

Aus dem Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

Expressionsanalyse von Tumorprogressionsmarkern im Pankreaskarzinom am Beispiel von  
CD24, PLK-1 und PPAR- $\gamma$

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Juliane Jacob

aus Tangerhütte

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G. Kristiansen

2. Prof. Dr. K. Jung

3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. E.Dahl

Datum der Promotion: 22.Februar 2008

# Inhaltsverzeichnis

Publikationsübersicht	1
Zusammenfassung	2-3
Einleitung und Zielstellung	4-6
Material und Methoden	7-8
Ergebnisse	9-12
Diskussion	13-18
Literaturverzeichnis	19-31
Abkürzungen	31
Lebenslauf	32
Erklärung	33
Anteilerklärung	34
Danksagung	35

## Publikationsübersicht

**Publikation 1:** Pancreatology 2004 July 14; 4:454-460 (2004 Impact Factor: 1,445)

Titel: Expression of CD 24 in Adenocarcinomas of Pancreas Correlates with Higher Tumor Grades

Autoren: Juliane Jacob, Joachim Bellach, Robert Grützmann, Ingo Alldinger, Christian Pilarsky, Manfred Dietel, Glen Kristiansen

**Publikation 2:** Pancreatology 2005 April 22; 5:259-265 (2005 Impact Factor: 1,564)

Titel: Overexpression of Polo-Like kinase 1 is a Common and early Event in Pancreatic Cancer

Autoren: Wilko Weichert, Mathias Schmidt, Juliane Jacob, Volker Gekeler, Jan Langrehr, Peter Neuhaus, Marcus Bahra, Carsten Denkert, Manfred Dietel, Glen Kristiansen

**Publikation 3:** Clinical Cancer Research 2006 Nov 1; 12(21):6444-51  
(2006 Impact Factor: 5,71)

Titel: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is highly expressed in pancreatic cancer and is associated with shorter overall survival times

Autoren: Glen Kristiansen, Juliane Jacob, Ann-Christin Buckendahl, Robert Grützmann, Ingo Alldinger, Bence Sipos, Günter Klöppel, Marcus Bahra, Jan M. Langrehr, Peter Neuhaus, Manfred Dietel, Christian Pilarsky

## Zusammenfassung

**Ziel:** Unser Ziel war die immunhistochemische Evaluation der Proteinexpression von CD24, Polo-Like kinase 1, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma im Pankreaskarzinom und die Korrelation der Proteinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern, insbesondere dem Gesamt- und progressionsfreien Überleben, um eine mögliche diagnostische oder prognostische Bedeutung dieser Marker Kandidaten zu klären.

**Methodik:** Paraffinmaterial klinisch charakterisierter Pankreaskarzinome, die im Institut für Pathologie der Charité diagnostiziert worden waren, wurden immunchemisch untersucht. Zur statistischen Analyse wurden Kreuztabellen, der Spearman'sche Korrelationskoeffizient, Kaplan Meier Kurven und Log-Rang-Test sowie die Regressionsanalyse nach Cox eingesetzt.

### **Ergebnisse:**

**CD24:** In 71,6% der Fälle wurde in den Tumorzellen eine Expression mit heterogener Verteilung beobachtet. Signifikant stärker zeigte sich die Färbung in den Tumoren mit höherem Grading (G3). In der univariaten Überlebensanalyse war kein Zusammenhang zwischen der CD24-Expression und verkürzter Gesamtüberlebensrate zu finden.

**PLK1:** Gutartiges acinäres Gewebe und duktales Epithel zeigten nur fokal eine PLK1-Expression, allerdings fand sich eine deutliche Steigerung der Expression in Foci einer pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN). In 47,7% der invasiven Pankreaskarzinome fand sich eine PLK1 Expression. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen positiver PLK1-Anfärbung und der Ausbreitung des Tumors (Tumorstadium), dem Grading oder der Patientenprognose gezeigt werden.

**PPAR- $\gamma$ :** Eine PPAR- $\gamma$ -Expression fand sich in 71,3% der Pankreaskarzinomfälle, die überdies mit der Tumorgroße (pT) sowie einem höheren Grading positiv korrelierte. In der univariaten Überlebensanalyse zeigte sich für PPAR- $\gamma$  ein prognostischer Wert bezüglich des Gesamtüberlebens der Patienten, der darüber hinaus in der Gruppe der nodalnegativen Patienten unabhängig war, wie die Cox-Regression belegte.

**Zusammenfassung:** Im Pankreaskarzinom fand sich immunhistochemisch CD24 in 71,6%, PLK1 in 47,7% und PPAR- $\gamma$  in 71,3% der Fälle exprimiert. PPAR- $\gamma$  konnte als neuer Prognosemarker des Pankreaskarzinoms belegt werden, dem insbesondere in der Gruppe nodal negativer Karzinome eine unabhängig signifikante Relevanz zukommt. Eine prognostische Wertigkeit konnte weder für CD24, noch für PLK1 ermittelt werden, allerdings machen die hohen Expressionsraten diese Proteine möglicherweise als Therapieziele interessant.

## Einleitung und Zielstellung

Das Pankreaskarzinom ist die viert- bis fünfhäufigste tumorassoziierte Todesursache in westlichen Industriestaaten (1).

Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms beträgt ca. 5–10 pro 100 000 Einwohner pro Jahr. Das Risiko Männer/Frauen beträgt 2:1 mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 6. und 8. Lebensjahrzehnt. Tabakkonsum und die chronische Pankreatitis stellen gesicherte Risikofaktoren dar (2).

Als weitere Risikofaktoren gelten Alkoholkonsum, aromatische Amine sowie ungesunde Ernährung. Darüberhinaus gehen die autosomal-dominant vererbten hereditären Pankreatitiden mit einem erhöhten Entartungsrisiko einher. Histologisch lassen sich die Pankreaskarzinome wie folgt unterteilen: Mit 75–90% stellen die invasiven duktaalen Adenokarzinome die häufigste Tumorentität dar, seltener sind intraduktale muzinös-papilläre oder zystische Neoplasien sowie neuroendokrine Karzinome oder Azinuszellkarzinome.

Die wichtigste genetische Alteration des Pankreaskarzinoms ist eine Aktivierung des dominant transformierenden Onkogens KRAS (ca. in 90% der Patienten) (24). Außerdem sind verschiedene Tumorsuppressorgene supprimiert (p53, DPC4, CDKN2, RB) (96). Es fehlt bisher an spezifischen Vorsorgeuntersuchungen, daher ist eine Früherkennung nur schwer möglich. Die Bestimmung der bislang eingesetzten Serumentumormarker ist als Suchtest ungeeignet, da deren Sensitivität und Tumorspezifität zu gering ist. Von den bekannten Markern hat das CA-19-9 die höchste Sensitivität (ca. 70%) und Spezifität (75–87%) (3).

Bei einer Stauung des Gallengangs kann dieser Wert aber unabhängig von der Dignität der Erkrankung deutlich erhöht (bis ca. 800 U/ml) sein. CA-19-9-Werte über 1000 U/ml finden sich allerdings fast nur bei Patienten mit Pankreaskarzinom. Die klinischen und laborchemischen Untersuchungen führen meist nicht zu der Diagnose Pankreaskarzinom, weshalb bei Verdacht auf eine Raumforderung im Pankreas die bildgebenden Verfahren im Vordergrund stehen.

Die Anzahl der Pankreaskarzinomfälle ist in den letzten Jahren stetig gewachsen. Die Erkrankung ist durch relativ aggressive Verläufe mit frühzeitiger Metastasierung, insgesamt limitierten Behandlungsmöglichkeiten und einer schlechten Prognose gekennzeichnet, was sich auch in der niedrigen 5-Jahresüberlebensrate niederschlägt.

In den letzten Jahren sind daher eine Vielzahl verschiedener Moleküle, welche in der Zellproliferation und Tumorgenese eine Rolle spielen, auf ihren Stellenwert als Prognosemarker des Pankreaskarzinoms untersucht worden, von denen einige exemplarisch genannt seien:

Akt ist eine Serin/Threoninkinase, welche eine zentrale Rolle in der Tumorgenese spielt. Der immunhistochemische Nachweis einer phospho-Akt-Expression (phosphorylierte, aktive Form) konnte von Yamamoto et al. (4) als signifikanter Prognosefaktor dargestellt werden.

