgewebe (n=5) länger überleben als Patienten mit einer gleich hohen Antigenexpression (n=4). Hierbei unterscheiden sich die Überlebenszeitkurven jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,149$). Bei Patienten mit einer höheren Notch1 Expression im Tumorgewebe sind viele Patientenfälle (75%) im Vergleich zu den anderen beiden Differenzgruppen zensiert.

4.3.2.2.3 Korrelation Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome

Tabelle 59 zeigt, wie viele Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom eine gleich große, höhere oder geringere Notch1 Expression im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe aufweisen.

Tabelle 59: Daten für die Korrelation der Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben für iCC

Notch1 Expression für iCC				
Differenzgruppe_Notch1	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
gleiche Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe	1	1	0	0,0%
mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	18	10	8	44,4%
weniger Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	3	1	2	66,7%
Gesamt	22	12	10	45,5%

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom

Auch hier wurde die statistische Signifikanz der Kaplan-Meier-Kurven berechnet, s. Tabelle 60.

Tabelle 60: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch1 Expression und Patientenüberleben für iCC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,161

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom

Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven sind in Abbildung 39 dargestellt.

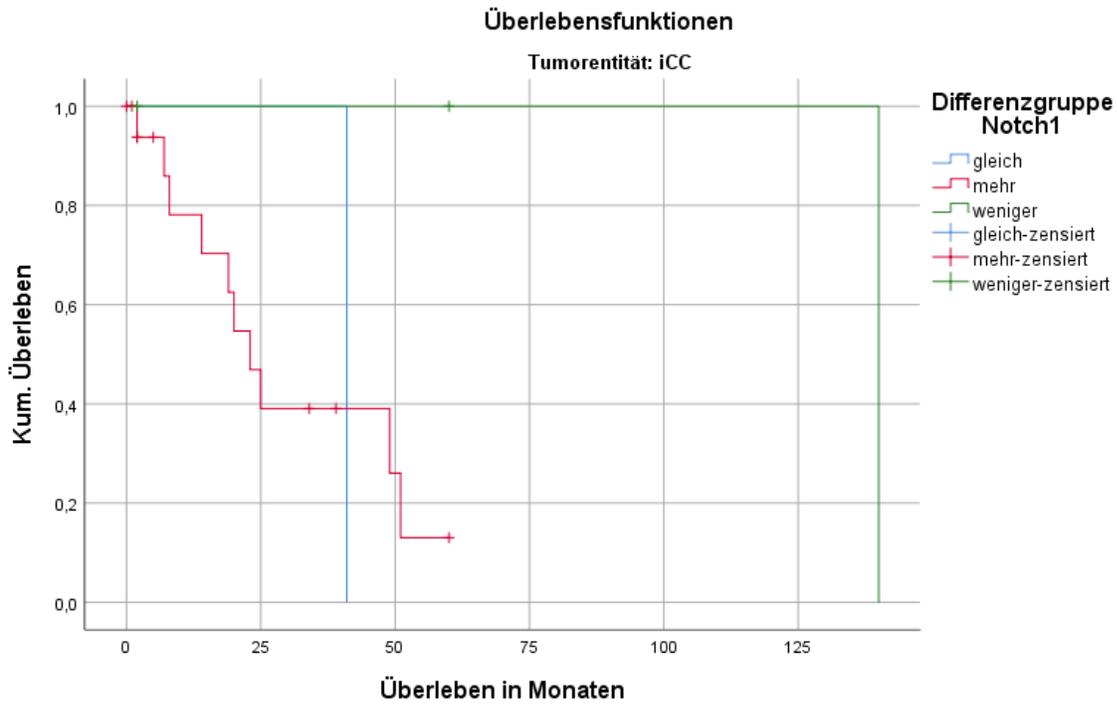


Abbildung 39: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch1 Expression und Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome (iCC)

Der Großteil der Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom (n=18) weist eine höhere Notch1 Expression im Tumorgewebe auf. Nur ein Patient zeigte eine gleich hohe und nur drei Patienten eine geringere Antigenexpression im Tumorgewebe. Die Kaplan-Meier-Kurven unterscheiden sich hierbei nicht statistisch signifikant (p=0,161).

4.3.2.2.4 Korrelation Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben für Pankreaskarzinome

Tabelle 61 zeigt, wie viele Patienten mit Pankreaskarzinom eine geringere, höhere bzw. gleich große Antigenexpression von Notch1 im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe aufweisen.

Tabelle 61: Daten für die Korrelation der Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben für PDAC

Notch1 Expression für PDAC				
Differenzgruppe_Notch1	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
gleiche Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe	2	2	0	0,0%
mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	8	7	1	12,5%
weniger Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	1	0	1	100,0%
Gesamt	11	9	2	18,2%

PDAC=Pankreaskarzinom

In Tabelle 62 wird die statistische Signifikanz der Kaplan-Meier-Kurven gezeigt.

Tabelle 62: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch1 Expression und Patientenüberleben für PDAC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,904

PDAC=Pankreaskarzinom

Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven werden in Abbildung 40 dargestellt.

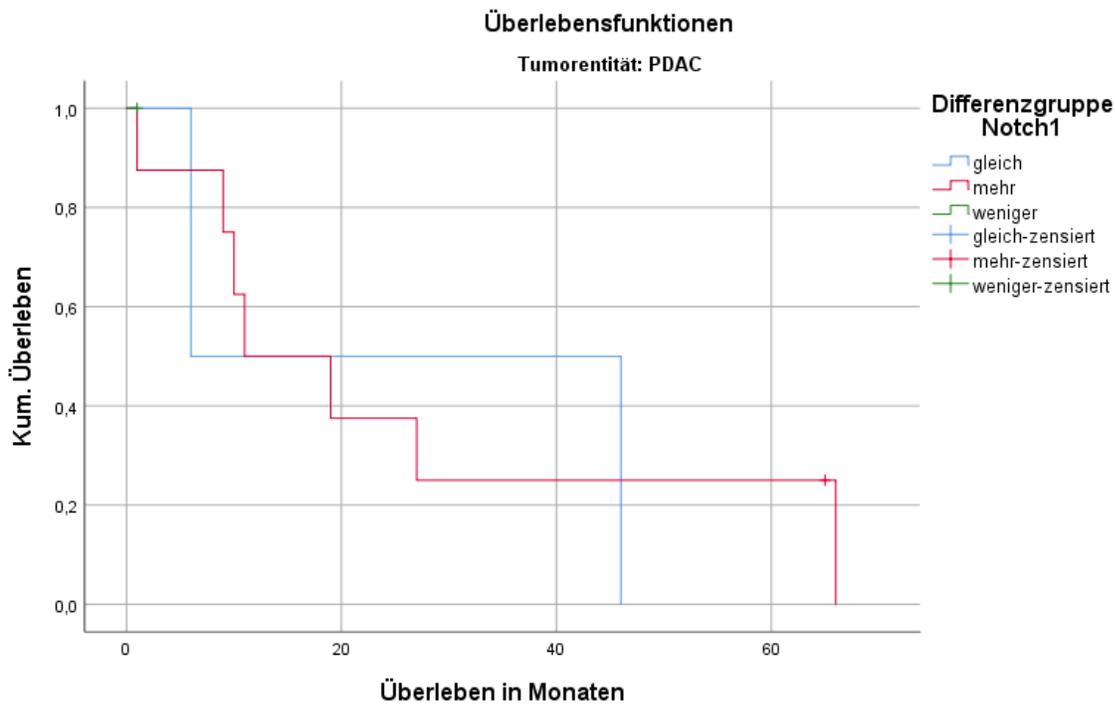


Abbildung 40: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch1 Expression und Patientenüberleben für Pankreaskarzinome (PDAC)

Der Großteil der Patienten mit Pankreaskarzinom (n=8) weisen eine höhere Notch1 Expression im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe auf. Nur zwei Patienten haben eine gleich hohe Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe und der eine Patientenfall mit weniger Notch1 Expression im Tumorgewebe ist zensiert. Somit gibt es deutlich unterschiedlich große Fallzahlgrößen. Die Kaplan-Meier-Kurven unterscheiden sich zudem nicht statistisch signifikant ($p=0,904$).

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass für die in dieser wissenschaftlichen Arbeit untersuchten extra- und intrahepatischen Cholangio- sowie Pankreaskarzinome kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Notch1 Expression im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe und Patientenüberleben festgestellt werden kann.

4.3.2.3 Korrelation Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben

4.3.2.3.1 Korrelation Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

Tabelle 63 zeigt, wie viele Patienten mit extra- und intrahepatischem Cholangio- sowie Pankreaskarzinom eine größere, gleich große oder geringere Notch4 Expression im Tumor- verglichen mit dem Normalgewebe aufweisen.

Tabelle 63: Daten für die Korrelation der Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

Notch4 Expression tumorentitätenübergreifend

Differenzgruppe_Notch4	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
gleiche Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe	10	7	3	30,0%
mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	25	15	10	40,0%
weniger Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	15	8	7	46,7%
Gesamt	50	30	20	40,0%

In der Tabelle 64 wird die statistische Signifikanz der unterschiedlichen Überlebenszeitkurven dargestellt.

Tabelle 64: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch4 Expression und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,743

In der Abbildung 41 sind die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven abgebildet.

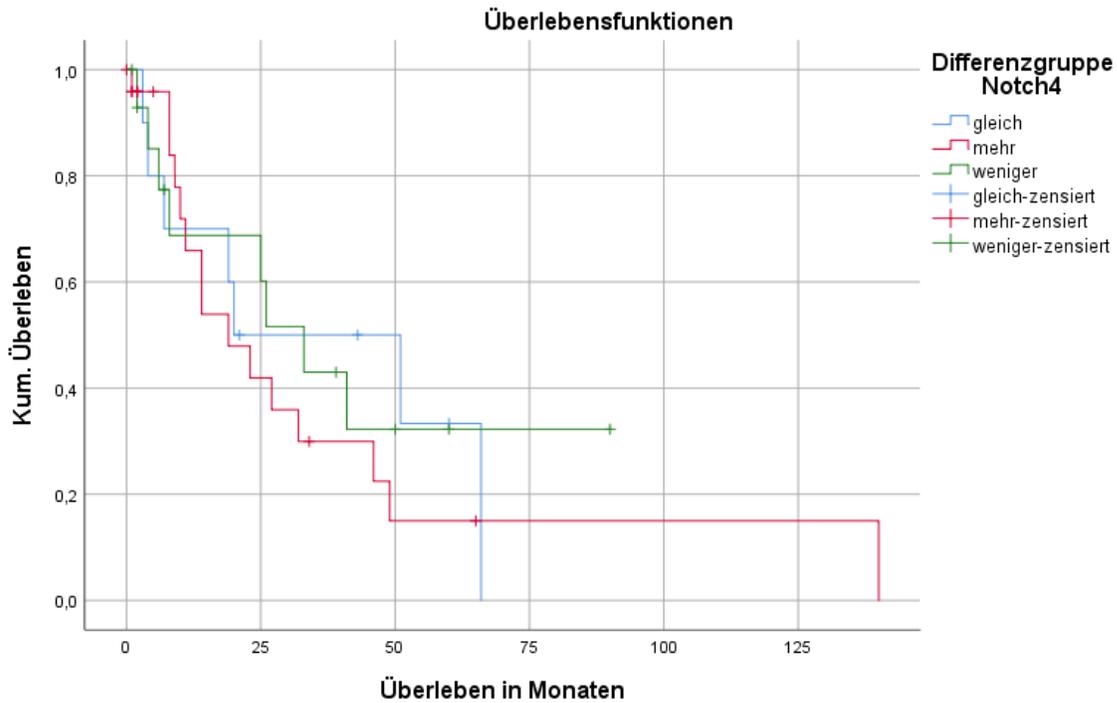


Abbildung 41: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch4 Expression und Patientenüberleben tumorentitätenübergreifend

Aus der Abbildung 41 wird ersichtlich, dass Patienten mit einer höheren ($n=25$) Notch4 Expression im Tumorgewebe eine geringere Überlebenszeit aufweisen als Patienten mit einer gleich hohen ($n=10$) oder geringeren ($n=15$) Notch4 Expression im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe. Die Überlebenszeitkurven unterscheiden sich hierbei nicht statistisch signifikant ($p=0,743$).

4.3.2.3.2 Korrelation Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome

Tabelle 65 zeigt, wie viele Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom gleich viel, mehr oder weniger Notch4 im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe exprimieren.

Tabelle 65: Daten für die Korrelation der Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben für eCC

Notch4 Expression für eCC				
Differenzgruppe_Notch4	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
gleiche Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe	4	2	2	50,0%
mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	5	3	2	40,0%
weniger Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	8	4	4	50,0%
Gesamt	17	9	8	47,1%

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom

In der Tabelle 66 wird die statistische Signifikanz der Kaplan-Meier-Kurven gezeigt.

Tabelle 66: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch4 Expression und Patientenüberleben für eCC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,614

eCC=extrahepatisches Cholangiokarzinom

Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven werden in Abbildung 42 dargestellt.

