

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Pathologie des Evangelischen Krankenhauses Oberhausen

Risikostratifizierung des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas mittels
immunhistologischer Marker an endosonographischen Feinnadelaspiraten (EUS-FNA)

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Ruth Lippert
aus Köln
2024

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
D U I S B U R G
E S S E N

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/83406

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20250507-115056-7

Alle Rechte vorbehalten.

- Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med J. Buer
1. Gutachter/in: Herr Priv.-Doz. Dr. med. K.J. Schröder
2. Gutachter/in: Frau Prof. Dr. med C. Veltkamp
3. Gutachter/in: Herr Univ.-Prof. Dr. med. A. Canbay

Tag der mündlichen Prüfung: 11 April 2025

1 EINLEITUNG	6
1.1 Das Pankreaskarzinom	6
1.2 Risikostratifizierung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas	7
1.2.1 Molekulare Subtypen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas	7
1.2.2 Tumor-Mikroumgebung	9
1.2.3 Pankreatisches Tumorstroma und Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs)	10
1.2.4 Immunologische Umgebung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas	11
1.2.5 Immunologische Subtypen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas	13
1.3 Immuntherapie	14
2 DIE ENDOSONOGRAPHISCHE FEINNADELASPIRATION	16
3 FRAGESTELLUNGEN	18
4 MATERIAL UND METHODEN	19
4.1 Aufarbeitung der Proben	19
4.1.1 Aufarbeitung der flüssigen Bestandteile	20
4.1.2 Solide Bestandteile	21
4.2 Patientendaten	22
4.2.1 Auswertung der Immunhistochemie	23
4.2.2 Statistische Analyse	25
4.3 Antikörper	25

4.3.1	CD163 (MRQ-26)	25
4.3.2	CD68 (PG-M1).....	26
4.3.3	FOXP3 (EP340)	27
4.3.4	CTLA-4 (F-8).....	28
5	ERGEBNISSE.....	30
5.1	Tumorstadium bei Diagnose	30
5.1.1	T-Stadium bei Diagnose.....	32
5.1.2	N-Stadium bei Diagnose	32
5.1.3	M-Stadium bei Diagnose.....	32
5.1.4	Expressions-Gruppen	33
5.1.5	CD163	33
5.1.6	CD68	33
5.1.7	FOXP3.....	34
5.1.8	CTLA4	34
5.2	Zusammenhang zwischen Antikörper-Expression und Überlebenszeit.....	35
6	DISKUSSION	37
7	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	41
8	LITERATURVERZEICHNIS	43
9	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	48

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	49
11 DANKSAGUNG	50
12 LEBENSLAUF	51

1 EINLEITUNG

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist mit einem Anteil von 8,7 % (bei Frauen) bzw. 7,4 % (bei Männern) die vierthäufigste Krebstodesursache bei beiden Geschlechtern. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate ist ungünstig und beträgt lediglich 10%, somit weist das Pankreaskarzinom neben dem Mesotheliom die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt bei Frauen 76 Jahre und bei Männern 72 Jahre.(Erdmann et al., 2021)

Als gesicherte Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom gelten Rauchen, Adipositas und chronische Pankreatitis. Ebenso werden sehr hoher Alkoholkonsum und Infektionen mit Erregern wie *Helicobacter pylori*, Hepatitis und HIV mit der Entstehung von Pankreaskarzinomen in Verbindung gebracht. Verwandte ersten Grades von Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs sind ebenfalls überdurchschnittlich häufig betroffen, hierfür können erbliche Faktoren verantwortlich sein (z.B. eine BRCA-Mutation) oder ein gemeinsamer Lebensstil. Der häufige Konsum von verarbeiteten Fleischwaren, geräucherten und gegrillten Speisen könnte ebenfalls das Risiko für Bauchspeicheldrüsenkrebs erhöhen. Welche Rolle Umweltfaktoren oder berufliche Schadstoffbelastungen spielen, ist nicht eindeutig geklärt. (Erdmann et al., 2021)

Die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms liegt vor allem darin begründet, dass die Erkrankung erst spät zu Symptomen führt. Bei etwa 50% der Patienten liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits ein metastasiertes Tumorstadium vor, bei weiteren 30-40% der Patienten eine lokal fortgeschrittene Erkrankung, so dass nur 10-20% der Patienten überhaupt für eine kurative Resektion in Frage kommen. (Häberle et al., 2015)