Saitou et al. zeigten, dass das Überleben vom Patienten mit hochgradiger MUC4-Expression signifikant niedriger war, als jenes derer mit niedriger MUC4-Expression. (5)

Syndecan 1 ist ein transmembraner Rezeptor, welcher an der Zell-Zell-, Zell-Matrix-Interaktion, Zellproliferation, und -migration teilnimmt und in vielen Karzinomen herunterreguliert ist. Im duktalem Pankreaskarzinom ist es hingegen hochreguliert. Juutia et al. zeigten immunhistochemisch, dass Syndecan 1 einen unabhängigen Prognosemarker des Pankreaskarzinoms darstellt (6).

Des Weiteren wurden CEACAM 6 (7) und ADAM 9 (8) bezüglich ihrer Expression im duktalem Adenokarzinom des Pankreas immunhistochemisch untersucht und als Prognosemarker identifiziert.

Unser Ziel war es, die Proteinexpression ausgewählter Kandidatengene, die aus den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Kristiansen hervorgegangen sind, im duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu bestimmen und deren Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern, insbesondere dem Gesamt- und progressionsfreien Überleben, zu evaluieren. Diese Kandidatengene sind folgende:

## **CD24**

Gegen Ende der 70-iger Jahre wurde erstmals ein Membranglykoprotein der Maus mit einer lipidähnlichen Struktur identifiziert und J11d/M1.69 bzw. heat-stable antigen (HSA; mouse CD24) genannt. In der Maus wurde es als von haematopoetischen Zellen exprimiertes Gen identifiziert. Insbesondere B-Lymphozyten, Erythrozyten und neutrophile Granulozyten exprimieren HSA. In der Immunologie wurde es ein beliebter Marker zur Untersuchung der Entwicklung von B-Lymphozyten und Thymozyten. Später zeigte sich, dass es ebenso vom sich entwickelnden Hirn, als auch von verschiedenen epithelialen Zellen exprimiert wird. Eine Bedeutung für die Tumorprogression erlangte CD24 durch seine Beschreibung als P-Selektinligand (9). P-Selektin ist ein Zelladhäsionsmolekül, das von aktivierten Endothelien und Thrombozyten exprimiert wird und somit bei der metastatischen Tumorprogression eine Rolle spielen könnte. P-Selectin ist bisher als einziger Ligand identifiziert worden (11). Eine spezifischere Signalkaskade ist allerdings noch nicht aufgeklärt worden. Kristiansen et al. konnten in der Folge zeigen, dass CD24-positive solide Tumoren (NSCLC; Prostata, Mamma, Ovar, Colon) (10, 27, 28, 29) in der Tat einen klinisch aggressiveren Verlauf zeigten, als CD24-negative. Bis dato war CD24 nicht in Pankreaskarzinomen untersucht worden.

## **PLK1**

1988 entdeckten Sunkel und Glover das Gen Polo (12). Seither ist diese Kinase, welche eine Schlüsselfunktion in der Mitose einnimmt im Focus intensiver Bemühungen. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass PLK1 und seine humanen funktionellen Äquivalente für verschiedene Schritte der Zellentwicklung nötig sind. Es ist bekannt, dass PLK1 Cyclin B1 direkt und auch cdc25c phosphoryliert. Beide Ereignisse führen zu einer Inaktivierung des nukleären Exports des Cyclin B1/cdc2-Komplexes und letztlich zu einer Akkumulation des Komplexes im Nukleus, welches eigentlich Voraussetzung für den Beginn der Mitose wäre.

Es sind 4 humane Äquivalente, jeweils als Polo-like kinasen (PLK) 1-4 genannt, bekannt (13). PLK1 konnte bisher am besten charakterisiert werden. Zellen benötigen zur Durchführung der Mitose PLK1. Durch die Hemmung dieser Unterform ist es möglich einen mitotischen Zellrest mit sich anschließender Apoptose zu erzielen (14-16).

In einer Vielzahl solider Tumoren wurde eine Überexpression von PLK1 im Vergleich zu entsprechendem Normalgewebe gefunden. In einigen dieser Untersuchungen wurde PLK1 eine prognostische Rolle zugesprochen.

## **PPAR- $\gamma$**

PPAR- $\gamma$  ist ein Mitglied der nukleären Rezeptorfamilie ligandenassoziierter Transkriptionsfaktoren. Es wurden bisher 3 Subtypen gefunden. Diese Subtypen haben alle verschiedene Gewebeziele und Liganden. Initial wurde PPAR- $\gamma$  eine Schlüsselrolle in der Lipid- und in der Glykogenese zugesprochen.

Aktuelle Ergebnisse legen eine Beteiligung von PPAR- $\gamma$  an der Karzinogenese bzw. Karzinomprogression nahe, da es die Proliferation und Differenzierung von malignen Zellen in vivo und in vitro beeinflusst (17, 18).

Eine PPAR- $\gamma$  -Expression wurde unter anderem in Mamma-, und Prostatakarzinomen, in Zelllinien von Glioblastomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen, im Ovarial- sowie im Pankreaskarzinom gefunden (19-25). Bis dato gab es keine Untersuchung zur PPAR- $\gamma$ -Expression in einer größeren Kohorte klinisch charakterisierter Pankreaskarzinome.

## **Ziel der Studie**

Unser Ziel war die immunhistochemische Evaluation der Proteinexpression von CD24, Polo-Like kinase 1, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma im Pankreaskarzinom und die Korrelation der Proteinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern, insbesondere dem Gesamt- und progressionsfreien Überleben.

# Material und Methoden

## Patienten

Untersucht wurden 94 Patienten auf die Expression von CD24 sowie 91 Patienten auf die Expression von PLK1, wobei hier 86 Fälle von duktalem Adenokarzinom des Pankreas und 5 Fälle von chronischen Pankreatitiden vorlagen. Die Expression wurde im Tumor- und angrenzenden Normalgewebe beurteilt. Alle Patienten wurden am Universitätsklinikum Charité, Campus Mitte, diagnostiziert. 129 Patienten mit duktalem Adenokarzinom sind auf die Expression von PPAR- $\gamma$  untersucht worden. 95 Patienten davon sind ebenfalls am Universitätsklinikum Charité Berlin behandelt worden. 34 unterzogen sich einer Behandlung in Dresden. Die Tumorpräparate wurden im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Charité zwischen 1991 und 2000 im Rahmen der Routinediagnostik untersucht. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 39 bis 80 Jahre (PLK1), 38 bis 80 (CD24) und 34 bis 80 (PPAR- $\gamma$ ) Jahre alt mit einem Median von 66 Jahren (PLK1) bzw. 64 Jahren (CD24 und PPAR- $\gamma$ ). Nachbeobachtungsdaten einschließlich der Gesamtüberlebenszeit oder der Tumorprogression waren für alle Fälle vorhanden. Die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit betrug 60 Wochen.

## Immunhistologie

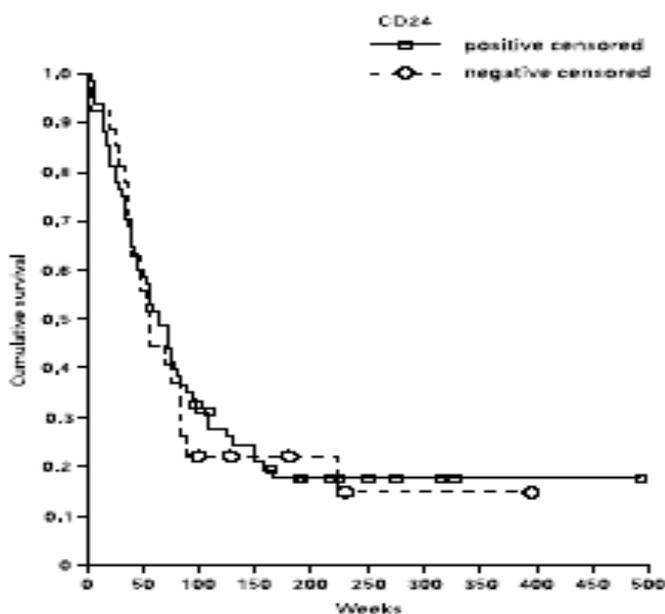
Für die immunhistochemischen Färbungen wurde formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe in 4 $\mu$ m Schnittstärke auf Superfrost (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) Objektträger aufgebracht und mit Xylol entparaffinisiert. Die Antigendemaskierung erfolgte durch Kochen in 0,01M Zitratpuffer für 5 Minuten im Druckkochtopf. Die Primärantikörper wurden in folgenden Verdünnungen (Verdünnungsmedium mit hintergrundreduzierendem Puffer, DAKO, Hamburg, Deutschland) eingesetzt: CD24 (Klon 24C02, Neomarkers, Fremont, USA) 1:200. PPAR- $\gamma$  (Klon E8, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) 1:75, PLK-1 (Maus monoklonal, BD Transduction, San Diego, USA) 1:500 (unter Verwendung des vom Hersteller vorverdünnten Antikörpers). Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für jeweils 1 h. Als Detektionssystem diente die Streptavidin-Biotin-Methode (DAKO, Hamburg, Deutschland) mit alkalischer Phosphatase zur Detektion. Fast-Red (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) diente als Chromogen. Die Schnitte wurden mit Haematoxylin gegengefärbt und mit Aquatex (Firma Merck) eingedeckt.