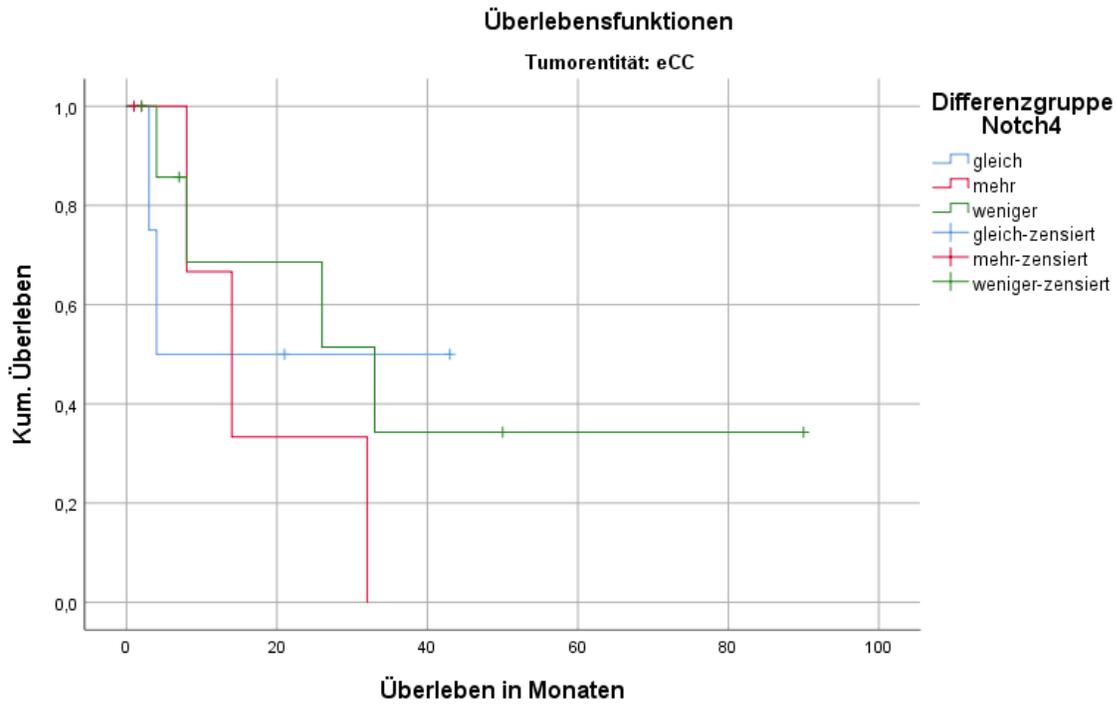


Abbildung 42: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch4 Expression und Patientenüberleben für extrahepatische Cholangiokarzinome (eCC)

Patienten mit einer geringeren Notch4 Expression im Tumorgewebe (n=8) leben länger als Patienten mit einer höheren Notch4 Expression im Tumorgewebe (n=5). Jedoch besteht auch hier keine statistische Signifikanz ($p=0,614$).

4.3.2.3.3 Korrelation Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome

Tabelle 67 zeigt, wie viele Patienten mit intrahepatischem Cholangiokarzinom eine höhere, geringere oder gleich große Notch4 Expression im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe aufweisen.

Tabelle 67: Daten für die Korrelation der Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben für iCC

Notch4 Expression für iCC				
Differenzgruppe_Notch4	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
gleiche Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe	5	4	1	20,0%
mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	11	5	6	54,5%
weniger Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	6	3	3	50,0%
Gesamt	22	12	10	45,5%

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom

Die statistische Signifikanz der Kaplan-Meier Kurven wird in Tabelle 68 gezeigt.

Tabelle 68: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch4 Expression und Patientenüberleben für iCC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,925

iCC=intrahepatisches Cholangiokarzinom

Die entsprechenden Überlebenszeitkurven werden in Abbildung 43 dargestellt.

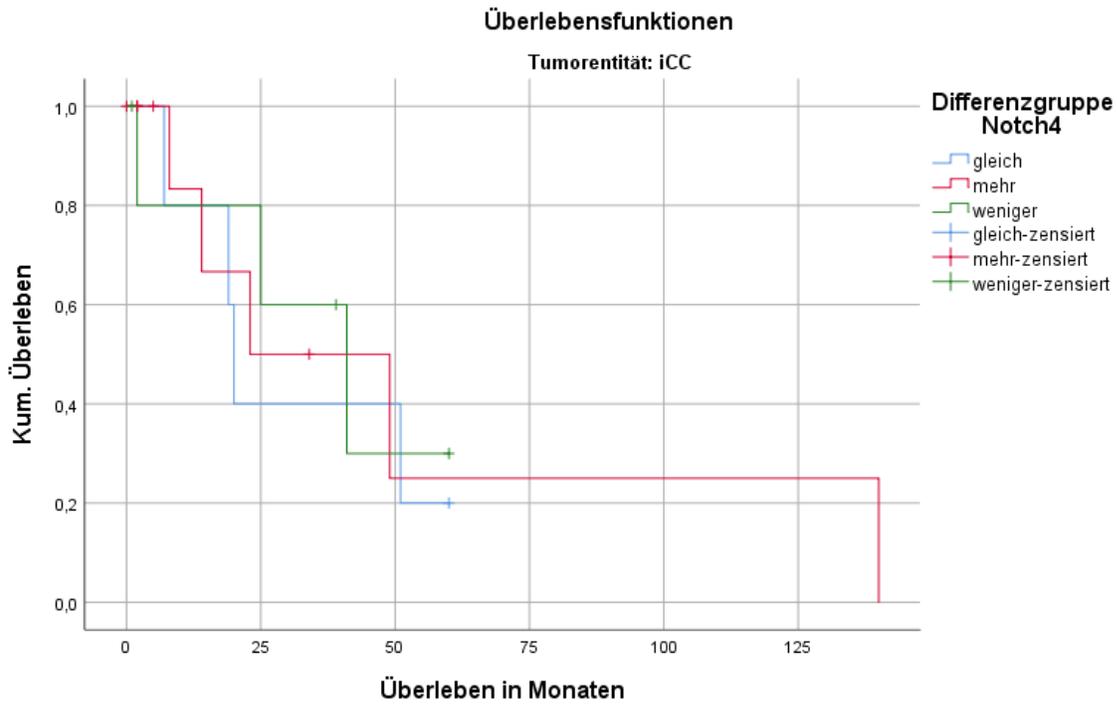


Abbildung 43: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch4 Expression und Patientenüberleben für intrahepatische Cholangiokarzinome (iCC)

Es ist keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Notch4 Expression im Tumor- und Normalgewebe und Patientenüberleben in der Gruppe der intrahepatischen Cholangiokarzinome erkennbar ($p=0,925$).

4.3.2.3.4 Korrelation Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben für Pankreaskarzinome

Tabelle 69 zeigt die jeweilige Anzahl an Patienten mit Pankreaskarzinom, die mehr, gleich viel oder weniger Notch4 im Tumor- verglichen mit dem Normalgewebe exprimieren.

Tabelle 69: Daten für die Korrelation der Notch4 Expression mit dem Patientenüberleben für PDAC

Notch4 für PDAC				
Differenzgruppe_Notch4	Gesamtzahl	unzensiert	zensiert	
			n	Prozent
gleiche Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe	1	1	0	0,0%
mehr Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	9	7	2	22,2%
weniger Antigenexpression im Tumor- als im Normalgewebe	1	1	0	0,0%
Gesamt	11	9	2	18,2%

PDAC=Pankreaskarzinom

Die berechnete statistische Signifikanz der Kaplan-Meier-Kurven wird in Tabelle 70 gezeigt.

Tabelle 70: Statistische Signifikanz der Überlebenszeitkurven von Notch4 Expression und Patientenüberleben für PDAC

	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,079

PDAC=Pankreaskarzinom

Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven sind in Abbildung 44 abgebildet.

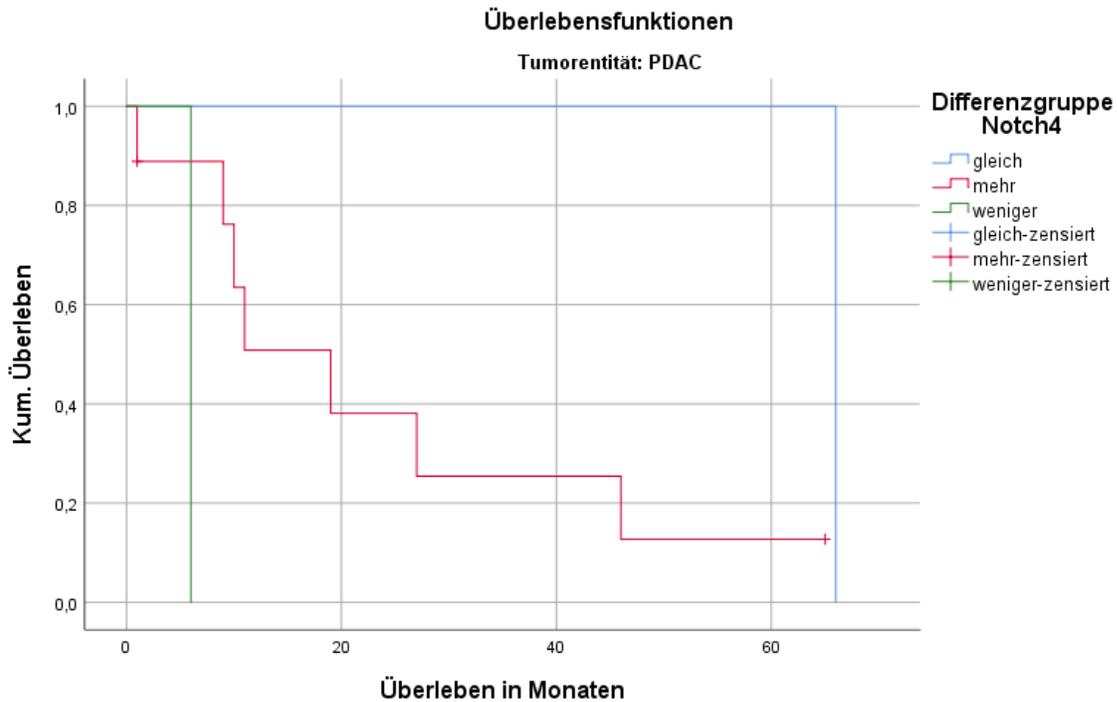


Abbildung 44: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation zwischen Notch4 Expression und Patientenüberleben für Pankreaskarzinome (PDAC)

Die überwiegende Anzahl an Patienten mit Pankreaskarzinom in diesem Patientenkollektiv weist eine höhere Notch4 Expression im Tumorgewebe auf (n=9). Nur bei einem Patienten zeigt sich eine gleich hohe und bei einem Patienten eine geringere Notch4 Expression im Tumorgewebnis verglichen mit dem Normalgewebe. Es besteht hierbei kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Differenzgruppen und dem Patientenüberleben ($p=0,079$).

Sowohl für Notch4 als auch für die restlichen Signalproteine des Notch-Signalweges konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Expressionslevel der Antigene im Tumor- und Normalgewebe in den drei Tumorentitäten und dem Patientenüberleben festgestellt werden.

Bei den klinischen Parametern konnten jedoch signifikante Ergebnisse bezüglich des Überlebens dargestellt werden. Eine tumorentitätenübergreifende Betrachtung zeigte einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Grading und Patientenüberleben. Zudem zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen UICC-Stadium und Überlebenszeit in Monaten für die Gruppe der intrahepatischen Cholangio- und Pankreaskarzinome. Für die Gruppe der intrahepatischen Cholangiokarzinome konnte ferner ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Überleben und Tumorstadium ermittelt werden. Des Weiteren wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Metastasierungsgrad und Überlebenszeit für die Gruppe der Pankreaskarzinome dargestellt.

5. Diskussion

Im Folgenden werden das Material, die Methoden und die Ergebnisse dieser wissenschaftlichen Arbeit analysiert, bewertet und mit der zu diesen Themen existierenden Literatur verglichen.

5.1 Diskussion zu Material und Methode

Zunächst werden das in dieser Arbeit verwendete Material und die angewandten Methoden diskutiert.

5.1.1 Diskussion zu Material

In dieser Arbeit ist Normal- und Tumorgewebe von Patienten mit extra- und intrahepatischen sowie Pankreaskarzinomen untersucht worden. Jedoch war nicht bei allen Patienten sowohl Normal- als auch Tumorgewebe vorhanden. Mögliche Gründe dafür sind beispielsweise, dass bei den Operationen gar kein Normal- bzw. Tumorgewebe entnommen worden ist, die Proben verloren gegangen oder von anderen Arbeitsgruppen bereits zu Forschungszwecken verwendet worden sind. Ferner konnte auch nicht bei allen Patienten das Normal- oder Tumorgewebe analysiert werden, da das Gewebe z.B. nekrotisch war. Da aber beide Gewebearten benötigt werden, um eine Aussage über die Aktivität des Notch-Signalweges in Tumoren zu tätigen, hat sich das Patientenkollektiv dementsprechend verkleinert.