Die Symptome eines Pankreaskarzinoms sind überwiegend unspezifisch. Rücken- oder Oberbauchschmerzen bei Patienten über 60 Jahre oder ein neu aufgetretener schmerzloser Ikterus bei Patienten über 40 Jahre sollten eine zeitnahe Abklärung mittels Computertomographie auslösen und können zur Diagnosestellung führen. Zur Therapiefindung werden Pankreaskarzinome als resektabel, Borderline-resektabel, lokal fortgeschritten oder metastasiert kategorisiert. Eine resektable Erkrankung wird mittels chirurgischer Resektion und adjuvanter Chemotherapie behandelt. Borderline-resektable und lokal fortgeschrittene Befunde werden mittels neoadjuvanter Chemotherapie behandelt,

gefolgt von einer chirurgischen Exploration bei non-progressiver Erkrankung. Metastasierte und nicht resektable Erkrankungen werden mittels Chemotherapie oder Best Supportive Care behandelt. (Loveday et al., 2019)

Bei den histologischen Typen macht das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) etwa 90% der pankreatischen Tumore aus. Deswegen konzentrieren sich die meisten Studien und klinischen Praktiken auf das PDAC. (Puleo et al., 2018)

1.2 Risikostratifizierung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas

1.2.1 Molekulare Subtypen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas

Es gibt verschiedene Ansätze zur molekularen Subtypisierung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas:

Collisson et al. waren 2011 die ersten, die das duktales Adenokarzinom des Pankreas basierend auf seiner Gen-Expression in Subtypen eingeteilt haben. Es war möglich, drei verschiedene prognostische Subtypen zu unterscheiden: klassisch, quasi-mesenchymal und exokrin-like. Der klassische Typ war definiert durch seine hohe Expression von adhäsions-spezifischen und epithelialen Genen und zeigte die besten Überlebensraten. Der quasi-mesenchymale Typ zeigte eine höhere Expression an mesenchymalen Genen und war mit der schlechtesten Prognose assoziiert. Der exokrine Subtyp zeigte eine Expression von Genen die charakteristisch für die exokrine Pankreasfunktion sind. (Collisson et al., 2011)

Unter Berücksichtigung von Daten aus Mikroarray-Genexpressionsanalysen von Primärtumoren, Metastasen und Normalgeweben konnten Moffitt et al. 2015 zwei Tumorsubtypen identifizieren: einen „klassischen“ Subtyp, ähnlich dem vom Collisson et al. vorgeschlagenen klassischen Typ und einen „basal-like“-Subtyp, vergesellschaftet mit einem schlechteren Outcome und molekularer Ähnlichkeit zu basalen Tumoren in der Harnblase sowie der Mamma. (Moffitt et al., 2015)

2016 beschrieben Bailey et al. insgesamt 32 rekurrente mutierte Gene, die in 10 Pathways enden. Die Expressionsanalyse definierte hier 4 Subtypen, die mit histopathologischen Charakteristika einhergingen: squamös, „pancreatic progenitor“, immunogen und aberrant differenziert endokrin-exokrin (ADEX). Der squamöse Typ zeigte die schlechteste Prognose und überlappt sich mit dem von Collisson et al. beschriebenen quasi-mesenchymalen Subtyp. (Bailey et al., 2016)

Die durch das „The Cancer Genome Atlas“- Programm (TCGA) 2017 erhobenen Daten unterstützen allerdings nur die Existenz von zwei unterschiedlichen molekularen Subtypen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas: den „basal-like“/squamos/quasi-mesenchymalen Subtyp, charakterisiert durch basale Marker und eine schlechte Prognose und den klassischen/“pancreatic progenitor“-Subtyp, charakterisiert durch duktales Marker und eine bessere Prognose. Die anderen Subtypen (ADEX, immunogen etc.) zeigten in den Untersuchungen eine niedrige neoplastische Zellularität, so dass hier anzunehmen ist, dass überwiegend Stroma und pankreatisches Normalgewebe zur Genexpression beigetragen haben. (Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address and Cancer Genome Atlas Research, 2017)

In Übereinstimmung mit diesen zwei Subtypen identifizierten Mueller et al. 2018 mittels Untersuchungen von RNA-Sequenzierungs-Daten von PDAC's bei Mäusen zwei Cluster, die wesentlich mit den zwei humanen Subtypen überlappten: C1, mit mesenchymaler Zelldifferenzierung und C2, mit epithelialer Zelldifferenzierung. Diese Ergebnisse verknüpften den aggressiven C1 PDAC Subtypen mit der höchsten Expression an *Kras* und RAS-bezogenen Transkriptionsprogrammen. Zudem zeigte sich, dass humane undifferenzierte duktales Adenokarzinome des Pankreas eine reduzierte Expression an Genen, die im Zusammenhang mit einer epithelialen“ Differenzierung exprimiert werden, und eine Hochregulierung der mit einer epitheliale-mesenchymalen Transformation und dem RAS-Signalweg assoziierten Genen zeigten. (Mueller et al., 2018)