Die Immunchemie wurde unabhängig von drei Untersuchern, die für die Überlebenszeiten verblindet waren, ausgewertet. Es wurde ein immunreaktiver Score (IRS), wie durch Remmele und Stegner beschrieben, angewandt (26). Der immunreaktive Score berücksichtigt sowohl die Färbeintensität als auch die Ausdehnung der Immunreaktion und hat sich in vielen Studien zur Semiquantifizierung bewährt. Ebenso wurde, wenn vorhanden, zwischen zytoplasmatischer, membranöser und nukleärer Immunreaktivität unterschieden. Fälle mit Diskrepanzen im IRS zwischen den drei Pathologen wurden an einem Demonstrationsmikroskop diskutiert, bis ein Konsens erreicht wurde. Die Daten wurden mittels SPSS, Versionen 12.0 und 13.0 analysiert (SPSS Inc., Chicago, USA). Fischer's exact Test und die Chi-Quadrat Tests für Tendenzen wurden für die Korrelation zwischen immunhistochemischer Expression und klinisch-pathologischen Parametern benutzt. Der Wilcoxon- und Mann-Whitney-U-Test wurden angewandt, um Expressionslevel zu vergleichen. Die univariate Überlebensanalyse wurde entsprechend nach Kaplan-Meier durchgeführt und Unterschiede bezüglich der Überlebenskurven wurden mit dem Log-rank-Test bestimmt. Die multivariate Analyse wurde mittels Cox-Regression durchgeführt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant gewertet.

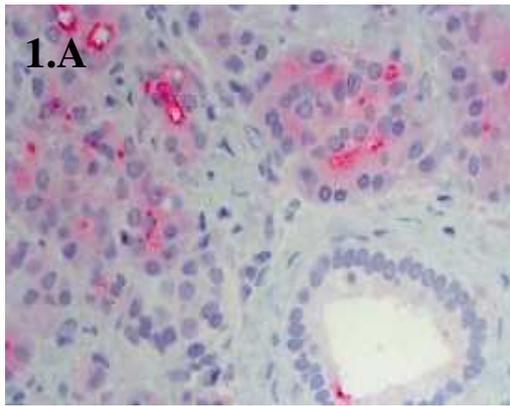
# Ergebnisse

## CD24

Im normalen Pankreasgewebe wurde CD24 schwach, aber homogen exprimiert. Im acinären Epithel zeigte sich hauptsächlich eine zytoplasmatische, fokal aber auch eine membranös akzentuierte Anfärbung. (BILD1.A). Das normale Gangepithel war gewöhnlich CD24-negativ oder nur dezent zytoplasmatisch positiv. Atrophische oder dilatierte Gänge zeigten ausnahmslos ein apikal membranöses Signal. Dysplastische intraduktale Pankreasepithelien (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia, PanIN) zeigten oft eine zytoplasmatisch betonte Expression. Diese Art der Anfärbung konnte auch in den invasiven Karzinomen beobachtet werden. Oft zeigte sich zusätzlich noch eine membranöse Komponente. Die Verteilung von CD24 in den Karzinomen war größtenteils heterogen. In Zusammenschau waren 71,6 % der Karzinome CD24-positiv, 28,4% waren negativ. Wir konnten keinen signifikanten Zusammenhang der Gesamt-CD24-Anfärbung mit dem Patientenalter, -geschlecht, der Tumorgroße/ pT, dem Nodalstatus oder dem Krankheitsstadium entsprechend der UICC feststellen. Allerdings zeigten niedrig differenzierte Tumoren (G3) einen signifikant ( $p=0.038$ ) höhere CD24 Expression. Darüberhinaus korrelierte die membranöse CD24-Anfärbung signifikant mit höheren pT-Stadien. Ein prognostischer Wert konnte für CD24 letztlich nicht belegt werden. (Tabelle 1.1).



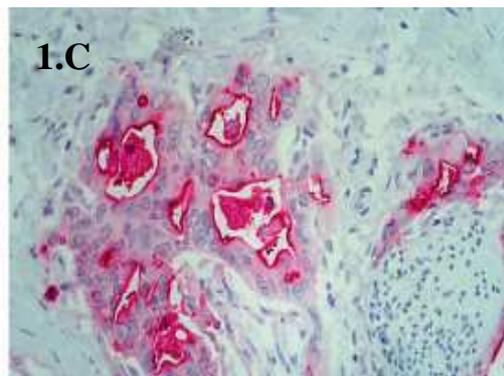
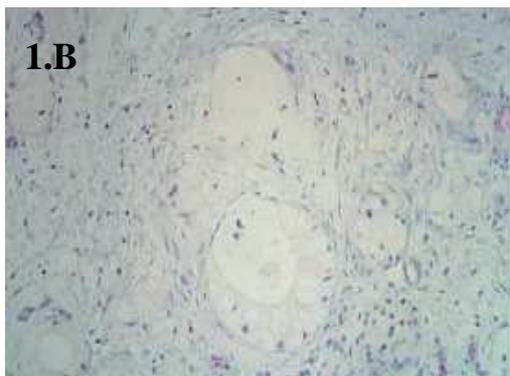
**Tabelle 1.1:** Kaplan-Meier-Kurve für die Gesamtüberlebenszeit



**Bild 1.A:** Ein terminaler Pankreasgang ohne CD24-Anfärbung, umgeben von acinären Gewebe mit zytoplasmatischer Expression

**Bild 1.B:** Adenokarzinom des Pankreas ohne CD24-Anfärbung

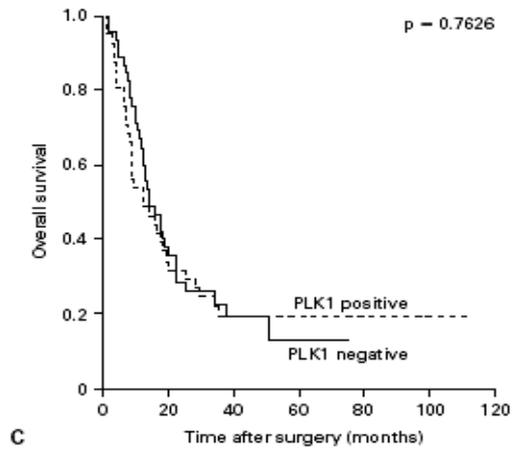
**Bild 1.C:** Starke zytoplasmatische und membranöse CD24-Expression im invasiven Karzinom