5.1.2 Diskussion zu Methode

Nach der immunhistochemischen Färbung und dem Abfotografieren des Gewebes folgte die Analyse der Bilder mit dem Programm ImageJ mit dem Ziel, einen immunhistochemischen Score für jedes Bild zu generieren. Dieser Score ist semiquantitativ und setzt sich sowohl aus dem Prozentsatz angefärbter Zellen als auch der Intensität der gefärbten Zellen zusammen. Während die Berechnung des Prozentsatzes positiver (brauner) Zellen eher objektiv ist, ist die Bewertung der Intensität der Braunfärbung subjektiv. Dadurch, dass für jeden Score der Intensität ein Referenzbild festgelegt worden ist und alle Bilder durch die gleiche Person analysiert wurden, sind die Schwankungen in den IHC-Scores eher geringer Natur.

Ferner gab es Einschränkungen bei der klinischen Datenerhebung. Wie bereits im Kapitel 3.2.5 erwähnt, fehlte vor allem bei Patienten, die vor dem Jahre 2000 stationär in die Charité aufgenommen worden sind, im Programm SAP die digitale Akte der Patienten. Obgleich eine Akteneinsicht bei einigen dieser Patienten im Altarchiv der Charité unternommen worden ist,

waren auch dort nicht alle Patientenakten auffindbar bzw. fehlten wichtige Dokumente in den vorliegenden Akten. Auch kam es bei wenigen Patienten vor, dass die Proben in der Biobank als ein bestimmter Tumor deklariert worden sind, eine Akteneinsicht jedoch ergeben hat, dass die Patienten an einem anderen Subtypen des Cholangio- oder Pankreaskarzinoms erkrankt waren. Dadurch hat sich das Patientenkollektiv nochmals verkleinert.

Eine Einschränkung in der statistischen Auswertung liegt in der Größe des Patientenkollektivs. Das ursprünglich angedachte Gesamtkollektiv hat sich durch die oben genannten Faktoren verkleinert. Eine kleinere Fallzahl führt zu einer schlechteren statistischen Aussagekraft. Bei den Kaplan-Meier-Kurven, wo die Korrelation zwischen einem bestimmten klinischen oder immunhistochemischen Parameter mit dem Patientenüberleben ermittelt worden ist, waren die Fallzahlen für die jeweiligen Parameter teilweise sehr klein und es gab einen großen Unterschied zwischen der Fallzahlgröße. Beispielsweise gab es bei dem klinischen Parameter UICC-Stadium große Unterschiede zwischen den Subparametern: bei der Überlebenszeitkurve für das UICC Stadium I betrug die Fallzahl einmal $n=6$, beim UICC-Stadium II $n=23$. Durch die unterschiedlich hohen Fallzahlen pro Subparameter sind die Korrelationen nicht immer vergleichbar und die Aussagekraft der Überlebenszeitkurven eingeschränkt. Durch die kleine Fallzahlgröße und die unterschiedlichen Fallzahlen entstehen auch Kaplan-Meier-Kurven, die zum Teil unlogisch erscheinen. Man würde prinzipiell unabhängig anderer klinischer Faktoren erwarten, dass Patienten im UICC-Stadium IV den kürzesten Überlebenszeitraum vorweisen, während die Patienten im UICC Stadium I am längsten überleben. Im Beispiel der intrahepatischen Cholangiokarzinome überleben jedoch Patienten im UICC Stadium II ($n=5$) am längsten und die Patienten mit dem UICC Stadium III ($n=2$) am kürzesten. Der Großteil der Patienten befindet sich jedoch im Stadium IV ($n=12$). Die fehlende Vergleichbarkeit der Fallzahlgrößen erschwert die statistische Aussagekraft. Dies gilt auch für die Korrelation der Antigen-Expressionen mit dem Patientenüberleben. Ein Beispiel dafür ist die Korrelation der Differenzgruppen von Notch4 mit dem Patientenüberleben in der Gruppe der Pankreaskarzinome. Während 9 Patienten mehr Antigenexpression im Tumorgewebe aufweisen, bestehen die restlichen beiden Gruppen jeweils aus $n=1$. Je größer und ähnlicher die Fallzahlgrößen, desto valider die statistische Aussagekraft.

5.2 Diskussion zur Rolle des Notch-Signalweges in Cholangio- und Pankreaskopfkarzinomen

Wie bereits im Kapitel 2.4 erläutert, gibt es diverse Publikationen über die Rolle des Notch-Signalweges in Tumoren. Neben der im Kapitel 2.4 genannten T-Zell-Leukämie und dem Mammakarzinom gibt es eine Vielzahl an Tumorentitäten, deren Entstehung mit dem Notch-Signalweg in Verbindung gebracht wird, beispielsweise Adenokarzinome der Lunge und Blasenkarzinome (Fernandez-Marcos et al., 2015). Gao et al. (2017) zeigen in ihrer Publikation

die Bedeutung des Notch-Signalwegs für Pankreaskarzinome, Cigliano et al. (2017) für Cholangiokarzinome.

In unserer Arbeit wurde die Expression wichtiger Proteine des Notch-Signalweges in Cholangio- und Pankreaskopfkarzinomen untersucht. Dabei waren die Mittelwerte der IHC-Scores in den drei Tumorentitäten durchschnittlich höher als in dem jeweiligen Normalgewebe. Für die entsprechenden Antigene wird in der Literatur ebenfalls überwiegend eine Überexpression im Tumorgewebe beschrieben.

Ringel et al. (2006) zeigen, dass ADAM17 in fortgeschrittenen pankreatischen intraepithelialen Neoplasien und in duktalem Adenokarzinomen des Pankreas (n=10) überexprimiert wird, während im Normalgewebe des Pankreas keine Expression vorliegt. Ferner zeigen Jiao et al. (2018) in ihrer Studie, dass ADAM17 in hilären Cholangiokarzinomen (n=49) im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert ist und einen unabhängigen negativ prognostischen Marker darstellt.

Zwar wird in den Pankreas-Normalgewebeproben unserer Arbeit ADAM17 exprimiert, jedoch weniger als im Tumorgewebe (Mittelwert IHC-Score für Pankreas-Normalgewebe 1,73 vs. Mittelwert IHC-Score für Pankreaskopfkarzinome 3,43). 73% der Patientenproben exprimieren mehr ADAM17 im Tumor- als im Normalgewebe. Der Unterschied der Mittelwerte der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe ist dabei statistisch signifikant ($p=0,008$). In unserer wissenschaftlichen Arbeit beträgt der Mittelwert für die IHC-Scores in extrahepatischen Cholangiokarzinomen 3,50 und der Mittelwert für die IHC-Scores im Gewebe extrahepatischer Gallengänge 2,95. Der Mittelwert der IHC-Scores in intrahepatischen Cholangiokarzinomen beträgt 3,78 und der Mittelwert für das Normalgewebe intrahepatischer Gallengänge 3,17. Damit wird eine vermehrte Expression von ADAM17 in Cholangiokarzinomen deutlich. In der Gruppe der extrahepatischen Cholangiokarzinome exprimieren 50% und in der Gruppe der intrahepatischen Cholangiokarzinome 53% der Karzinomproben mehr ADAM17 im Tumorgewebe. Jedoch sind die Unterschiede der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe nicht statistisch signifikant. Auch ein Zusammenhang zwischen Expression von ADAM17 und Überleben in den drei Tumorentitäten wie in den vorher genannten Studien konnte in unserem Patientenkollektiv nicht festgestellt werden. Dabei ist das Patientenkollektiv in unserer wissenschaftlichen Arbeit auch kleiner (für die Gruppe der extrahepatischen Cholangiokarzinome $n=17$, für die Gruppe der intrahepatischen Cholangiokarzinome $n=22$ und für die Gruppe der Pankreaskarzinome $n=11$), was eine Einschränkung der statistischen Aussagekraft bedeutet. Ferner wurden in unserer wissenschaftlichen Arbeit drei Gruppen mit dem Patientenüberleben korreliert: Patienten mit mehr Antigenexpression im Tumorgewebe, Patienten mit gleich hoher Antigenexpression im Tumor- und Normalgewebe sowie Patienten mit mehr Antigenexpression im Normalgewebe. Innerhalb jeder Gruppe, außer der Gruppe mit gleich hoher Expression im Tumor- und Normalgewebe, wurden mehrere IHC-Scores subsummiert. Die Korrelation mit dem Patientenüberleben unterscheidet sich daher stark von denen aus anderen Publikationen und kann zu einer unterschiedlichen Aussage führen. Bei Jiao et al. (2018) beispielsweise wurden die

Überlebenszeitkurven von ADAM17-positiven und ADAM17-negativen Proben miteinander verglichen; ein anderes Vorgehen als in unserer wissenschaftlichen Arbeit. Eine statistische Aussage hängt eng zusammen mit der Formulierung der Hypothese. Weitere Probleme einer direkten Vergleichbarkeit der Ergebnisse entstehen dadurch, dass in den beschriebenen Untersuchungen der ADAM17 Expression Paraffinschnitte verwendet wurden und nicht wie in unserer Arbeit Kryopräparate, wodurch unterschiedliche Färbeprotokolle mit folglich variierenden Quantifizierungen des Antigens zur Anwendung gekommen sind. Auch die Gratings sind nicht identisch mit denen in unserer wissenschaftlichen Arbeit. Bei Ringel et al. (2006) ist zudem nicht beschrieben, aus welcher genauen Lokalisation die Adenokarzinome des Pankreas stammen, während in unserer Arbeit nur duktale Adenokarzinome des Pankreaskopfes untersucht worden sind. Es darf auch nicht außer Acht gelassen werden, dass die Patientenkollektive unterschiedlich zusammengesetzt sind, vor Allem was TNM-Status, Alter, Geschlecht, Grading, Vor-Therapien etc. angeht. Vergleicht man die Expression von ADAM17 in Proben völlig unterschiedlicher Tumorstadien mit oder ohne Vorbehandlung des Tumors, ist ein direkter Vergleich nicht gegeben. Die Wichtigkeit von ADAM17 in diversen Entzündungsprozessen und in unterschiedlichen Tumorentitäten ist dennoch in vielen Studien belegt worden, wodurch das Interesse nach Inhibitoren dieses Antigens stetig wächst. Nach einigen vielversprechenden in vitro Experimenten mit bestimmten ADAM17-Inhibitoren auf Karzinom-Zelllinien wurden klinische Studien gestartet, obgleich erste Studien aufgrund starker Nebenwirkungen abgebrochen werden mussten. Jedoch wird z.B. die Wirkung des Inhibitors INCB7839 (Aderbarsib, Inhibitor von ADAM17 und ADAM10) in weiteren Studien z.B. für das diffus großzellige B-Zell-Lymphom wieder untersucht (Moss und Minond, 2017).

Die Rolle des HES1 in der Entstehung duktaler Adenokarzinome des Pankreas ist in einigen Studien untersucht worden. Eine Studie von Hidalgo-Sastre et al. (2016) zeigt, dass HES1 sowohl in zentroazinären Zellen des adulten Pankreas als auch in prämaligen und malignen Pankreaszellen exprimiert wird. In einem Maus Knockout-Modell für HES1 in pankreatischen Progenitorzellen konnten sie zeigen, dass HES1 einerseits für die Zelldifferenzierung und Integrität der azinären Zellen und andererseits in der Karzinogenese von pankreatisch intraepithelialen Neoplasien zu dukталen Adenokarzinomen des Pankreas eine wichtige Rolle spielt. Cao et al. (2015) haben in ihrer Studie Proben von Pankreaskarzinomen (n=72) auf HES1 immunhistochemisch untersucht und mittels Kaplan-Meier die Korrelation zwischen HES1-Expression und Patientenüberleben dargestellt. Von den 72 Proben wiesen 34 Proben eine high grade Expression auf; die restlichen Proben zeigten ein low (n=19) und moderate (n=19) Grading. Mittels Kaplan-Meier konnte ein Zusammenhang zwischen high grade Expression von HES1 und kürzerem Gesamt- sowie progressionsfreiem Überleben gezeigt werden. Ferner zeigt die Arbeit, dass pankreatische Sternzellen die Expression von HES1 in unterschiedlichen pankreatischen Karzinomzelllinien fördern und somit zu einer Chemotherapieresistenz gegen Gemcitabin führen. Durch Notch-Signalweg-Inhibitoren wie L1790 kann die Chemotherapieresistenz wieder rückgängig gemacht werden, wie auch andere in vitro Versuche bei Gliomen zeigen (Schreck et al., 2010). In einem Notch PCR Array von vier perihilären und

einem intrahepatischen Cholangiokarzinom (verglichen mit Normalgewebe) konnte keine signifikante Überexpression von HES1 festgestellt werden, während in einem größeren Kollektiv (n=48) eine signifikante Überexpression von HES1 gezeigt werden konnte (Guest et al., 2016). Für die Gruppe der extrahepatischen Cholangiokarzinome (n=132) zeigten Aoki et al. (2016), dass HES1 in 81,8% der Proben exprimiert war und eine Expression von HES1 mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist.