Die Untersuchungen von Qian et al. zeigten ferner DNA-Alterationen in den *KRAS*-, *CKDN2A*-, *SMAD4*- und *TP53* Genen und konnten nachweisen, dass unterschiedliches Patienten-Outcome mit Alterationen in diesen vier Genen verknüpft sind. So zeigten Patienten mit *KRAS*-mutierten Tumoren ein schlechteres Outcome als Patienten mit *KRAS* Wildtyp und Patienten mit einer größeren Anzahl an Treibermutationen hatten ein insgesamt schlechteres erkrankungsfreies Überleben und Gesamtüberleben als Patienten mit weniger Treibermutationen. (Qian et al., 2018)

Zusätzlich zeigte sich ein Einfluss bestimmter epigenetischer Pathways, funktionierend als Effektoren gut bekannter genetischer Alterationen, auf den PDAC-Phänotyp. Dementsprechend ist anzunehmen, dass an einem Punkt während der Tumorgenese eine Kombination aus Umweltfaktoren und Tumor-intrinsischen Faktoren, wie zum Beispiel der Tumor-Mikroumgebung, die Zellen durch verschiedene epigenetische Alterationen treiben. (Paradise et al., 2018)

Es zeigte sich ferner ein Zusammenhang zwischen den hier dargestellten molekularen Subtypen und der histologischen Differenzierung des Pankreaskarzinoms: Der squamöse Subtyp war häufig mit Tumoren mit adenosquamöser Differenzierung assoziiert. Der „pancreatic progenitor“ Typ sowie der immunogene Typ zeigte häufig eine Vergesellschaftung mit muzinösen, nicht-zystischen (kolloidalen) Tumoren sowie muzinösen Adenokarzinomen. Der ADEX-Subtyp schloss seltene Azinuszellkarzinome ein. (Bailey et al., 2016)

1.2.2 Tumor-Mikroumgebung

Tumor-Mikroumgebung bezeichnet die Umgebung, in der Tumorzellen entstehen und wachsen. Sie schließt Mikrogefäße und die umgebenden Zellen ein: Immunzellen, Fibroblasten, Gliazellen, endotheliale Zellen, Neurone, die umgebende Matrix und zahlreiche Biomoleküle wie Wachstumsfaktoren, Chemokine und unterschiedliche proteolytische Enzyme. Zusammen ergeben diese eine Mikroumgebung mit einer persistierenden immuno-inflammatorischen Reaktion, Hypoxie, niedrigem pH und hohem Druck. Diese Charakteristika fördern Tumorwachstum und Invasion, Angiogenese, Therapieresistenzen sowie das Auftreten sowie die Entwicklung von Tumoren. (Hessmann et al., 2020)

Insbesondere das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist gegenüber vielen der zurzeit verfügbaren Therapiemöglichkeiten refraktär. Es gilt als ein Tumortyp mit niedriger Immunogenität mit einer immunsuppressiven Tumor-Mikroumgebung. Therapien mittels Immun-Checkpoint-Inhibitoren haben bislang lediglich eine geringe Erfolgsrate gezeigt. Zudem gibt es für das duktales Pankreaskarzinom bislang keine Target-Therapie der bekannten Treibermutationen dieser Tumorentität (KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4). (Karamitopoulou, 2019)

Um eine Immuntherapie für Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas effektiv zu gestalten, ist das Verständnis der Beziehung zwischen Stroma, neoplastischen Zellen und Immunzellen unerlässlich. (Knudsen et al., 2017)

Die Zusammensetzung der Tumor-Mikroumgebung ist verknüpft mit den Kennzeichen eines Tumors: Anhaltende Proliferationskapazität, Zelltodresistenz, unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit, Resistenz gegen Wachstumshemmung, Invasion und Metastasen, Vermeiden der Immunabwehr, Angiogenese, Deregulierung des Zellmetabolismus, Phänotypische Plastizität, epigenetisches Reprogramming, polymorphes Mikrobiom und Zellseneszenz. (Hanahan, 2022)

Das Verständnis des komplexen Zusammenspiels zwischen Tumorzellen und Wirtszellen in der Tumor-Mikroumgebung wächst ständig: So zeigen z.B. aggressive duktale Adenokarzinome des Pankreas eine erhöhte Anzahl an dissoziativ wachsenden, wandernden Tumorzellen an der Invasionsfront, genannt Tumorknospen („tumour buds“), welche sich als unabhängiger negativer Prognosefaktor gezeigt haben. (Karamitopoulou and Gloor, 2013)