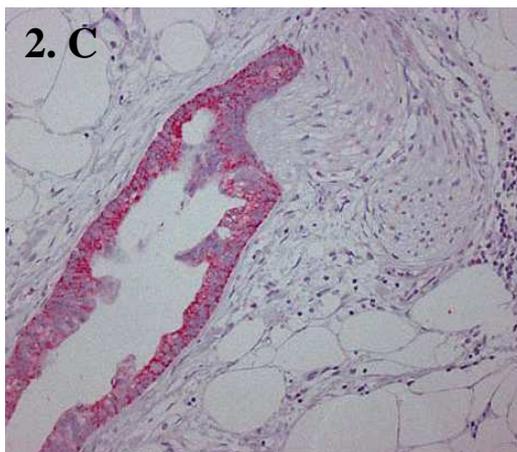
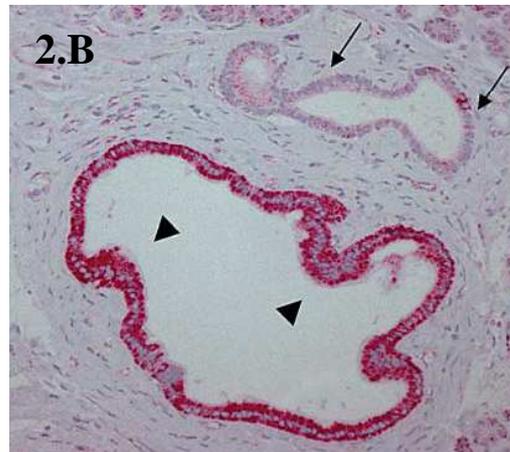
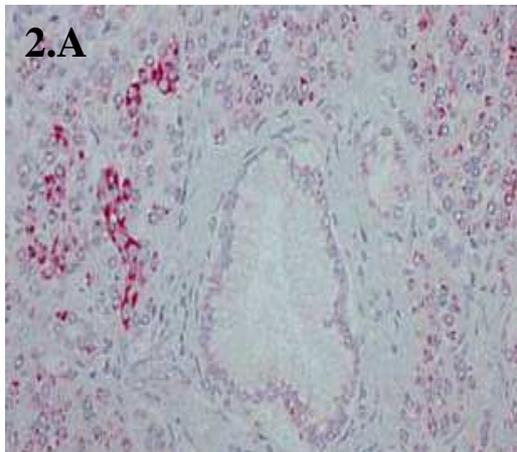
## PLK1

Die Mehrheit des normalen azinären Pankreasgewebes war PLK1 negativ. Nur einige einzelne, zerstreute Zellen zeigten eine starke Anfärbung. (Bild 2.A) Auch in den kleinen und großen Pankreasgängen wurde keine PLK1-Expression beobachtet. Pankreasgänge mit mucinöser Metaplasie sowie hyperplastische Epithelien waren ebenfalls PLK1-negativ. Das Stützgewebe zeigte keinerlei PLK1-Anfärbung. Die zytoplasmatische PLK1-Anfärbung wurde in einem Teil zerstreuter Lymphozyten und auch in autonomen Ganglienzellen beobachtet. Diese dienten als Positivkontrolle. Eine leichte Zunahme der PLK1-Expression wurde in Gangproliferationen und auch im acinären Epithel chronischer Pankreatitiden gesehen. Der Grad der Anfärbung war jedoch so gering, dass er nicht als positiv gewertet werden konnte. Das lymphathische Gewebe zeigte eine starke zytoplasmatische Anfärbung. In den PanINs, welche in der Nähe der Pankreaskarzinome gefunden worden, fehlte in den niedrig graduierten, also in PanIN-1 und-2, eine PLK1-Anfärbung. Dagegen war die Mehrheit der PanIN-3 positiv. (Bild 2.B)

Von 83 invasiven Adenokarzinomen des Pankreas zeigten 41 Fälle (47,7%) eine starke homogene zytoplasmatische PLK1-Expression. (Bild 2.C)



**Tabelle 2.1:** Kaplan-Meier-Kurve für die Gesamtüberlebenszeit



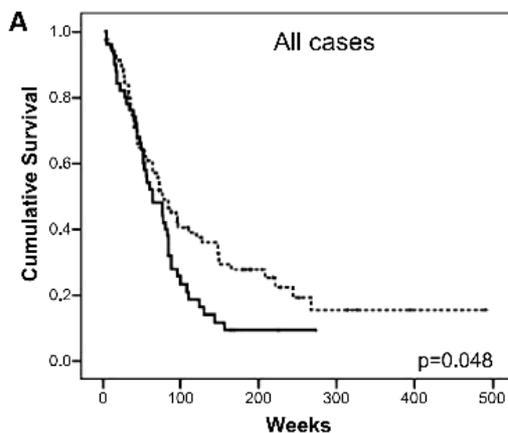
**Bild 2.A:** Normales Pankreasgewebe

**Bild 2.B:** Kleiner Pankreasgang mit PanIN 3

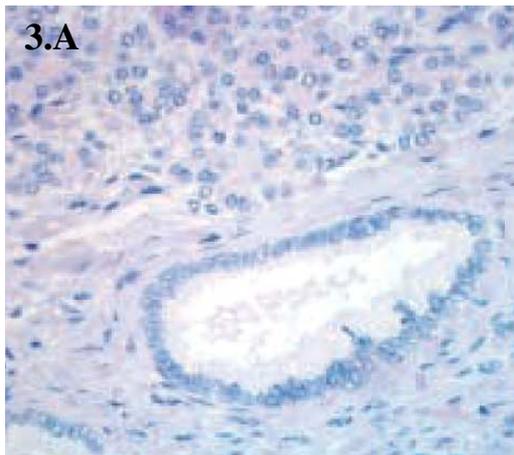
**Bild 2.C:** Malignes Drüsengewebe infiltriert das Perineurium eines kleinen Nervis

## PPAR- $\gamma$

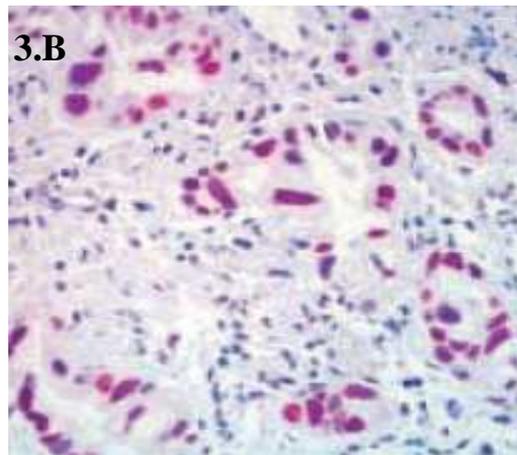
Im normalen acinären Epithel des Pankreas konnte keine PPAR- $\gamma$ -Anfärbung ausgemacht werden. Das normale Gangepithel war in der Regel PPAR- $\gamma$  negativ oder zeigte nur eine sehr schwache nukleäre oder zytoplasmatische Anfärbung. (Bild 3.A) Dysplastische intraduktale Proliferationen (PanIN) zeigten herdförmig eine nucleäre PPAR- $\gamma$ -Expression. Die invasiven Karzinome wiesen eine heterogene nukleäre Immunreaktivität, im Sinne von schwacher bis starker Anfärbung auf. (Bild 3.B) Zusammenfassend waren 71,3% der Karzinome PPAR- $\gamma$ -positiv, 28,7% der Fälle waren PPAR- $\gamma$  negativ. Die PPAR- $\gamma$ -positiven Tumore wurden außerdem bezüglich einer schwachen (32,6%), moderaten (25,6%) und starken (13, 2%) PPAR- $\gamma$ -Anfärbung unterteilt.



**Tabelle 3.1:** Kaplan-Meier-Kurve für die Gesamtüberlebenszeit



**Bild 3.A:** Normales Pankreasgewebe



**Bild 3.B:** Starke nukleäre Anfärbung im Adenokarzinom des Pankreas

## Diskussion

### CD24

CD24 ist bereits in im sich entwickelnden Pankreas beschrieben worden. Außerdem fand man es im sich regenerierenden Muskel, in Keratinocyten, Nierentubuli und in vielen malignen Tumoren (10, 27-49). Seitdem CD24 als alternativer P-Selectin-Ligand identifiziert wurde, wird ihm eine mögliche Rolle im Metastasierungsprozeß von Tumorzellen zugesprochen. Außerdem ist CD24 offenbar an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt. Die Überexpression in Lymphozyten lässt vermuten, dass CD24 die Proliferation und das Überleben von Vorläuferzellen reguliert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die antikörperinduzierte Vernetzung von CD24 die Apoptose in B-Vorläuferzellen induziert und die Anti-CD40-induzierte Proliferation von reifen, ruhenden B-Lymphozyten unterdrückt (50). Diese Art von Apoptoseinduktion wurde auch bei Zellen des humanen Burkitt-Lymphoms gefunden (51). In der Ratte konnten Nestl et al. (52) mit Hilfe der SSH (suppression subtractive hybridization) in einem Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms in Pankreaszelllinien Gene identifizieren, welche während des Metastasierungsprozesses heraufreguliert sind. Sie konnten eine starke Aufregulation von CD24 in Zelllinien des metastatischen Phenotyps darstellen und schlossen daraus, dass diese Gene in Zusammenhang mit der Metastasierung stehen. Dies wurde durch die Ergebnisse von Kohlgraf et al. (53) bestätigt. Han et al. (54) dokumentierten in einer Vergleichsstudie eine Herabregulation von CD24 in humanen Pankreaskarzinomzelllinien im Gegensatz zum Normalgewebe. Es mangelt hier allerdings an einer genauen Definition des Normalgewebes und ist daher mit Skepsis zu betrachten. Ganz aktuell ist CD24 als Marker

pankreatischer Tumorstammzellen beschrieben worden und hat damit eine weitere Tumorrelevanz erhalten (55).