In unserer Arbeit beträgt der Mittelwert der IHC-Scores für HES1 im Normalgewebe des Pankreas 4,27 und liegt damit höher als im Tumorgewebe (Mittelwert IHC-Scores für Pankreaskarzinome 2,50). Der Unterschied der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe ist dabei statistisch signifikant ($p=0,012$). In dem Kollektiv der Pankreaskarzinome exprimieren 82% der Karzinomproben mehr HES1 im Normal- als im Tumorgewebe. Damit steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu einigen anderen Untersuchungen, die eine Überexpression von HES1 in Tumoren zeigen. Auch ein Zusammenhang zwischen HES1 Expression und Patientenüberleben konnte in unserer Arbeit nicht festgestellt werden. Zum einen sind in unserer wissenschaftlichen Arbeit nur Pankreaskopfkarzinome untersucht worden, während in der Studie um Cao et al. (2015) nur ca. 65% der Proben aus dem Pankreaskopf stammten. Zum anderen ist hier das Kollektiv kleiner (n=11 vs. n=72 bei Cao et al. (2015)) und es sind bei den Überlebenszeitanalysen andere Gruppen miteinander verglichen worden. Ferner sind Paraffinschnitte statt Kryopräparate und ein anderes Grading-System verwendet worden. In unserer wissenschaftlichen Arbeit beträgt der Mittelwert für die IHC-Scores in extrahepatischen Cholangiokarzinomen 3,44 und der Mittelwert für die IHC-Scores im Gewebe extrahepatischer Gallengänge 2,67 ($p=0,062$). 59% der Karzinomproben exprimieren mehr HES1 im Tumor- als im Normalgewebe. Der Mittelwert der IHC-Scores in intrahepatischen Cholangiokarzinomen beträgt 3,52 und der Mittelwert für das Normalgewebe intrahepatischer Gallengänge 3,09 ($p=0,299$). Auch in der Gruppe der intrahepatischen Cholangiokarzinome exprimieren 59% der Proben mehr HES1 im Tumorgewebe. In unserem Patientenkollektiv der Cholangiokarzinome gibt es also eine vermehrte Expression von HES1 im Karzinomgewebe, dabei ist der Unterschied der IHC-Scores von Tumor- zu Normalgewebe jedoch nicht statistisch signifikant. Auch eine Korrelation zwischen der HES1 Expression und dem Patientenüberleben konnte hier nicht wie in anderen Studien dargestellt werden. Neben der geringeren Fallzahl (z.B. n=17 für die Gruppe der extrahepatischen Cholangiokarzinome in unserer wissenschaftlichen Arbeit vs. n=132 in der Studie um Aoki et al. (2016)) wurden auch in unserer wissenschaftlichen Arbeit andere Gruppen mit dem Patientenüberleben korreliert. Zudem wurden in der Studie um Aoki et al. (2016) zwar Normalgewebe-Proben als Kontrolle mitgefärbt, jedoch nur acht Stück. Es fehlt bei dem Grading, welches sich auch von dem in unserer wissenschaftlichen Arbeit unterscheidet, überwiegend ein Referenzgewebe. Auch die klinischen Parameter und Vor-Therapien des Patientenkollektivs unterscheiden sich von denen in unserer Arbeit, was zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit führt. Die Rolle von HES1 in der Karzinogenese unterschiedlicher Tumorentitäten ist in diversen Publikationen beschrieben worden und führt konsequenterweise zur Frage nach Inhibitoren dieses Antigens. Eine Studie um Schnell et al. (2015) beispielsweise hat in vitro und in vivo (in

Mäusen) die starke antileukämische Wirkung eines HES1-aktivitätsmodulierenden Medikaments namens Perhexilin nachgewiesen.

Die Involvierung des Antigens Musashi in der Tumorentstehung ist für diverse Tumorentitäten beschrieben, auch im Pankreaskarzinom, wie Kudinov et al. (2017) beschreiben. Fox et al. (2016) konnten in allen untersuchten Pankreaskarzinomproben sowohl eine Expression von Musashi-1 als auch von Musashi-2 nachweisen. Ferner zeigen sie in ihrem Maus-Modell, dass die Krebsstammzellen bei der Progression von pankreatisch intraepithelialen Neoplasien zu duktalem Adenokarzinomen des Pankreas mehr Musashi exprimieren und zunehmend chemotherapieresistent sind. Sheng et al. (2017) haben die Rolle des Musashi-2 in Pankreaskarzinomen untersucht. Musashi-2 führt unter anderem zu einer Down-Regulation von Numb, einem Protein, das die p53-Degradation verhindert und ist somit unmittelbar an der Entstehung von Pankreaskarzinomen beteiligt. Eine Überexpression von Musashi-2 führt ferner zu einer Chemotherapieresistenz und negativ prognostisch klinisch-pathologischen Eigenschaften von Pankreaskarzinomen. Eine weitere Studie hat die Rolle von Musashi-2 in extrahepatischen Cholangiokarzinomen untersucht (Hu et al., 2018). Eine immunhistochemische Analyse von MSI-2 in dem Patientenkollektiv (n=78) zeigt, dass eine hohe MSI-2 Expression in den Tumoren mit Lymphknotenmetastasen und einer fortgeschrittenen TNM-Klassifikation assoziiert ist, mit einem schlechteren Patientenüberleben korreliert und einen unabhängigen negativ prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben darstellt.

In unserer Arbeit beträgt der Mittelwert der IHC-Scores im Pankreasgewebe 2,55 und im Tumorgewebe 3,36 ($p=0,125$). 55% der Pankreaskarzinomproben exprimieren mehr MSI-1 im Tumor- als im Normalgewebe. Obgleich im Tumorgewebe mehr MSI-1 exprimiert wird als im Normalgewebe, sind die Unterschiede nicht statistisch signifikant. In unserer wissenschaftlichen Arbeit beträgt ferner der Mittelwert der IHC-Scores für die extrahepatischen Cholangiokarzinome 3,72 und der Mittelwert der IHC-Scores extrahepatischer Gallengänge 3,10 ($p=0,100$). Der Mittelwert der IHC-Scores für die intrahepatischen Cholangiokarzinome beträgt 3,91 und für die intrahepatischen Gallengänge 3,30 ($p=0,122$). Sowohl 59% der extrahepatischen- als auch 59% der intrahepatischen Cholangiokarzinomproben weisen eine höhere MSI-1 Expression im Tumor- als im Normalgewebe auf. In dem Patientenkollektiv unserer wissenschaftlichen Arbeit liegt also eine höhere MSI-Expression im Tumorgewebe vor, doch wie auch bei der Untersuchung der Pankreaskarzinome nicht statistisch signifikant. Auch konnte weder für die Gruppe der Pankreaskarzinome noch für die Cholangiokarzinome ein Zusammenhang zwischen einer Überexpression des Antigens Musashi-1 und einem schlechteren Patientenüberleben festgestellt werden. Jedoch sind zum einen in den hier vorliegenden Studien hauptsächlich das Antigen Musashi-2 und nicht wie in unserer wissenschaftlichen Arbeit das Antigen Musashi-1 untersucht worden. Verglichen mit unserer wissenschaftlichen Arbeit fällt auch auf, dass in der Studie um Fox et al. (2016) bei der Analyse der MSI-Expression die genaue anatomische Herkunft der Pankreaskarzinome nicht genannt wird und dass sich das Grading-System von dem in unserer wissenschaftlichen Arbeit deutlich unterscheidet. Zum anderen

schränkt die Größe des Patientenkollektivs die statistische Aussagekraft der Kaplan-Meier-Kurven ein (beispielsweise n=17 für das Kollektiv der extrahepatischen Cholangiokarzinome in unserer wissenschaftlichen Arbeit vs. n=78 für das Kollektiv der extrahepatischen Cholangiokarzinome in der Studie um Hu et al. (2018)). Weitere Faktoren wie andere Grading-Systeme sowie unterschiedlich zusammengesetzte Patientenkollektive und Gruppen in der Kaplan-Meier-Analyse kommen hinzu. Aufgrund der untersuchten Rolle von Musashi in der Entstehung von Tumoren wird die Frage nach potentiellen Inhibitoren dieses Antigens laut. Fox et al. (2016) beispielsweise haben gezeigt, dass speziell entwickelte antisense-Nukleotide gegen MSI sowohl in vitro als auch in vivo (in Mäusen) ein weiteres Tumorwachstum im Pankreas verhindern können.

Eine Studie hat die Notch1 Expression in unterschiedlichen in der Entwicklung befindlichen Pankreasproben untersucht (Hu et al., 2013). 15 17-18 und 21-24 Wochen alte Pankreasproben sowie 13 0-3 Monate alte Pankreasproben sind auf Notch1 sowie HES1 immunhistochemisch untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass der Notch1-HES1-Signalweg während der frühen Pankreasentwicklung angeschaltet wird, bei der Geburt seine höchste Aktivität aufweist und nach der vollständigen Pankreasentwicklung wieder abgeschaltet wird, obgleich die Notch1 Expression weiterhin hochreguliert bleibt. Im Normalgewebe des Pankreas wird Notch1 in azinären und zentroazinären Zellen, jedoch nicht in duktaalen Zellen exprimiert. In allen Schweregraden der pankreatisch intraepithelialen Neoplasien ist kein Notch1 detektierbar. Eine Analyse von 66 duktaalen Adenokarzinomen des Pankreas jedoch zeigt in 33 Proben (50%) eine Notch1 Expression (gleichermaßen eine HES1 Expression). Hu et al. (2013) vermuten daher, dass Notch1 in normalem Pankreasgewebe in einem inaktiven Zustand vorliegt und bei 50% des entstandenen tumorösen Pankreasgewebes, bei der die HES1 Expression gleichermaßen nachweisbar ist, der während der Embryogenese aktive Notch1-HES1-Signalweg wieder reaktiviert wird. Ferner konnten sie keine Korrelation zwischen Notch1-Aktivierung in Pankreaskarzinomen und demographischen wie pathologischen Variablen (Tumorgröße und das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen) feststellen. Song et al. (2018) haben 24 Pankreaskarzinomproben u.a. auf Notch1 untersucht und eine Notch1 Expression in allen Proben vorgefunden, wovon die überwiegende Mehrheit ein hohes Grading für das Antigen vorweist. Eine Kontrolle mit Normalgewebeproben ist jedoch nicht erfolgt. In einer Metaanalyse sind über 35 Studien (6187 Proben) ausgewertet worden, die die Notch1 Expression u.a. in Pankreaskarzinomen untersucht haben (Zhang et al., 2018). Dabei konnten sie keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Normalgewebeproben und Pankreaskarzinomproben feststellen. Die Notch1 Expression ist auch in intrahepatischen Cholangiokarzinomen untersucht worden. In einer Studie wurden 44 intrahepatische Cholangiokarzinome auf Notch1 angefärbt, wobei sich bei der Mehrzahl der Proben eine Überexpression des Antigens im Zytoplasma und an der Zellmembran gezeigt hat (35/44). Eine Notch1-Positivität der Proben zeigte sich vor allem bei Patienten, die eine Tumorgröße über 5cm aufwiesen und HBs-Ag positiv waren (Wu et al., 2014a). Eine weitere Studie untersuchte ebenfalls die Expression von Notch1 in intrahepatischen Cholangiokarzinomen (n=5) und fand eine Expression des Antigens an der Zellmembran und im

Zytoplasma in allen untersuchten Proben, während im Normalgewebe außer einer schwachen Färbung einiger Zellen keine Expression vorlag (Zhou et al., 2013). Eine Studie um Yoon et al. (2011) hat u.a. die Notch1 Expression in extrahepatischen Cholangiokarzinomen (n=110) untersucht. In 96 Proben (87%) war Notch1 im Zytoplasma detektierbar und in 18 Fällen (16%) ist sowohl eine zytoplasmatische als auch eine nukleäre Färbung erkennbar gewesen. In nicht-neoplastischen Zellen zeigte sich lediglich eine schwache zytoplasmatische Färbung. Zudem war die Notch1 Expression mit einem höheren TNM-Stadium assoziiert. Eine weitere Studie um Aoki et al. (2016) zeigt eine Notch1-Positivität in 66 von 132 Proben (50%) extrahepatischer Cholangiokarzinome, während im Normalgewebe keine Expression des Antigens gefunden wurde. Mehr Patienten mit einem höheren Grading (G2/3) exprimierten Notch1 als Patienten mit einem niedrigen Grading (G1). Jedoch gab es keine weiteren statistisch signifikanten Korrelationen zwischen Notch1 Expression und klinisch-pathologischen Eigenschaften des Tumors. Patienten, die mindestens einen Notch-Rezeptor (Notch1, Notch2, Notch3) im Tumorgewebe exprimierten, lebten kürzer als Patienten, deren Tumorgewebe keinen Notch-Rezeptor exprimierte.