Unserer Kenntnis nach, wurde in unserer Studie erstmals die Expression von CD24 im humanen Adenokarzinom des Pankreas immunhistochemisch untersucht. Wir nutzten dazu einen monoklonalen CD24-Antikörper, welcher für parafiniertes Gewebe geeignet ist, so dass wir Archivmaterial nutzen konnten. Die Spezifität des Antikörpers wurde in vorangegangenen Studien belegt (29).

In 71,6% der Adenokarzinome des Pankreas war eine CD24-Expression mit einem heterogenen Verteilungsmuster zu beobachten. Diese Rate CD24-positiver Fälle ist mit der anderer solider Tumoren vergleichbar: in den vorangegangenen Studien zeigte das Ovarialkarzinom in 84%, das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom in 45%, das Prostatakarzinom in 48% und das Mammakarzinom in 84,6% der Fälle eine CD24-Immunreaktivität (10, 27-29). Überdies war die CD24-Positivität mit einer verkürzten Überlebenszeit bzw. verkürzten progressionsfreien Intervallen assoziiert. Dies ist möglicherweise eine Folge einer erhöhten Neigung zur Metastasierung zurückzuführen.

Wie auch in anderen Tumorentitäten, beobachteten wir eine sowohl membranöse als auch eine zytoplasmatische Immunreaktivität. Die Tatsache, dass CD24 als Oberflächenmolekül auch zytoplasmatisch nachweisbar ist, verblüfft zunächst. Im Ovarial- und auch im Mammakarzinom war die zytoplasmatische Immunreaktivität ein besonders starker Prädiktor für schlechteres Patientenoutcome. Im normalen Gewebe stellte es sich hingegen kaum zytoplasmatisch dar. Neuere Untersuchungen belegen, dass CD24 eine bislang nicht beschriebene Rolle als Bestandteil sogenannter Exosomen hat, die von Tumorzellen im Zytoplasma gebildet, dann in das Interstitium abgegeben werden und mit erhöhter lokaler Invasivität der Tumorzellen einhergehen (Manuskript eingereicht), welches möglicherweise die besondere prognostische Wertigkeit des zytoplasmatischen CD24 erklärt. Eine prognostische Bedeutung von CD24 im Pankreaskarzinom fanden wir leider nicht. Dies hängt möglicherweise mit der ohnehin sehr hohen Rate früher Mortalität zusammen. Allerdings sind bestimmte Patientenuntergruppen mit insgesamt besserer Prognose nach konventionellen Kriterien, wie etwa gut differenzierte Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen und tumorfreien Schnitträndern in unserer Kohorte unterrepräsentiert. Diese Fragestellung sollte in größeren Studien geklärt werden. Die Tatsache, dass sich eine höhere CD24-Expression in Tumoren mit höherem Tumorgrad fand und, dass sich eine höhere membranöse Immunreaktivität in den größeren Tumoren (pT) zeigte, kann als Hinweis auf eine Rolle von CD24 in der Tumorprogression des Pankreaskarzinoms gewertet werden. Diese Zusammenhänge werfen die Frage nach einer Therapie des Pankreaskarzinoms

mit Antikörpern auf: Fischer et al. (56), Benkerrou et al. (57), Garnier et al konnten transplantationsassoziierte B-Zell-Proliferationssyndrome erfolgreich mit CD21- und CD24-spezifischen Antikörpern behandeln. Außerdem konnte jüngst gezeigt werden, dass Pankreaskarzinomstammzellen CD24-positiv sind (58). CD24 könnte also möglicherweise auch einen Ansatzpunkt in der Therapie des humanen Pankreaskarzinoms darstellen. Um dies weiter zu spezifizieren und die Rolle von CD24 in der Tumorprogression zu verstehen, sind weitere Studien nötig.

### **PLK1**

Seit Polo 1988 von Sunkel und Glover entdeckt wurde, konnten verschiedene Funktionen des humanen Äquivalents PLK1 aufgedeckt werden. Ihm wird eine Schlüsselrolle in der Mitose zugesprochen. Beispielsweise ist es in der Separation von Chromosomen involviert (12). PLK1 ist nötig für die Reifung und Trennung der Centrosomen (59). Während des Übergangs von Anaphase zu Metaphase phosphoryliert es den anaphase-promoting-complex (60). Darüberhinaus wurden verschiedene andere Funktionen in den zellulären Signalkaskaden identifiziert. All diese Erkenntnisse wurden für verschiedene Ansatzpunkte der Krebstherapie genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von PLK1 entweder durch siRNA oder antisense Strategien zu einem erheblichen Rückgang der Zellproliferation und zu Induktion von Apoptose in Zellkulturen von verschiedenen humanen Karzinomen, darunter auch das Pankreaskarzinom, führt.

Bisher wurde eine Überexpression von PLK1 in verschiedenen menschlichen Tumoren gefunden, unter anderem im Bronchial-(61), Prostata-(62), Colon-(63), Magen-(64), Schilddrüsen-(64), Haut-(65) und Ovarialkarzinom (66). In einigen dieser Tumoren konnte PLK1 ein prognostischer Wert zugesprochen werden. Gray et al. (67) beobachteten in einer Pilotstudie an einem sog. tissue micro array (TMA) mit 35 Pankreaskarzinomen eine Überexpression. In unserer Studien wurde zum ersten Mal die Expression von PLK1 in einer größeren Kohorte klinisch charakterisierter Pankreaskarzinome immunhistochemisch untersucht. Wie auch in anderen humanen Karzinomen, fand sich in der Hälfte unserer Tumore eine Überexpression. Da PLK1 in den meisten hochgradigen PanIN-Läsionen, welche als Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms gelten, stark exprimiert ist, kann vermutet werden, dass die Überexpression von PLK1 ein sehr frühes Ereignis in der Karzinogenese des Pankreas ist. Eine Korrelation zwischen der PLK1-Expression und der Tumorausbreitung oder eine prognostische Relevanz konnten allerdings nicht gezeigt werden.

In den Untergruppen fand sich eine homogene Überexpression. Dies könnte mit der erhöhten Mitoseaktivität in Tumoren zusammenhängen. In einer Vielzahl von Neubildungen fand sich ein Zusammenhang zwischen Markern erhöhter Mitoseaktivität und der PLK-Überexpression (63,66). In anderen früheren Studien zeigte sich hingegen kein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Mitoserate und der PLK1-Überexpression. Eine mögliche Erklärung der PLK1-Deregulation könnte sein, dass entweder eine gesteigerte Transkription durch eine alterierte intrazelluläre Signaltransduktion oder eine chromosomale Überrepräsentation des PLK1-Genlokus zu hohen intrazellulären Proteinspiegeln führt, welche in der Folge die mitotische Aktivität steigern. In der Tat finden sich Amplifikationen am PLK1-Lokus 16p12 in 3 von 4 Pankreaskarzinomzelllinien (68).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in einer beachtlichen Anzahl (47,7%) von Pankreaskarzinomfällen eine Überexpression von PLK1 zu finden war. Dies lässt auf einen therapeutischen Ansatz mittels PLK1-Inhibition hoffen.

### **PPAR- $\gamma$**

PPAR- $\gamma$  gehört zur großen Familie der Hormonrezeptoren, wie zum Beispiel auch die Steroid-, Schilddrüsenhormon-, Vitamin D- und Retinoidrezeptoren (69). Durch verschiedene Liganden aktiviert, bildet PPAR- $\gamma$  mit Retinoid X einen Komplex (70). Dieser Komplex verbindet sich mit sogenannten peroxisom proliferator elements in den Zielgenen, welche wiederum die Transkription der Zielgene aktivieren. PPAR- $\gamma$  ist stark im Fettgewebe exprimiert, konnte aber auch in anderen Geweben, wie z.B. im Muskel, Nebenniere und Leber nachgewiesen werden (71-74).

PPAR- $\gamma$  spielt eine Rolle in der Zellproliferation und -differenzierung. Es ist in den meisten humanen Malignomen zu finden. Es wird unter anderem in Zusammenhang mit Leukämien (75,76), gastrointestinalen Tumoren, wie Magen- oder Kolonkarzinom (77,78), im Prostata-, Mamma-, und Ovarialkarzinom (20,23, 79), im Osteosarkom (80), kleinzelligen Bronchialkarzinom (22) oder in Gliomen (81) gefunden.

Synthetische PPAR- $\gamma$ -Liganden (Thiazolidindione) zeigen antineoplastische Effekte in verschiedenen Zelllinien und Tumoren. Antiproliferativ wirken diese Agonisten durch Aufregulation zyklinabhängiger Kinaseinhibitoren. In einigen Tumorzelllinien induzieren sie außerdem Apoptose (82-84). Bisher beschränkten sich die Untersuchungen von PPAR- $\gamma$  im Pankreaskarzinom auf Zelllinien und sehr kleine Tumorkohorten. Eibl et al. (82) konnten eine

PPAR- $\gamma$ -Expression in sechs Zelllinien des Pankreaskarzinoms darstellen. (AsPC-1, BxPC-3, Capan-2, HPAF-II, MIA Paca-2, and PANC1). Durch die Behandlung mit PPAR- $\gamma$ -Agonisten ergab sich eine herabgesetzte Lebenszeit der Zellen. Dieser Effekt war zeit- und dosisabhängig. Farrow et al. Beschrieben eine PPAR- $\gamma$  -Expression in folgenden Zelllinien: AsPC-1, SUI-2, BxPC-3, und MIA Paca-2 und behandelten diese mit PPAR- $\gamma$ -Agonisten. Es wurde eine reduzierte Invasivität und ein erniedrigtes Maß an proinvasiven Faktoren, wie zum Beispiel der tissue plasminogen activator, matrix metalloproteinase 3, matrix metalloproteinase 7, oder der urokinase-type plasminogen activator gefunden(85, 86). Sasaki et al. (24) fanden mRNA in 5 von 7 Zelllinien des Pankreaskarzinoms und in 5 von 7 Tumorgeweben. Das angrenzende Normalgewebe war PPAR- $\gamma$  negativ. Motomura et al. beschrieben auf RNA- und Proteinbasis eine Expression in 4 von 4 Zelllinien und in 9 von 10 Tumorgeweben (87). Itami et al. (88) fanden in 5 von 5 Zelllinien eine PPAR- $\gamma$ -Expression und untersuchten 47 Pankreaskarzinomen und 15 Lebermetastasen immunhistochemisch. In 75% der Tumore und 80% der Metastasen wurde PPAR- $\gamma$  hochgradig exprimiert.

Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erstmalige, umfassendere immunhistochemische Beschreibung von PPAR- $\gamma$  im duktalem Adenokarzinom des Pankreas. In 71,3% der Pankreaskarzinomfälle fanden wir eine PPAR- $\gamma$ -Expression. Eine starke Immunreaktivität fand sich in 38,7%, hauptsächlich in den größeren (pT3) und weniger gut differenzierten (G3) Tumoren. Ein Zusammenhang zum Nodalstatus fand sich nicht. In den Analysen der Gesamtüberlebenszeit war eine starke PPAR- $\gamma$ -Expression signifikant mit kürzeren Überlebenszeiten assoziiert. In der Gruppe der nodal-negativen erreichte dieser Umstand einen unabhängig signifikanten prognostischen Wert.

PPAR- $\gamma$  könnte somit ein möglicher neuer prognostischer Marker für Patienten mit einem Pankreaskarzinom sein.

Paradox erscheint zunächst, dass wir eine Überexpression von PPAR- $\gamma$  in den aggressiveren Tumoren fanden, obwohl dessen Liganden bekanntlich das Tumorwachstum hemmen. Zhan et al. (23) beobachteten ebenfalls eine höhere PPAR- $\gamma$ -Expression in den aggressiveren Ovarialkarzinomen. Unsere Array-basierten Expressionsdaten von Pankreastumoren weisen daraufhin, dass PPAR- $\gamma$  zwar überexprimiert, jedoch funktionell defekt ist, da sich typische PPAR- $\gamma$ -Zielgene nicht gleichsinnig überexprimiert finden. Dies sollte in weiteren funktionellen Studien überprüft werden.

Die Daten zu PPAR- $\gamma$ -Expression und Patientenprognose sind widersprüchlich. Papadaki et al. (89) untersuchten Mammakarzinome immunhistochemisch und fanden, dass eine niedrige PPAR- $\gamma$ -Expression einen prognostischen Wert für ein kürzeres rezidivfreies Überleben darstellt.

Es wurde hier allerdings eine überwiegend zytoplasmatische und membranöse Expression, die für Transkriptionsfaktoren untypisch ist, beschrieben, welches Zweifel an der Validität der Immunreaktion aufkommen lässt.

All diese interessanten Ergebnisse sollten dazu anregen, das Potential der PPAR- $\gamma$ -Liganden in der Behandlung des Pankreaskarzinoms weiter zu untersuchen. Trotz des günstigen pharmakologischen Profils der Liganden muss angemerkt werden, dass zum Beispiel Troglitazone, welches im Mammakarzinom bereits als Therapeutikum getestet wurde, inzwischen von der Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (FDA) aufgrund seiner Hepatotoxizität zurückgezogen wurde. Außerdem waren die Behandlungsversuche im Liposarkom und auch im Prostatakarzinom nur teilweise erfolgreich. (90, 91, 92) Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass PPAR- $\gamma$ -Liganden die Malignität in einigen Geweben sogar fördern. (93-95)

Zusammenfassend sind weitere Studien nötig, um die prognostische und diagnostische Rolle der PPAR- $\gamma$ -Expression im Pankreaskarzinom und damit das therapeutische Potential seiner Liganden, zu belegen.

## Literaturverzeichnis

(1) National Cancer Institute Bethesda. Annual Cancer Statistics Review 1973–1988. NIH publication No 91–2789, 1991

(2) Doll R, Peto R, Wheatley K, et al.  
Mortality in relation to smoking. 40 years' observation on male british doctors.  
BMJ 1994;309:901–11.

(3) Colon KC, Klimstra DS, Brennan MF.  
Longterm survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma:  
Clinicopathologic analysis for 5-years survivors. Ann Surg 1996;223:272–9.

(4) Shinji Yamamoto, Yasuhiko Tomita, Yoshihiko Hoshida, et al.  
Prognostic Significance of Activated Akt Expression in Pancreatic  
Ductal Adenocarcinoma  
Annals of Surgical Oncology 13(7): 933-939.

(5) M Saitou, M Goto, M Horinouchi, S Tamada, et al.  
MUC4 Expression is a novel prognostic factor in patients with invasive ductal carcinoma of the  
pancreas Clin. Pathol. doi:10.1136/jcp.2004.023572 2005;58:845-852.

(6) Juuti A, Nordling S, Lundin J, et al.  
Syndecan-1 Expression – A Novel Prognostic Marker in Pancreatic Cancer  
Department of Surgery, Helsinki University Central Hospital, Department of Pathology,  
University of Helsinki and Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland  
Oncology 2005;68:97–106.

(7) Duxbury MS, Matros E, Clancy T, et al.  
CEACAM6 Is a Novel Biomarker in Pancreatic Adenocarcinoma and PanIN Lesions  
Ann Surg. 2005 Mar;241(3):491-6.

(8) Grützmann R, Lüttges J, Sipos B, et al.

ADAM9 expression in pancreatic cancer is associated with tumour type and is a prognostic factor in ductal adenocarcinoma

Br J Cancer. 2004 Mar 8;90(5):1053-8.

(9) Aigner S, Ruppert M, Hubbe M, et al.

Heat stable antigen (mouse CD24) supports myeloid cell binding to endothelial and platelet P-selectin. Int Immunol 1995;7:1557–1565.

(10) Kristiansen G, Pilarsky C, Pervan J, et al.

CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. Prostate 2004;58:183–192.

(12) Sunkel CE, Glover DM

Polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles.

J Cell Sci 1988; 89: 25–38.

(13) Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter, et al.

The protein kinase complement of the human genome.

Science 2002; 298:1912–1934.

(14) Liu X, Erikson RL

Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells.

Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 5789–5794.

(15) Spänkuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M, et al.

Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. J Natl Cancer Inst 2002; 94: 1863–1877.

(16) Elez R, Piiper A, Kronenberger B, et al.

Tumor regression by combination antisense therapy against Plk1 and Bcl-2.

Oncogene 2003; 22: 69–80.