In unserer Arbeit beträgt der Mittelwert der IHC-Scores von Notch1 für das Normalgewebe des Pankreas 0,64 und für die Pankreaskarzinome 2,21. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den IHC-Scores von Tumor- und Normalgewebe ($p=0,012$). 73% der Pankreaskarzinomproben exprimieren mehr Notch1 im Tumor- als im Normalgewebe. Diese Werte stammen jedoch aus einem kleinen Kollektiv (n=11) und stehen deshalb möglicherweise im Widerspruch zur Metaanalyse um Zhang et al. (2018), die eine Vielzahl an Proben und Studien ausgewertet haben. Anzumerken bleibt jedoch, dass bei solch einer großen Analyse die Vergleichbarkeit der Proben, klinischen Parameter der Patienten, immunhistochemischen Anfärbungsmethoden und Auswertungs- bzw. Grading-Systeme berücksichtigt werden müssen. Es konnte in unserer wissenschaftlichen Arbeit wie bei Song et al. (2018) jedoch kein Zusammenhang zwischen Notch1 Expression und Überleben von Pankreaskarzinompatienten festgestellt werden. In unserer wissenschaftlichen Arbeit beträgt der Mittelwert der IHC-Scores in intrahepatischen Cholangiokarzinomen 2,87 und im Normalgewebe 1,78 ($p=0,000$). 82% der intrahepatischen Cholangiokarzinome exprimieren mehr Notch1 im Tumor- als im Normalgewebe. Für die extrahepatischen Cholangiokarzinome beträgt der Wert 2,83 und für das Normalgewebe 2,57 ($p=0,472$). Bei den extrahepatischen Cholangiokarzinomen sind es 47% der Proben, die eine höhere Notch1 Expression im Tumorgewebe aufweisen. Damit zeigt sich bei den Gallengangskarzinomen nur bei den intrahepatischen Cholangiokarzinomen ein statistisch signifikanter Unterschied zum Normalgewebe. Für beide Tumorentitäten ist jedoch keine Korrelation der Notch1 Expression mit dem Patientenüberleben erkennbar. Unterschiede der anderen Studien zu unserer wissenschaftlichen Arbeit ergeben sich beispielsweise aus einer anderen Fixierung der Proben mit folglich anderem Färbeprotokoll, anderen Grading-Systemen der Proben sowie einem unterschiedlich zusammengesetzten Patientenkollektiv. Ein weiterer wesentlicher Faktor für diesen Unterschied zu den anderen Studien kann durch das vergleichsweise kleinere Patientenkollektiv (n=17 für extrahepatische und n=22 für

intrahepatische Cholangiokarzinome vs. z.B. n=132 bei Aoki et al. (2016) für extrahepatische Cholangiokarzinome) in unserer wissenschaftlichen Arbeit sowie unterschiedliche Gruppen (bei Aoki et al. (2016) sind Notch1-positive und Notch1-negative Proben mit dem Patientenüberleben korreliert worden) für die Überlebenszeitanalysen bedingt sein. Die wichtige Rolle von dem Notch-Signalweg in der Entstehung diverser Tumorentitäten ist in einer Vielzahl an Publikationen bereits beschrieben worden. Dieser Signaltransduktionsweg interagiert zudem mit unterschiedlichen kanzerogenen Signalwegen wie z.B. Ras, Akt und NF-κB. So führt dessen Inhibition synergistisch zu den beschriebenen Effekten eines verlangsamten Zellwachstums, einer erhöhten Apoptoserate etc. Konsequenterweise kommt die Frage nach Inhibitoren des Notch-Signalwegs auf. Bei dem Rezeptor Notch1 hat beispielsweise eine in vitro Untersuchung um Liao et al. (2018) die Wirkung einer siRNA induzierten Notch1-Inhibition in einer kolorektalen Karzinom-Zelllinie untersucht. Eine Notch1-Inhibition führte unter anderem zu einem verlangsamten Zellwachstum und Apoptose der Karzinomzellen. Obgleich die Frage nach der Wirkung spezifischer Notch-Inhibitoren zunehmend Bestandteil wissenschaftlicher Untersuchungen ist, sind die derzeit in klinischen Studien befindlichen Medikamente, Gamma-Sekretase-Inhibitoren, in ihrer Wirkung nicht spezifisch. Es zeigen sich erste Toxizitäten (gastrointestinal) und auch Langzeitfolgen bleiben zunächst ungeklärt. Dennoch wird in die Entwicklung neuer Notch-Inhibitoren investiert, da erste Ergebnisse klinischer Studien vielversprechend scheinen (Purow, 2012).

Die bereits genannte Studie um Song et al. (2018), in der die Expression von Notch-Rezeptoren in duktalem Adenokarzinomen des Pankreas analysiert worden ist, gibt auch Aufschluss über die Notch4 Expression in Pankreaskarzinomen. 41,7% der 24 analysierten Proben waren Notch4-negativ, 20,8% zeigten eine schwach positive Färbung, 37,5% waren Notch4-positiv und 4,2% zeigten eine starke Positivität für das Antigen. Im Vergleich zu den anderen Notch-Rezeptoren (beispielsweise Notch1) war Notch4 deutlich weniger exprimiert. In einer weiteren Studie mit Zelllinien vom Pankreaskarzinom war eine vermehrte Expression von Notch4 nachweisbar verglichen mit einer nicht-neoplastischen pankreatischen Zelllinie (Qian et al., 2016). Für die Gruppe der intrahepatischen Cholangiokarzinome kann eine weitere Studie um Wu et al. (2014b) herangezogen werden. Von den 41 intrahepatischen Cholangiokarzinomen wiesen 10 Proben ein low grading und 4 Proben ein high grading auf. Im Normalgewebe wurde Notch4 im Zytoplasma und im Nukleus exprimiert und das Tumorgewebe wies statistisch signifikant mehr Notch4 auf. Eine Notch4 Expression in Tumorzellen des intrahepatischen Cholangiokarzinoms war statistisch signifikant mit einem schlechteren Patientenüberleben assoziiert. In der Studie um Zhou et al. (2013), in der auch die Notch1 Expression analysiert worden ist, wurde kein statistisch signifikanter Unterschied der Notch4 Expression zwischen Tumor- (intrahepatisches Cholangiokarzinom) und Normalgewebe festgestellt (n=5). Aoki et al. (2016) haben nicht nur die Notch1 Expression in extrahepatischen Cholangiokarzinomen (n=132) untersucht, sondern auch die Notch4 Expression. In nur 6,1% des Kollektivs konnte eine Notch4-Positivität nachgewiesen werden. Es ist keine signifikante Korrelation zwischen klinisch-pathologischen Faktoren und der Expression von Notch4-Rezeptoren festgestellt worden. In einer weiteren Studie um Yoon et al.

(2011) wurde neben der Notch1 Expression auch die Notch4 Expression in extrahepatischen Cholangiokarzinomen (n=110) untersucht. In 103 der 110 (ca. 94%) Proben war eine Notch4-Positivität nachweisbar, in 99 (90%) Proben war zudem neben einer zytoplasmatischen auch eine nukleäre Färbung erkennbar. Eine zytoplasma-nukleäre Anfärbung von Notch4 war mit einem schlechteren histologischen Differenzierungsgrad des Tumors assoziiert. Ansonsten war eine Notch4 Expression weder mit klinisch-pathologischen Eigenschaften des Tumors statistisch signifikant korreliert, noch gab es einen Zusammenhang zwischen der Expression dieses Antigens und dem Patientenüberleben.

In unserer Arbeit beträgt der Mittelwert der IHC-Scores von Notch4 im Pankreaskarzinom 2,86 und im Normalgewebe 0,91. Damit besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe ($p=0,008$), wie auch bei der Notch1 Expression in Pankreaskarzinomen. 82% der Pankreaskarzinom-Proben exprimieren mehr Notch4 im Tumor- als im Normalgewebe. Im Gegensatz zu der Studie um Song et al. (2018) konnte in diesem Patientenkollektiv keine höhere Expression von Notch1 verglichen mit Notch4 in Pankreaskarzinomen festgestellt werden (Mittelwert IHC-Scores für Notch1 2,21 vs. Mittelwert IHC-Scores für Notch4 2,86). Wie bereits erwähnt, fehlte bei der Studie um Song et al. (2018) eine Kontrolle mit Normalgewebe-Proben, was zu einer eingeschränkten Aussagekraft führt. Ferner ist kein Zusammenhang zwischen Notch4 Expression und Patientenüberleben in der Gruppe der Pankreaskarzinome feststellbar. In unserer wissenschaftlichen Arbeit beträgt der Mittelwert der IHC-Scores in intrahepatischen Cholangiokarzinomen 3,22 und im Normalgewebe 2,96 ($p=0,155$). 50% der intrahepatischen Cholangiokarzinomproben exprimieren mehr Notch4 im Tumor- als im Normalgewebe. Für die extrahepatischen Cholangiokarzinome beträgt der Wert 2,78 und für das Normalgewebe 3,05 ($p=0,629$). Nur 29% der extrahepatischen Cholangiokarzinomproben exprimieren mehr Notch4 im Tumorgewebe; es wird mehr Notch4 im Normalgewebe extrahepatischer Gallengänge exprimiert. Es konnte also weder für das intrahepatische noch für das extrahepatische Cholangiokarzinom statistisch signifikant mehr Notch4 im Tumorgewebe nachgewiesen werden, wie auch die Studien um Zhou et al. (2013) für die intrahepatischen und Aoki et al. (2016) für die extrahepatischen Cholangiokarzinome nahelegen. Obgleich Wu et al. (2014b) eine statistisch signifikante Korrelation der Notch4 Expression in intrahepatischen Cholangiokarzinomen mit einem schlechteren Patientenüberleben nachweisen konnten, gab es in unserer wissenschaftlichen Arbeit weder für die intra- noch für die extrahepatischen Cholangiokarzinome einen Zusammenhang zwischen Notch4 Expression und Patientenüberleben. Dabei sollte jedoch bedacht werden, dass die Patientenkollektivgröße wieder große Unterschiede aufweist (hier $n=17$ für extra- und $n=22$ für intrahepatische Cholangiokarzinome vs. beispielsweise $n=110$ für extrahepatische Cholangiokarzinome in der Studie von Yoon et al. (2011)) und die Gruppen für die Überlebenszeitanalyse sich unterscheiden (in Wu et al. (2014b) werden Notch4-positive und Notch4-negative Proben mit dem Patientenüberleben korreliert und nicht wie in unserer wissenschaftlichen Arbeit drei Gruppen, die sich auf die jeweilig unterschiedlich hohe Antigen-Expression im Tumor- und Normalgewebe beziehen). In dem Abschnitt zum Antigen Notch1 ist bereits auf die allgemeinen

Notch-Inhibitoren eingegangen worden. In der bereits erwähnten Studie um Qian et al. (2016) wurde mittels siRNA die Notch4 Expression unterbunden, was in vitro zu einer eingeschränkten Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen sowie einer verstärkten Chemosensitivität geführt hat. Dies zeigt nochmal die in vitro existierende anti-kanzerogene Wirkung einer Notch-Inhibition auf, die in klinischen Studien Hoffnung auf eine ähnliche Wirkung in vivo erweckt.

Für das Antigen CD44 haben Li et al. (2015) die Bedeutung einer Überexpression für das Pankreaskarzinom dargestellt. Sie haben in ihrer Studie, in der sie u.a. eine immunhistochemische Analyse von CD44 in Pankreaskarzinom-Proben (n=67) sowie eine klinische Datenerhebung durchgeführt haben, festgestellt, dass in ihrem Kollektiv an Pankreaskarzinomen eine Überexpression dieses Antigens vorliegt und ungünstige klinische Merkmale des Tumors wie Lymphknotenmetastasen mit der Antigenexpression assoziiert sind. Eine weitere Untersuchung hat gezeigt, dass das CD44 Standard-Isomer in Pankreaskarzinom-Zelllinien nach hoch dosierter Röntgenstrahlung vermehrt exprimiert wird und zu einer Radioresistenz der Karzinomzellen durch molekulare Mechanismen wie die epithelial-mesenchymale Transition führt (Tsubouchi et al., 2017). Diese Untersuchungen zeigen, dass eine Überexpression von CD44 in Pankreaskarzinomen ein ungünstiger prognostischer Faktor ist und zu Therapieresistenzen wie der Radio- oder auch Chemotherapieresistenz (Zhao et al., 2016) führen kann. Die CD44 Expression in intrahepatischen Cholangiokarzinomen (n=35) ist in einer Studie um Morine et al. (2017) untersucht worden (22 Proben waren CD44-positiv, 13 CD44-negativ) und war mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Ferner zeigt eine multivariate Analyse in dieser Studie, dass eine CD44-Positivität in intrahepatischen Cholangiokarzinomen einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt.