- (17) Gelman L, Fruchart JC, Auwerx J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:932-43.
- (18) Fajas L, Debril MB, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-g: from adipogenesis to carcinogenesis. *J Mol Endocrinol* 2001;27:1-9.
- (19) Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. The localisation and reduction of nuclear staining of PPARg and PGC-1 in human breast cancer. *Oncol Rep* 2004;12:483- 8.
- (20) Segawa Y, Yoshimura R, Hase T, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer. *Prostate* 2002;51:108-16.
- (21) Cimini A, Cristiano L, Bernardo A, et al. Presence and inducibility of peroxisomes in a human glioblastoma cell line. *Biochim Biophys Acta* 2000;1474:397-409.
- (22) Theocharis S, Kanelli H, Politi E, et al. Expression of peroxisome proliferator activated receptor-g in nonsmall cell lung carcinoma: correlation with histological type and grade. *Lung Cancer* 2002;36:249- 55.
- (23) Zhang GY, Ahmed N, Riley C, et al. Enhanced expression of peroxisome proliferator-activated receptor g in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92:113-9.
- (24) Sasaki T, Fujimoto Y, Tsuchida A et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor g inhibits the growth of human pancreatic cancer. *Pathobiology* 2001;69:258-65.

(25) Wang T, Xu J, Yu X, et al.

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in malignant diseases.

Crit Rev Oncol Hematol 2005;58:1-14.

(26) Remmele W., Stegner HE

Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]

Pathologe. 1987 May;8(3):138-40. German. No abstract available.

(27) Kristiansen G, Denkert C, Schlüns K, et al.

CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent

prognostic marker of patient survival. Am J Pathol 2002;161:1215–1221.

(28) Kristiansen G, Schlüns K, Yongwei Y, et al.

CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. Br J Cancer 2003;88:231–236.

(29) Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, et al.

CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer.

Clin Cancer Res 2003;9:4906–4913.

(30) Pirucello SJ, LeBien TW

The human B cell-associated antigen CD24 is a single chain sialoglycoprotein.

J Immunol 1986;136:3779–3784.

(31) Fischer GF, Majdic O, Gaderer S, et al.

Signal transduction in lymphocytic and myeloid cells via CD24, a new member of phosphoinositol- anchored membrane molecules. J Immunol 1990;144:638–641.

(32) Lavabre-Bertrand T, Duperray C, Brunet C, et al.

Quantification of CD24 and CD45 antigens in parallel allows a precise determination of B-cell maturation stages: Relevance for the study of B-cell neoplasias. Leukemia 1994;8:402–408.

- (33) Akashi T, Shirasawa T, Hirokawa K  
Gene expression of CD24 core polypeptide molecule in normal rat tissues and human tumor cell lines. *Virchows Arch* 1994;425:399–406.
- (34) Poncet C, Frances V, Gristina R, et al.  
CD24, a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules is transiently expressed during the development of human central nervous system and is a marker of human neural cell lineage tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 1996;91:400–408.
- (35) Droz D, Zachar D, Charbit L, et al.  
Expression of the human nephron differentiation molecules in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 1990;137:895–905.
- (36) Pirruccello SJ, Lang MS: Differential expression of CD24-related epitopes in mycosis fungoides/ Sezary syndrome: A potential marker for circulating Sezary cells. *Blood* 1990;76:2343–2347.
- (37) Raife TJ, Lager DJ, Kemp JD, et al.  
Expression of CD24 (BA-1) predicts monocytic lineage in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 1994;101:296–299.
- (38) Jackson D, Waibel R, Weber E, et al.  
CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B cells, is a major surface antigen on small cell lung carcinomas. *CancerRes* 1992;52:5264–5270.
- (39) Karran L, Jones M, Morley G, et al.  
Expression of a B-cell marker, CD24, on nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* 1995;60:562–566.
- (40) Huang LR, Hsu HC: Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: A potential early tumor marker gene correlates with p53 mutation and tumor differentiation. *Cancer Res* 1995;55:4717–4721.

(41) Senner V, Sturm A, Baur I, et al.

CD24 promotes invasion of glioma cells in vivo.

J Neuropathol Exp Neurol 1999;58:795–802.

(42) Gromova I, Gromov P, Celis JE: Identification of true differentially expressed mRNAs in a pair of human bladder transitional cell carcinomas

using an improved differential display procedure. Electrophoresis 1999;20:241–248.

(43) Fogel M, Friederichs J, Zeller Y, et al.

CD24 is a marker for human breast carcinoma.

Cancer Lett 1999;143:87–94.

(44) Yang GP, Ross DT, Kuang WW, et al.

Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. Nucleic Acids Res 1999; 27:1517–1523.

(45) Liu W, Vadgama JV

Identification and characterization of amino acid starvation-induced CD24 gene in MCF-7 in human breast cancer cells. Int J Oncol 2000;16:1049–1054.

(46) Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, et al.

Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer.

Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:1176–1181.

(47) Shirasawa T, Akashi T, Sakamoto K, et al.

Gene expression of CD24 core peptide molecule in developing brain and developing non-neural tissues. Dev Dyn 1993;198:1–13.

(48) Figarella-Branger D, Moreau H, Pellissier JF, et al.

CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B lymphocytes, is a marker for human regenerating muscle. Acta Neuropathol (Berl) 1993;86:275–284.

(49) Redondo P, Garcia-Foncillas J, Okroujnov I, et al.

CD24 expression on human keratinocytes.

Exp Dermatol 1998;7:175–178.

(50) Chappel MS, Hough MR, Mittel A, et al.

Cross-linking the murine heat-stable antigen induces apoptosis in B cell precursors and suppresses the anti-CD40- induced proliferation of mature resting B lymphocytes.

J Exp Med 1996;184:1638–1649.

(51) Suzuki T, Kiyokawa N, Taguchi T, Sekino et al.

CD24 induces apoptosis in human B cells via the glycolipid-enriched membrane domains/rafts-mediated signaling system.

J Immunol 2001;166:5567–5577.

(52) Nestl A, Von Stein OD, Zatloukal K, Thies et al.

Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors.

Cancer Res 2001;61:1569–1577.

(53) Kohlgraf KG, Gawron AJ, Higashi M, et al.

Contribution of the MUC1 tandem repeat and cytoplasmic tail to invasive and metastatic properties of a pancreatic cancer cell line.

Cancer Res 2003;63:5011–5020.

(54) Han H, Bearss DJ, Browne LW, et al.

Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray.

Cancer Res 2002;62:2890–2896.

(55) Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al.

Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res. 2007 Feb 1;67(3):1030-7.

(56) Fischer A, Blanche S, Le Bidois J, et al.

Anti-B-cell monoclonal antibodies in the treatment of severe B-cell lymphoproliferative syndrome following bone marrow and organ transplantation. *N Engl J Med* 1991;324:1451–1456.

(57) Benkerrou M, Jais JP, Leblond V, et al.

Anti-B-cell monoclonal antibody treatment of severe posttransplant B-lymphoproliferative disorder: Prognostic factors and long-term outcome. *Blood* 1998;92:3137–3147.

(58) Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al.

Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007 Feb 1;67(3):1030-7.

(59) Barr FA, Sillje HH, Nigg EA

Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 429–440.

(60) Golan A, Yudkovsky Y, Hershko A

The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J Biol Chem* 2002; 277:15552–15557.

(61) Wolf G, Elez R, Doermer A, et al.

Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1997; 14: 543–549.

(62) Weichert W, Schmidt M, Gekeler V, et al

Polo like kinase 1 is overexpressed in prostate cancer and linked to higher tumor grades. *Prostate* 2004; 60: 240–245.

(63) Takahashi T, Sano B, Nagata T, et al.

Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci* 2003; 94: 148–152.

(64) Ito Y, Miyoshi E, Sasaki N, et al.

Polo-like kinase 1 overexpression is an early event in the progression of papillary carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 90: 414–418.

(65) Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, et al.

Expression of pololike kinase (PLK1) in thin melanomas: A novel marker of metastatic disease. *J Cutan Pathol* 2002; 29: 354–358.

(66) Weichert W, Denkert C, Schmidt M, et al.

Polo like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 90: 815–821.

(67) Gray PJ Jr, Bearss DJ, Han H, et al.

Identification of human polo-like kinase 1 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 641–646.

(68) Ghadimi BM, Schrock E, Walker RL, et al.

Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am J Pathol* 1999; 154: 525-536.

(69) Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD.

An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 2005;51:85-94.

(70) Marcus SL, Miyata KS, Zhang B, et al.

Diverse peroxisome proliferator-activated receptors bind to the peroxisome proliferator-responsive elements of the rat hydratase/ dehydrogenase and fatty acyl-CoA oxidase genes but differentially induce expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5723-7.

(71) Zhu YJ, Crawford SE, Stellmach V, et al.

Coactivator PRIP, the peroxisome proliferator-activated receptor interacting protein, is a modulator of placental, cardiac, hepatic, and embryonic development. *J Biol Chem* 2003;278:1986-90.

(72) Lemberger T, Desvergne B, Wahli W.

Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:335-63.

(73) Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, et al. Tissue distribution

and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor- $\alpha$  in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997;46:1319-27.

(74) Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, et al.

Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7355-9.

(75) Asou H, Verbeek W, Williamson E, et al.

Growth inhibition of myeloid leukemia cells by troglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , and retinoids.

*Int J Oncol* 1999;15:1027-31.

(76) Zang C, Liu H, Posch MG, et al.

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands induce growth inhibition and apoptosis of human B lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2004;28:387-97.

(77) Sato H, Ishihara S, Kawashima K, et al.

Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$  in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR $\gamma$  agonists.

*Br J Cancer* 2000;83:1394-400.

(78) Sarraf P, Mueller E, Smith WM, et al.

Loss-of-function mutations in PPAR  $\gamma$  associated with human colon cancer. *Mol Cell* 1999;3:799-804.

(79) Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, et al.

Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR  $\gamma$ . *Mol Cell* 1998;1:465-70.

(80) Haydon RC, Zhou L, Feng T, et al.

Nuclear receptor agonists as potential differentiation therapy agents for human osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 2002;8: 1288 - 94.

(81) Grommes C, Landreth GE, Schlegel U, et al.

The nonthiazolidinedione tyrosine-based peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligand GW7845 induces apoptosis and limits migration and invasion of rat and human glioma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313:806-13.

(82) Eibl G, Wenthe MN, Reber HA, et al.

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  induces pancreatic cancer cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:522-9.

(83) Elstner E, Muller C, Koshizuka K, et al.

Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci US A* 1998;95:8806-11.

(84) Chattopadhyay N, Singh DP, Heese O, et al.

Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human astrocytic cells: PPAR $\gamma$  agonists as inducers of apoptosis. *J Neurosci Res* 2000;61: 67-74.

(85) Farrow B, O'Connor KL, Hashimoto K, et al. Selective activation of PPAR $\gamma$  inhibits pancreatic cancer invasion and decreases expression of tissue plasminogen activator. *Surgery* 2003;134: 206-12.

(86) Sawai H, Liu J, Reber HA, et al.

Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  decreases pancreatic cancer cell invasion through modulation of the plasminogen activator system. *Mol Cancer Res* 2006;4:159-67.

(87) Motomura W, Okumura T, Takahashi N, et al.

Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27Kip1 in human.

Pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2000;60:5558-64.

(88) Itami A, Watanabe G, Shimada Y, et al.

Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  inhibit growth of pancreatic cancers both in vitro and in vivo.

*Int J Cancer* 2001;94:370-6.

(89) Papadaki I, Mylona E, Giannopoulou I, Markaki, et al.

PPAR $\gamma$  expression in breast cancer: clinical value and correlation with ER. *Histopathology* 2005;46:37- 42.

(90) Tontonoz P, Singer S, Forman BM, et al.

Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and the retinoid X receptor.

*Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:237 - 41.

(91) Hisatake JI, Ikezoe T, Carey M, et al.

Down-regulation of prostate-specific antigen expression by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in human prostate cancer.

*Cancer Res* 2000;60:5494-8.

(92) Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E, et al.

Use of the peroxisome proliferator- activated receptor (PPAR)  $\gamma$  ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase

II study. *Breast Cancer Res Treat* 2003;79:391-7.

(93) Saez E, Rosenfeld J, Livolsi A, et al.

PPAR  $\gamma$  signaling exacerbates mammary gland tumor development.

*Genes Dev* 2004;18:528-40.

(94) Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, et al.

Activators of the nuclear receptor PPAR $\gamma$  enhance colon polyp formation.

Nat Med 1998;4:1058-61.

(95) Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, et al.

Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APC<sup>Min/+</sup> mice.

Nat Med 1998;4: 1053 - 7.

(96) Eskelinen MJ, Haglund UH

Prognosis of human pancreatic adenocarcinoma: review of clinical and histopathological variables and possible uses of new molecular methods

Eur J Surg. 1999; 165(4): 292-306.

## Abkürzungen

CD24	Cluster of Differentiation 24
PLK1	Polo-Like kinase 1
PPAR- $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
LSAB	Labelled Streptavidin Avidin Biotin
UICC	Union Internationale contre le cancer
RNA	Ribonucleic acid
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
SSH	suppression subtractive hybridization
TMA	tissue micro array
FDA	Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **Erklärung**

**„Ich, Juliane Jacob, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:**

Expressionsanalyse von Tumorprogressionsmarkern im Pankreaskarzinom am Beispiel von CD24, PLK-1 und PPAR- $\gamma$

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

## Anteilserklärung

Frau Juliane Jacob hat in ihrer Promotionsarbeit „Expressionsanalyse von Tumorprogressionsmarkern im Pankreaskarzinom am Beispiel von CD24, PLK-1 und PPAR- $\gamma$ “ an der Planung, Durchführung und Auswertung immunhistochemischer Reaktionen an humanen Tumoren mitgewirkt. Da ihr das Verdienst zukommt, dass diesen Arbeiten zugrunde liegende Pankreaskarzinomkollektiv erstmalig zusammengestellt und bezüglich des klinischen Verlaufes charakterisiert zu haben, hat sie bei der Entstehung dieser Arbeiten eine ganz zentrale Rolle gespielt.

Frau Jacob hat insbesondere das Projekt „CD24 im Pankreaskarzinom“ intensiv mitbearbeitet (an der praktischen Durchführung (Immunhistochemie 90%, Auswertung 60%, Manuskript schreiben 70%) hat sie einen geschätzten Anteil von etwa 70% der Arbeiten), welches ihre Erstautorenschaft der daraus resultierenden Publikation begründet.

Ihr direkter Anteil an der Arbeit: „Overexpression of Polo-Like kinase 1 is a Common and early Event in Pancreatic Cancer“ liegt etwas niedriger (Immunhistochemie 30%, Auswertung 20%, Manuskript erstellen 10%).

Bei der Arbeit: „Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is highly expressed in pancreatic cancer and is associated with shorter overall survival times“ ist der von Frau Jacob geleistete Arbeitsanteil: Immunhistologie 50%, Auswertung 30%, Manuskript erstellen 20%.

Auch sollte erwähnt werden, dass dieses Tumorkollektiv in weitergehenden Projekten, deren Ergebnisse zum Teil bereits zur Publikation angenommen sind (Weichert W, Böhm M, Gekeler V, Bahra M, Langrehr J, Neuhaus P, Denkert C, Niesporek S, **Jacob J**, Dietel M, Scheidereit C, Kristiansen G. Nf $\kappa$ B subunit RelA/p65 is frequently overexpressed and activated in pancreatic cancer and bears prognostic potential. British Journal of Cancer, 2007, im Druck.), eingesetzt wurde und auch in laufenden Projekten Verwendung findet.

Berlin, den 19.06.2007

PD Dr.med. Glen Kristiansen

Juliane Jacob

## Danksagung

Ich möchte allen, die mich im Laufe der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, begleitet haben, an dieser Stelle Dank sagen.

Als erstes gebührt der Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Glen Kristiansen und den Mitgliedern der Arbeitsgruppe AG Expressionsanalyse humaner Karzinome.

Ich danke Frau Britta Beyer, ebenso Herrn Dr. Wilko Weichert sowie Herrn Dr. med. Christian Pilarsky.

Ich danke dem Direktor des Instituts für Pathologie (Campus Mitte), Charité Universitätsmedizin Berlin, Herrn Prof. Dr. Manfred Dietel für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren.

Für die freundliche und hilfsbereite Aufnahme und anregenden Gespräche danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Charité.

Meiner Familie und besonders meinen Eltern bin ich für den stets wohlwollenden und uneingeschränkten Rückhalt, der mir nicht nur während meines Studiums und der Promotion zuteil wurde, von ganzem Herzen dankbar. Martin, Danke!