In unserer Arbeit zeigt sich sowohl in der Gruppe der extra- (Mittelwert IHC-Score für das Tumorgewebe 3,94 vs. Mittelwert IHC-Score für Normalgewebe 3,43, p=0,043) und der intrahepatischen Cholangiokarzinome (Mittelwert IHC-Score für das Tumorgewebe 4,04 vs. Mittelwert IHC-Score für Normalgewebe 3,48, p=0,026) als auch der Pankreaskarzinome (Mittelwert IHC-Score für das Tumorgewebe 3,64 vs. Mittelwert IHC-Score für Normalgewebe 2,27, p=0,012) eine vermehrte Expression des Antigens CD44 im Tumorgewebe verglichen mit dem jeweiligen Normalgewebe. In der Gruppe der Pankreaskarzinome exprimieren sogar 82% der Proben mehr CD44 im Tumor- als im Normalgewebe. In jeder Tumorentität war der Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe dabei statistisch signifikant. Im Gegensatz zu den oben dargestellten Studien konnte in unserem Patientenkollektiv kein Zusammenhang zwischen Expression des Antigens und Patientenüberleben festgestellt werden. Auch hier war das Patientenkollektiv kleiner (für die Gruppe der extrahepatischen Cholangiokarzinome n=17, für die Gruppe der intrahepatischen Cholangiokarzinome n=22 und für die Gruppe der Pankreaskarzinome n=11), was zu einer verminderten statistischen Aussagekraft führt. Zudem wurden für die Kaplan-Meier-Berechnungen andere Gruppen miteinander verglichen. In den beschriebenen Publikationen sind ferner Paraffinschnitte statt Kryopräparate sowie ein anderes Grading-System verwendet worden. Bei Li et al. (2015) sowie Morine et al. (2017) fehlt zudem

ein Vergleich der CD44 Expression in normalem Pankreas- bzw. intrahepatischem Gallengangsgewebe. Dadurch fehlt ein wichtiger Referenzwert für das Grading in den Pankreas- und Cholangiokarzinomproben. Ferner stammen bei Li et al. (2015) nur ca. 72% der Proben aus dem Pankreaskopf, während in unserer Arbeit alle Proben aus dieser Lokalisation stammen. Auch die klinischen Parameter und Vor-Therapien des Patientenkollektivs um Li et al. (2015) und Morine et al. (2017) unterscheiden sich von denjenigen in unserer wissenschaftlichen Arbeit, was zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der Ergebnisse führt. Aufgrund der Überexpression von CD44 in diversen Tumorentitäten rückt die Entwicklung von Inhibitoren dieses Antigens immer weiter in den wissenschaftlichen Fokus. Beispielsweise wurde RG7356, ein humanisierter anti-CD44 Antikörper, in einer Phase-I-Studie bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie getestet (Vey et al., 2016).

6. Schlussfolgerung und Fazit

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war es, die Rolle des in diversen Tumorentitäten als dysreguliert beschriebenen Notch-Signalweges in intra- und extrahepatischen Cholangio- sowie Pankreaskarzinomen zu untersuchen. Dazu gehörte zum einen der Vergleich der Expression wichtiger Signalproteine wie ADAM17, Notch1, Notch4, MSI, HES1 und CD44 im Tumor- und Normalgewebe. Zum anderen sind wichtige Patientendaten des aus insgesamt 60 Patienten bestehenden Patientenkollektivs wie z.B. Geschlecht, Alter bei Diagnose, TNM-Status und daraus folgend UICC Stadien aus unterschiedlichen Datenbanken zusammengetragen worden. Diese Informationen wurden letztendlich zusammengeführt, um erst festzustellen, ob wichtige Proteine des Notch-Signalweges im Tumor- oder Normalgewebe vermehrt exprimiert werden und dann zu analysieren, welchen Einfluss eine hohe oder niedrige Antigenexpression jeweils auf das Patientenüberleben hat.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in dem Patientenkollektiv bestehend aus intra- und extrahepatischen sowie Pankreaskopfkarzinomen insgesamt eine höhere und zum Teil statistisch signifikante Antigenexpression wichtiger Signalproteine des Notch-Signalweges im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte und sich die drei Tumorentitäten hinsichtlich einiger klinischer Parameter und Antigenexpressionen signifikant unterscheiden. Es konnten jedoch nur bei der Korrelation der klinischen Parameter mit dem Patientenüberleben statistisch signifikante Überlebenszeitkurven dargestellt werden- eine höhere oder niedrige Antigenexpression von Proteinen des Notch-Signalweges im Tumor- oder Normalgewebe hat nach den vorliegenden Daten keinen Einfluss auf das Patientenüberleben.

In der Literatur sind für fast alle in diesen hier untersuchten Antigenen in Cholangio- und Pankreaskarzinomen eine Überexpression im Tumorgewebe sowie ein negativer prognostischer Einfluss auf das Patientenüberleben dargestellt worden. Die Publikationen sind jedoch aufgrund unterschiedlicher Untersuchungsmethoden nicht immer direkt vergleichbar mit der hier vorliegenden Arbeit. Ein zentraler Aspekt ist vor allem die kleine Kollektivgröße in dieser Arbeit, die teilweise zehnfach größeren Kollektiven aus anderen Publikationen entgegensteht.

Somit lässt sich abschließend festhalten, dass die wissenschaftlichen Erkenntnisse dieser Arbeit, die für einige Proteine des Notch-Signalwegs eine signifikante Überexpression im Tumorgewebe ohne Einfluss auf das Patientenleben zeigen, in einem größeren Kollektiv untersucht werden sollten, um die statische Aussagekraft zu erhöhen. So lässt sich zum einen feststellen, ob die Ergebnisse reproduzierbar sind und zum anderen, ob in einem größeren Kollektiv doch z.B. ein negativer Effekt einer Überexpression im Tumorgewebe auf das Patientenüberleben nachgewiesen werden kann. Die bisherige Literatur zum Thema Notch-Signalweg betont seine Bedeutung für die Kanzerogenese diverser Tumorentitäten, wodurch sich neue therapeutische Ansätze ergeben. In der Tumorthherapie erlangen Inhibitoren des Notch-Signalwegs (v.a. Gamma-Sekretase-Inhibitoren) immer mehr Aufmerksamkeit- in ersten klinischen Studien scheinen sie

vor allem in Kombination mit anderen Therapien einen neuen prognoseverbessernden Ansatz in der Behandlung schwer verlaufender Tumorerkrankungen zu bieten.

Literaturverzeichnis

Aoki, S.; Mizuma, M.; Takahashi, Y.; Haji, Y.; Okada, R.; Abe, T.; Karasawa, H.; Tamai, K.; Okada, T.; Morikawa, T.; Hayashi, H.; Nakagawa, K.; Motoi, F.; Naitoh, T.; Katayose, Y.; Unno, M. (2016): Aberrant activation of Notch signaling in extrahepatic cholangiocarcinoma: clinicopathological features and therapeutic potential for cancer stem cell-like properties. In: *BMC Cancer*; 16(1):854.

Balletshofer, B.; Claussen, C.D.; Häring, H.-U. (2009): Tumormarker. In: Balletshofer, B.; Claussen, C.D.; Häring, H.-U. (Hrsg.): *Leber und Gastrointestinaltrakt*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S. 122.

Beckh, K. (2013): Cholangiozelluläres Karzinom. In: Koop, I. (Hrsg.): *Gastroenterologie compact. Alles für Klinik und Praxis*. 3. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, S. 509-511.

Böhm, B.O. (2013): Klinische Manifestationen endokriner Tumoren des Pankreas. In: Beger, H.G.; Büchler, M.W.; Dralle, H.; Lerch, M.M.; Malfertheiner, P.; Mössner, J.; Riemann, J.F. (Hrsg.): *Erkrankungen des Pankreas. Evidenz in Diagnostik, Therapie und Langzeitverlauf*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, S. 211.

Bolm, L.; Wellner, U.F.; Keck, T. (2018): Pankreaskarzinom. In: Germer, C.-T.; Keck, T.; Grundmann, R.T. (Hrsg.): *Evidenzbasierte Viszeralchirurgie maligner Erkrankungen. Leitlinien und Studienlage*. Berlin: Springer Verlag, S. 177.

Bolós, V.; Mira, E.; Martínez-Poveda, B.; Luxán, G.; Cañamero, M.; Martínez-A, C.; Mañes, S.; de la Pompa, J.L. (2013): Notch activation stimulates migration of breast cancer cells and promotes tumor growth. In: *Breast Cancer Res*; 15(4): R54.

Brierley, J.D.; Gospodarowicz, M.K.; Wittekind, C. (2017): *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th Edition.

Brosius, F. (2011): Lage der Werte beschreiben. In: Brosius, F. (Hrsg.): *SPSS 19*. Heidelberg, München, Landsberg, Frechen, Hamburg: mitp, S. 401.

Büchler, M.W.; Uhl, W.; Malfertheiner, P. (2004): Tumore des Pankreas. In: Büchler, M.W.; Uhl, W.; Malfertheiner, P. (Hrsg.): *Pankreaserkrankungen*. 2. Auflage, Basel: S. Karger AG, S. 136.

Bupathi, M.; Ahn, D.H.; Bekaii-Saab, T. (2017): Therapeutic options for intrahepatic cholangiocarcinoma. In: *Hepatobiliary Surg Nutr*; 6(2):91–100.

- Cao, F.; Li, J.; Sun, H.; Liu, S.; Cui, Y.; Li, F. (2015): HES 1 is essential for chemoresistance induced by stellate cells and is associated with poor prognosis in pancreatic cancer. In: *Oncol Rep*; 33(4):1883-1889.
- Cao, Y.; Kang, Q.; Zhao, Z.; Zolkiewska, A. (2002): Intracellular processing of metalloprotease disintegrin ADAM12. In: *J Biol Chem*; 277(29):26403-26411.
- Carus, T. (2010): Diagnostische Laparoskopie. In: Carus, T. (Hrsg.): *Operationsatlas laparoskopische Chirurgie*. 2. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, S. 45.
- Chari, S.T. (2007): Pancreatic cancer. In: Talley, N.J.; Locke III., G.R.; Saito, Y.A. (Hrsg.): *GI Epidemiology*. Massachusetts: Blackwell Publishing, S. 228.
- Chin, V.; Nagrial, A.; Sjoquist, K.; O'Connor, C.A.; Chantrell, L.; Biankin, A.V.; Scholten, R.J.; Yip, D. (2018): Chemotherapy and radiotherapy for advanced pancreatic cancer. In: *Cochrane Database Syst Rev*; 3:CD011044.
- Cigliano, A.; Wang, J.; Chen, X.; Calvisi, D. (2017): Role of the Notch signaling in cholangiocarcinoma. In: *Expert Opin Ther Targets*; 21(5):471-483.
- Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (2018): Pankreastumoren. In: Deutsche Krebsgesellschaft (Hrsg.): *Gastrointestinale Tumore*. 1. Auflage, München: Elsevier GmbH, S. 362.
- Felix, R.; Langer, R.; Langer, M. (1993): Gallengangskarzinom. In: Felix, R.; Langer, R.; Langer, M. (Hrsg.): *Bildgebende Diagnostik bei Lebererkrankungen*, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, S. 123.
- Fernandez-Marcos, P.J.; Serrano, M.; Maraver, A. (2015): Bladder cancer and the Notch pathway. In: *Oncotarget*; 6(3):1346–1347.
- Fiji (2018): <https://fiji.sc/> (abgerufen am 01.07.2018).
- Fox, R.G.; Lytle, N.K.; Jaquish, D.V.; Park, F.D.; Ito, T.; Bajaj, J.; Koechlein, C.S.; Zimdahl, B.; Yano, M.; Kopp, J.; Kritzik, M.; Sicklick, J.; Sander, M.; Grandgenett, P.M.; Hollingsworth, M.A.; Shibata, S.; Pizzo, D.; Valasek, M.; Sasik, R.; Scadeng, M.; Okano, H.; Kim, Y.; MacLeod, A.R.; Lowy, A.M.; Reya, T. (2016): Image-based detection and targeting of therapy resistance in pancreatic adenocarcinoma. In: *Nature*; 534(7607):407-411.
- Füeßl, H.S. und Middeke, M. (2010): Organpalpation. In: Füeßl, H.S. und Middeke, M. (Hrsg.): *Anamnese und Klinische Untersuchung*. 4. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, S. 228.
- Gao, J.; Long, B.; Wang, Z. (2017): Role of Notch signaling pathway in pancreatic cancer. In: *Am J Cancer Res*; 7(2):173–186.

García-Peydró, M.; Fuentes, P.; Mosquera, M.; García-León, M.J.; Alcain, J.; Rodríguez, A.; García de Miguel, P.; Menéndez, P.; Weijer, K.; Spits, H.; Scadden, D.T.; Cuesta-Mateos, C.; Muñoz-Calleja, C.; Sánchez-Madrid, F.; Toribio, M.L. (2019): The NOTCH1/CD44 axis drives pathogenesis in a T cell acute lymphoblastic leukemia model. In: *J Clin Invest*; 128(7):2802-2818.

Gerok, W. und H.E., Blum (2007): Krankheiten der Leber und des biliären Systems. In: Gerok, W.; Huber, C.; Meinertz, T.; Zeidler, H. (Hrsg.): *Die Innere Medizin. Referenzwerk für den Facharzt*. 11. Auflage, Stuttgart: Schattauer GmbH, S. 698.

Goriki, A.; Seiler, R.; Wyatt, A.W.; Contreras-Sanz, A.; Bhat, A.; Matsubara, A.; Hayashi, T.; Black, P.C. (2018): Unravelling disparate roles of NOTCH in bladder cancer. In: *Nat Rev*; 15(6):345-357.

Goto, N.; Ueo, T.; Fukuda, A.; Kawada, K.; Sakai, Y.; Miyoshi, H.; Taketo, M.M.; Chiba, T.; Seno, H. (2017): Distinct Roles of HES1 in Normal Stem Cells and Tumor Stem-like Cells of the Intestine. In: *Cancer Res*; 77(13):3442-3454.

Guest, R.V.; Boulter, L.; Dwyer, B.J.; Kendall, T.J.; Man, T.Y.; Minnis-Lyons, S.E.; Lu, W.Y.; Robson, A.J.; Gonzalez, S.F.; Raven, A.; Wojtacha, D.; Morton, J.P.; Komuta, M.; Roskams, T.; Wigmore, S.J.; Sansom, O.J.; Forbes, S.J. (2016): Notch3 drives development and progression of cholangiocarcinoma. In: *Proc Natl Acad Sci USA*; 113(43):12250-12255.

Hahn, J.-M. (2010): Tumoren der Gallenwege. In: Hahn, J.-M. (Hrsg.): *Checkliste Innere Medizin*. 6. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, S. 414.

Han, J.; Hendzel, M.J.; Allalunis-Turner, J. (2011): Notch signaling as a therapeutic target for breast cancer treatment? In: *Breast Cancer Res*; 13(3):210.

Hantschke, M. und Palmedo, G. (2016): Immunhistologische Techniken. In: Cerroni, L.; Garbe, C.; Metze, D.; Kutzner, H.; Kerl, H. (Hrsg.): *Histopathologie der Haut*. 2. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, S. 19.

Haubeck, H.-D. (2013): Disintegrin-Metalloproteinasen. In: Gressner, A.M. und Arndt, T. (Hrsg.): *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, S. 406.

Heidecke, C.-D.; Brauer, R.B.; Fink, U.; Kissel, K.; Roder, J.D. (2000): Primäre Leberkarzinome. In: Roder, J.D.; Stein, H.J.; Fink, U. (Hrsg.): *Therapie gastrointestinaler Tumoren. Prinzipien der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, S. 259.

Herold, G. (2013): Tumoren der Gallenblase und Gallenwege. In: Herold, G. und Mitarbeiter (Hrsg.): *Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung*, Köln: Gerd Herold, S. 570.

- Hidalgo-Sastre, A.; Brodylo, R.L.; Lubeseder-Martellato, C.; Sipos, B.; Steiger, K.; Lee, M.; von Figura, G.; Grünwald, B.; Zhong, S.; Trajkovic-Arsic, M.; Neff, F.; Schmid, R.M.; Siveke, J.T. (2016): Hes1 Controls Exocrine Cell Plasticity and Restricts Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in a Mouse Model. In: *Am J Pathol*; 186(11):2934-2944.
- Hirner, A. und Weise, K. (2004): Gallenblase und Gallenwege. In: Hirner, A. und Weise, K. (Hrsg.): *Chirurgie. Schnitt für Schnitt*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S. 540.
- Hoffmann, K. und Schemmer, P. (2017): Leber, Gallenblase und Gallenwege. In: Billmann, F. und Keck, T. (Hrsg.): *Facharztwissen Viszeral- und Allgemein Chirurgie*, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, S. 184-185.
- Hu, F.; Liu, C.; Xie, F.; Lin, X.; Yang, J.; Wang, C.; Huang, Q. (2018): MSI2 knockdown represses extrahepatic cholangiocarcinoma growth and invasion by inhibiting epithelial-mesenchymal transition. In: *Onco Targets Ther*; 11:4035-4046.
- Hu, H.; Zhou, L.; Awadallah, A.; Xin, W. (2013): Significance of Notch1-signaling pathway in human pancreatic development and carcinogenesis. In: *Appl Immunohistochem Mol Morphol*; 21(3):242-247.
- Huhnstock, K.; Kutscha, W.; Dehmel, H. (2013): Angiologie. In: Huhnstock, K.; Kutscha, W.; Dehmel, H. (Hrsg.): *Diagnose und Therapie in der Praxis*. 5. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, S. 356.
- Illic, M. und Illic, I. (2016): Epidemiology of pancreatic cancer. In: *World J Gastroenterol*; 22(44):9694–9705.
- Jiao, X.; Yu, W.; Qian, J.; Chen, Y.; Wie, P.; Fang, W.; Yu, G. (2018): ADAM-17 is a poor prognostic indicator for patients with hilar cholangiocarcinoma and is regulated by FoxM1. In: *BMC Cancer*; b18(1):570.
- Karges, W. und Al Dahouk, S. (2011): Gastroenterologie. In: Karges, W. und Al Dahouk, S. (Hrsg.): *Innere Medizin*. In 5 Tagen. 2. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, S. 222.
- Kay, S.K.; Harrington, H.A.; Shepherd, S.; Brennan, K.; Dale, T.; Osborne, J.M.; Gavaghan, D.J.; Byrne, H.M. (2017): The role of the Hes1 crosstalk hub in Notch-Wnt interactions of the intestinal crypt. In: *PLoS Comput Biol*; 13(2):e1005400.
- Kornek, G. und Schima, W. (2010): Gallenblasen- und Gallengangskarzinom. Klinische Symptomatik. In: Hiddemann, W. und Bartram, C. (Hrsg.): *Die Onkologie*. 2. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, S. 924.
- Krams, M.; Frahm, S.O.; Kellner, U.; Mawrin, C. (2013): Hepatobiliäres System und Pankreas. In: Krams, M.; Frahm, S.O.; Kellner, U.; Mawrin, C. (Hrsg.): *Kurzlehrbuch Pathologie*. 2. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, S. 313.

Kudinov, A.E.; Karanicolas, J.; Golemis, E.A.; Bumber, Y. (2017): Musashi RNA-Binding Proteins as Cancer Drivers and Novel Therapeutic Targets. In: *Clin Cancer Res*; 23(9):2143-2153.

Kume, T. (2012): Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation. In: *Adv Exp Med Biol*; 727:210-222.

Kunlabut, K.; Vaeteewoottacharn, K.; Wongkham, C.; Khuntikeo, N.; Waraasawapati, S.; Pairojkul, C.; Wongkham, S. (2012): Aberrant expression of CD44 in bile duct cancer correlates with poor prognosis. In: *Asian Pac J Cancer Prev*; 13:95-99.

Lagadec, C.; Vlashi, E.; Frohnen, P.; Alhiyari, Y.; Chan, M.; Pajonk, F. (2014): The RNA-binding protein Musashi-1 regulates proteasome subunit expression in breast cancer- and glioma-initiating cells. In: *Stem Cells*; 32(1):135-144.

Lamy, M.; Ferreira, A.; Dias, J.; Braga, S.; Silva, G.; Barbas, A. (2017): Notch-out for breast cancer therapies. In: *N Biotechnol*; 39(Pt B):215-221.

Lang, Gudrun (2013): LAB/LSAB-Methode (Labelled-Strept-Avidin-Biotin). In: Lang, Gudrun (Hrsg.): *Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2. Auflage, Wien: Springer-Verlag, S. 289.

Lang, S.A. und Fichtner-Feigl, S. (2018): Maligne Lebertumoren. In: Germer, C.-T.; Keck, T.; Grundmann, R.T. (Hrsg.): *Evidenzbasierte Viszeralchirurgie maligner Erkrankungen. Leitlinien und Studienlage*. Berlin: Springer Verlag, S. 122.

Leitlinienprogramm Onkologie. S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. Version 1.0 - Oktober 2013 (2013): https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0100LI_S3_Exokrines_Pankreaskarzinom_21112013-abgelaufen.pdf (abgerufen am 30.01.2019).

Lewis, H.L.; Rahnama-Azar, A.A.; Dillhoff, M.; Schmidt, C.R.; Pawlik, T.M. (2017): Current Management of Perihilar Cholangiocarcinoma and Future Perspectives. In: *Chirurgia (Bucur)*; 112(3):193-207.

Li, X.-P.; Zhang, X.-W.; Zheng, L.-Z.; Guo, W.-J. (2015): Expression of CD44 in pancreatic cancer and its significance. In: *Int J Clin Exp Pathol*; 8(6): 6724–6731.

Li, Y.; Tang, C.G.; Zhao, Y.; Cao, W.Y.; Qu, G.F. (2017): Outcomes and prognostic factors of patients with stage IB and IIA pancreatic cancer according to the 8th edition American Joint Committee on Cancer criteria. In: *World J Gastroenterol.*; 23(15):2757-2762.

Liao, W.; Li, G.; You, Y.; Wan, H.; Wu, Q.; Wang, C.; Lv, N. (2018): Antitumor activity of Notch-1 inhibition in human colorectal carcinoma cells. In: *Oncol Rep*; 39(3):1063-1071.

- Liu, Z.H.; Dai, X.M.; Du, B. (2015): Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance. In: *Cancer Biol Ther*; 16(3):353-359.
- Lucas, A.L.; Malvezzi, M.; Carioli, G.; Negri, E.; La Vecchia, C.; Boffetta, P.; Bosetti, C. (2016): Global Trends in Pancreatic Cancer Mortality From 1980 Through 2013 and Predictions for 2017. In: *Clin Gastroenterol Hepatol*; 14(10):1452-1462.
- Manser, C. (2013): Pankreastumore. In: Lüscher, T. und Steffel, J. (Hrsg.): *Magen-Darm-Trakt*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, S. 85-87.
- Matsumori, T.; Kodama, Y.; Uza, N.; Shiokawa, M.; Nishikawa, Y.; Yamauchi, Y.; Morita, T.; Tomono, T.; Kuwada, T.; Marui, S.; Okada, H.; Seno, H. (2018): Tu1522 - Hes1 Plays an Essential Role in the Development of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. In: *Gastroenterology*; 6(1):951.
- Mohamed, S.Y.; Kaf, R.M.; Ahmed, M.M.; Elwan, A.; Ashour, H.R.; Ibrahim, A. (2019): The Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers (Notch1, ALDH1, and CD44) in Primary Colorectal Carcinoma. In: *J Gastrointest Cancer*; 50(4):824-837.
- Morath, I.; Hartmann, T.N.; Orian-Rousseau, V. (2016): CD44: More than a mere stem cell marker. In: *Int J Biochem Cell Biol*; 81(Pt A):166-173.
- Morine, Y.; Imura, S.; Ikemoto, T.; Iwahashi, S.; Saito, Y.U.; Shimada, M. (2017): CD44 Expression Is a Prognostic Factor in Patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma After Surgical Resection. In: *Anticancer Res*; 37(10):5701-5705.
- Moss, M.L. und Minond, D. (2017): Recent Advances in ADAM17 Research: A Promising Target for Cancer and Inflammation. In: *Mediators Inflamm*; 2017: 9673537.
- Müller, A.; Melle, U.; Pachmann, C. (2017): Cholangiozelluläres Karzinom. In: Layer, P. und Rosien, U. (Hrsg.): *Facharztwissen Gastroenterologie*, München: Elsevier, S. 476.
- Müller-Esterl, W. (2018): Molekulare Basis von Krebsentstehung und Krebsbekämpfung. In: Müller-Esterl, W. (Hrsg.): *Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 3. Auflage, Frankfurt: Springer Spektrum, S. 502-503.
- Neeff, H.P.; Holzner, P.A.; Menzel, M.; Bronsert, P.; Klock, A.; Lang, S.A.; Fichtner-Feigl, S.; Hopt, U.T.; Makowiec, F. (2018): Das intrahepatische Cholangiokarzinom. In: *Der Chirurg*; 374–380.
- Pastò, A.; Serafin, V.; Pilotto, G.; Lago, C.; Bellio, C.; Trusolino, L.; Bertotti, A.; Hoey, T.; Plateroti, M.; Esposito, G.; Pinazza, M.; Agostini, M.; Nitti, D.; Amadori, A.; Indraccolo, S. (2014): NOTCH3 signaling regulates MUSASHI-1 expression in metastatic colorectal cancer cells. In: *Cancer Res*; 74(7):2106-2118.

- Pichler, W.J. und Peter, H.-H. (2006): Cadherine. In: Siegenthaler, W. und Blum, H.E. (Hrsg.): Klinische Pathophysiologie. 9. Auflage, Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag KG, S. 492.
- Piper, W. (2013): Krankheiten der Verdauungsorgane. In: Piper, W. (Hrsg.): Innere Medizin. 2. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, S. 482.
- Platonova, N.; Lesma, E.; Basile, A.; Bignotto, M.; Garavelli, S.; Palano, M.T.; Moschini, A.; Neri, A.; Colombo, M.; Chiaramonte, R. (2017): Targeting Notch as a Therapeutic Approach for Human Malignancies. In: *Curr Pharm Des*; 23(1):108-134.
- Purow, B. (2012): Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy. In: *Adv Exp Med Biol*; 727:305-319.
- Qian, C.J.; Chen, Y.Y.; Zhang, X.; Liu, F.Q.; Yue, T.T.; Ye, B.; Yao, J. (2016): Notch4 inhibition reduces migration and invasion and enhances sensitivity to docetaxel by inhibiting Akt/fascin in pancreatic cancer cells. In: *Oncol Lett*; 12(5):3499-3505.
- Radtke, A. und Königsrainer, A. (2016): Surgical Therapy of Cholangiocarcinoma. In: *Visc Med*; 32:422-426.
- Remmele, W. (1997): Gallenblase und extrahepatische Gallengänge. In: Remmele, W. (Hrsg.): Pathologie 3. Leber; Gallenblase, extrahepatische Gallengänge, Vater-Papille; Exokrines Pankreas; Peritoneum, Retroperitoneum; Hernien; Atemwege und Lungen, Pleura. 2. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, S. 316.
- Riede, U.N. und Blum H.E. (2009): Neoplasienmuster. In: Riede, U.N.; Werner, M.; Freudenberg, N. (Hrsg.): Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, S. 411.
- Ringel, J.; Jesnowski, R.; Moniaux, N.; Lüttges, J.; Ringel, J.; Choudhury, A.; Batra, S.K.; Klöppel, G.; Löhr, M. (2006): Aberrant expression of a disintegrin and metalloproteinase 17/tumor necrosis factor-alpha converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *Cancer Res*; 66(18):9045-9053.
- Ringel, J.; Jesnowski, R.; Moniaux, N.; Lüttges, J.; Ringel, J.; Choudhury, A.; Batra, S.K.; Klöppel, G.; Löhr, M. (2006): Aberrant Expression of a Disintegrin and Metalloproteinase 17/tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzyme Increases the Malignant Potential in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. In: *Cancer Res*; 66(18):9045-9053.
- Robert Koch Institut (2016): Kapitel 2. Epidemiologie von Krebserkrankungen. In: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, Berlin: S. 22.
- Sato, C.; Zhao, G.; Ilagan, M.X. (2012): An overview of notch signaling in adult tissue renewal and maintenance. In: *Curr Alzheimer Res*; 9(2):227-240.

Schilling, M.K. und Lammert, F. (2012): Maligne Gallenwegstumore (Cholangiokarzinome). In: Messmann, H. (Hrsg.): Klinische Gastroenterologie. Das Buch für Fort- und Weiterbildung. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, S. 696.

Schirmacher, P. und Dienes, H.-P. (2008): Pathologie. In: Riemann, J. F.; Fischbach, W.; Galle, P. R.; Mössner, J. (Hrsg.): Gastroenterologie. Das Referenzwerk für Klinik und Praxis. Band 2: Leber, Galle, Pankreas, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, S. 1230.

Schmuck, R.B.; de Carvalho-Fischer, C.V.; Neumann, C.; Pratschke, J.; Bahra, M. (2016): Distal bile duct carcinomas and pancreatic ductal adenocarcinomas: postulating a common tumor entity. In: *Cancer Med*; 5(1):88–99.

Schnell, S.A.; Ambesi-Impiombato, A.; Sanchez-Martin, M.; Belver, L.; Xu, L.; Qin, Y.; Kageyama, R.; Ferrando, A.A. (2015): Therapeutic targeting of HES1 transcriptional programs in T-ALL. In: *Blood*; 125(18):2806-2814.

Schreck, K.C.; Taylor, P.; Marchionni, L.; Gopalakrishnan, V.; Bar, E.E.; Gaiano, N.; Eberhart, C.G. (2010): The Notch target Hes1 directly modulates Gli1 expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance. In: *Clin Cancer Res*; 16(24):6060-6070.

Schubert, J. (2016): Exokrine Pankreastumoren. In: Schubert, J. (Hrsg.): Gastroenterologische Zytopathologie. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH, S. 213.

Seals, D.F. und Courtneidge, S.A. (2003): The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. In: *Genes Dev*; 17(1):7-30.

Sedlacek, H.-H. (2013): Bauchspeicheldrüse. In: Sedlacek, H.-H (Hrsg.): Onkologie- die Tumorerkrankungen des Menschen. Entstehung, Abwehr und Behandlungsmöglichkeiten. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH, S. 816.

Seitz, K.; Schuler, A.; Will, U. (2008): Intrahepatische Obstruktion. In: Seitz, K.; Schuler, A.; Rettenmaier, G. (Hrsg.): Klinische Sonographie und sonographische Differenzialdiagnose. Band I, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, S. 233.

Sethi, N. und Kang, Y. (2012): Notch signalling in cancer progression and bone metastasis. In: *Br J Cancer*; 105(12): 1805–1810.

Shen, Q.; Cohen, B.; Zheng, W.; Rahbar, R.; Martin, B.; Murakami, K.; Lamorte, S.; Thompson, P.; Berman, H.; Zúñiga-Pflücker, J.C.; Ohashi, P.S.; Reedijk, M. (2017): Notch Shapes the Innate Immunophenotype in Breast Cancer. In: *Cancer Discov*; 7(11):1320-1335.

Sheng, W.; Dong, M.; Chen, C.; Wang, Z.; Li, Y.; Wang, K.; Li, Y.; Zhou, J. (2017): Cooperation of Musashi-2, Numb, MDM2, and P53 in drug resistance and malignant biology of pancreatic cancer. In: *FASEB J*; 31(6):2429-2438.

Song, H.Y.; Wang, Y.; Lan, H.; Zhang, Y.X. (2018): Expression of Notch receptors and their ligands in pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *Exp Ther Med*; 16(1):53-60.

Sprouse, T.E.; Menias, C.O.; Elsayes, K.M. (2015): Double Duct Sign. In: Elsayes, K.M.; Shaaban, A.M.; Menias, C.O. (Hrsg.): *Specialty Imaging. Pitfalls and classic signs of the abdomen and pelvis*. Philadelphia: Elsevier, S. 2-14.

Statistisches Bundesamt (2018): "Die 10 häufigsten Todesursachen insgesamt", unter: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html> (abgerufen am 25.05.2018).

Taieb, J.; Pointet, A.-L.; Van Laethem, J.L.; Laquente, B.; Pernot, S.; Lordick, F.; Reni, M. (2017): What Treatment in 2017 for Inoperable Pancreatic Cancers? In: *Ann Oncol*; 28(7):1473-1483.

Tao, J.; Chen, S.; Lee, B. (2010): Alteration of Notch signaling in skeletal development and disease. In: *Ann N Y Acad Sci*; 1192:257-268.

Thibodeau, S. und Voutsadakis, I.A. (2018): FOLFIRINOX Chemotherapy in Metastatic Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Retrospective and Phase II Studies. In: *J Clin Med*; 7(1) pii: E7.

Tsubouchi, K.; Minami, K.; Hayashi, N.; Yokoyama, Y.; Mori, S.; Yamamoto, H.; Koizumi, M. (2017): The CD44 standard isoform contributes to radioresistance of pancreatic cancer cells. In: *J Radiat Res*; 58(6):816–826.

Universität Zürich (2018): "Kruskal-Wallis-Test", unter: https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/unterschiede/zentral/kruskal.html (abgerufen am 06.02.2019).

Van der Flier, L.G. und Clevers, H. (2009): Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. In: *Annu Rev Physiol*; 71:241-260.

Vey, N.; Delaunay, J.; Martinelli, G.; Fiedler, W.; Raffoux, E.; Prebet, T.; Gomez-Roca, C.; Papayannidis, C.; Kebenko, M.; Paschka, P.; Christen, R.; Guarin, E.; Bröske, A.M.; Baehner, M.; Brewster, M.; Walz, A.C.; Michielin, F.; Runza, V.; Meresse, V.; Recher, C. (2016): Phase I clinical study of RG7356, an anti-CD44 humanized antibody, in patients with acute myeloid leukemia. In: *Oncotarget*; 7(22):32532-32542.

Von Hoff, D.D.; Ervin, T.; Arena, F.P.; Chiorean, E.G.; Infante, J.; Moore, M.; Seay, T.; Tjulandin, S.A.; Ma, W.W.; Saleh, M.N.; Harris, M.; Reni, M.; Dowden, S.; Laheru, D.; Bahary, N.; Ramanathan, R.K.; Tabernero, J.; Hidalgo, M.; Goldstein, D.; Van Cutsem, E.; Wie, X.; Iglesias, J.; Renschler, M.F. (2013): Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. In: *N Engl J Med*; 369(18):1691-1703.

Wagener, C. und Müller, O. (2010): Notch-Signalweg in Tumoren. In: Wagener, C. und Müller, O. (Hrsg.): Molekulare Onkologie. Entstehung, Progression, klinische Aspekte. 3. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, S. 274.

Werner, J. und Büchler, M.W. (2010): Pankreaskarzinom und periampulläre Karzinome. In: Siewert, R.J.; Rothmund, M.; Schumpelick, V. (Hrsg.): Onkologische Chirurgie. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, S. 566.

Woolliscroft, J. (2013): Pankreaskarzinom. In: Woolliscroft, J. (Hrsg.): Diagnose- und Therapielexikon für den Hausarzt. Die wichtigsten Erkrankungen von A bis Z. Philadelphia: Current Medicine Inc, S. 316.

Wu, W.; He, X.; Yang, L.; Wang, Q.; Bian, X.; Ye, J.; Li, Y.; Li, L. (2018): Rising trends in pancreatic cancer incidence and mortality in 2000–2014. In: Clin Epidemiol; 10:789–797.

Wu, W.R.; Shi, X.D.; Zhang, R.; Zhu, M.S.; Xu, L.B.; Yu, X.H.; Zeng, H.; Wang, J.; Liu, C. (2014b): Clinicopathological significance of aberrant Notch receptors in intrahepatic cholangiocarcinoma. In: Int J Clin Exp Pathol; 7(6):3272-3279.

Wu, W.R.; Zhang, R.; Shi, X.D.; Zhu, M.S.; Xu, L.B.; Zeng, H.; Liu, C. (2014a): Notch1 is overexpressed in human intrahepatic cholangiocarcinoma and is associated with its proliferation, invasiveness and sensitivity to 5-fluorouracil in vitro. In: Oncol Rep; 31(6):2515-2524.

Yamada, S.; Itai, S.; Nakamura, T.; Yanaka, M.; Kaneko, M.K.; Kato, Y. (2018): Detection of high CD44 expression in oral cancers using the novel monoclonal antibody, C44Mab-5. In: Biochem Biophys Rep; 14:64-68.

Yao, K.J.; Jabbour, S.; Parekh, N.; Lin, Y.; Moss, R.A. (2016): Increasing mortality in the United States from cholangiocarcinoma: an analysis of the National Center for Health Statistics Database. In: BMC Gastroenterol; 16(1):117.

Yoon, H.A.; Noh, M.H.; Kim, B.G.; Han, J.S.; Jang, J.S.; Choi, S.R.; Jeong, J.S.; Chun, J.H. (2011): Clinicopathological significance of altered Notch signaling in extrahepatic cholangiocarcinoma and gallbladder carcinoma. In: World J Gastroenterol; 17(35):4023-4030.

Zhang, W.; Chen, H.; Sun, Z.; Qiu, C.; Xiao, J.; Luo, W.; Liu, D.; Yan, Z.; Ou, H.; Wen, X.; Li, G.; Huang, G. (2018): A systematic analysis of the association between Notch1 expression and the patients with digestive tract cancers. In: Biomark Med; 12(9):1049-1062.

Zhao, S.; Chen, C.; Chang, K.; Karnad, A.; Jagirdar, J.; Kumar, A.P.; Freeman, J.W. (2016): CD44 expression level and isoform contributes to pancreatic cancer cell plasticity, invasiveness and response to therapy. In: Clin Cancer Res; 22(22):5592–5604.

Zhong, J., Switchenko, J.; Behera, M.; Kooby, D.; Maithel, S.K.; McDonald, M.W.; Lin J,Y.; Cassidy, R.J., El-Rayes, B.; Landry, J; Patel, P.R. (2018): Chemotherapy with or Without Definitive Radiation Therapy in Inoperable Pancreatic Cancer. In: *Ann Surg Oncol.*; 25(4):1026-1033.

Zhou, Q.; Wang, Y.; Peng, B.; Liang, L.; Li, J. (2013): The roles of Notch1 expression in the migration of intrahepatic cholangiocarcinoma. In: *BMC Cancer*; 13:244.

Zolkiewska, A. (2009): ADAM Proteases: Ligand Processing and Modulation of the Notch Pathway. In: *Cell Mol Life Sci*; 65(13):2056–2068.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Francesca Borlak, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Immunhistochemische Untersuchungen zum Stellenwert des Notch-Signalwegs im Pankreaskopfkarcinom und Cholangiokarcinom (Immunohistochemical studies on the significance of the Notch signaling pathway in pancreatic head carcinoma and cholangiocarcinoma) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Marcus Bahra für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation sowie die hervorragende Betreuung.

Insbesondere möchte ich auch meiner Betreuerin Dr. med. Rosa Schmuck danken, die mich stets mit Geduld, Motivation und fachlichem Rat begleitete. Bei jedem Problem hatte sie ein offenes Ohr für mich und hat eine Lösung gefunden.

Ferner bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in das Doktorandenteam der Experimentellen Chirurgie am Virchow-Klinikum.

Zudem möchte ich mich bei Anja Schirmeier und Peter Tang bedanken für ihre umfassende Einweisung und Unterstützung im Labor.

Des Weiteren möchte ich von tiefstem Herzen meiner Familie danken für die unermüdliche Unterstützung und den Glauben an mich. Ohne ihre Unterstützung wäre die Fertigstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.