Diese Tumorknospen zeigen häufig eine verminderte E-Cadherin-Expression bei Überexpression anderer epithelial-mesenchymaler Transitionsbiomarker (EMT) sowie eine Dysregulation in der microRNA. Es gibt Hinweise darauf, dass Komponenten der Tumor-Mikroumgebung wie zum Beispiel das Stroma ein EMT-ähnliches Tumor budding unterstützen, indem sie große Mengen an E-Cadherin-Suppressoren exprimieren und/oder zur microRNA-Dysregulation beitragen. (Karamitopoulou et al., 2017)

Es gibt ferner eine zunehmende Anzahl an Hinweisen, die die epithelial-mesenchymale Transition mit Eigenschaften von Tumorstammzellen verknüpfen und die darauf deuten, dass Tumorknospen eine Subpopulation wandernder Tumorstammzellen darstellen. Zudem zeigen EMT-ähnliche Zellen (wie zum Beispiel Tumorknospen) ähnliche molekulare Charakteristika wie Tumorstammzellen, sie sind beide medikamentenresistent und zeigen ein hohes metastatisches Risiko. (Karamitopoulou, 2019)

1.2.3 Pankreatisches Tumorstroma und Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs)

Die Tumor-Mikroumgebung im duktalem Adenokarzinom des Pankreas ist charakterisiert durch eine dichte Population desmoplastischer Stromazellen. Diese stellen 50-80% des Tumolvolumens dar. (Haqq et al., 2014)

Die Rolle der Tumor-assoziierten Fibroblasten in der Entwicklung des duktalem Adenokarzinom des Pankreas ist umstritten.

Neue Studien zeigen zunehmende Hinweise darauf, dass die Population an CAFs im duktalem Adenokarzinom des Pankreas heterogen ist und unterschiedliche CAF-Subtypen das Tumorwachstum unterstützen, während andere das Tumorwachstum unterdrücken. Eine Target-Therapie, ausgerichtet auf CAFs könnte der Schlüssel zu einer neuen Therapie des Pankreaskarzinoms werden. (Geng et al., 2021)

Es zeigte sich zudem, dass CAFs eine Rolle in der Chemotherapie-Resistenz des duktalem Pankreaskarzinoms, zum Beispiel gegenüber Gemcitabine, spielen und die Zusammensetzung der CAFs in der Tumor-Mikroumgebung ein Indikator für eine angepasste Therapie, zum

Beispiel eine Kombination aus einem PDGFR-Inhibitor und Gemcitabine sein kann. (Zhu et al., 2022)

1.2.4 Immunologische Umgebung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas gilt traditionell als „nicht-immunogene“ Neoplasie, in der zahlreiche Methoden der Immunevasion zum Tragen kommen.

Die Tumor-Mikroumgebung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas entspricht einem Stadium „lokalisierter Entzündung“, in dem Tumorzellen mit infiltrierenden Immunzellen wie Neutrophilen, Mastzellen, Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM), myeloischen Suppressor-Zellen (MDSC), T-Zellen und vielen anderen Immunzellen interagieren. (Zheng et al., 2013)

Die vorliegende Arbeit untersucht vor allem regulatorische T-Zellen sowie Tumor-assoziierte Makrophagen.

T-Zellen:

T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle in der adaptiven Immunität und sind entscheidend in der Tumormunität. Sie haben sowohl pro-tumorgene als auch anti-tumorgene Eigenschaften. Sie sind die wichtigsten Effektorzellen in der Tumor-Mikroumgebung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas und haben zahlreiche Subtypen mit unterschiedlicher Funktion und zahlreiche Verknüpfungen mit anderen Komponenten der Immunantwort. (Zhu et al., 2023)

T-Zellen in der Mikroumgebung des Pankreaskarzinoms beinhalten $CD8^+$ cytotoxische T-Zellen (CTL), auch bekannt als Effektor-T-Zellen (Teff), $CD4^+$ T-Zellen wie T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen (Treg) und natürliche Killerzellen (NK). (Ostios-Garcia et al., 2021)

Treg ist ein wichtiger Subtyp von $CD4^+$ T-Zellen, deren häufigstes gemeinsames Merkmal eine positive Reaktion mit FOXP3 ist. Treg sind verantwortlich für die Toleranz gegenüber Eigen-Antigenen in gesunden Geweben. In pathologischen Situationen kann von Treg sezerniertes IL-10 und TGF- β allerdings dazu führen, dass der Gehalt an $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sinkt und es somit zur Entstehung eines immunsuppressiven Milieus kommt, das die Tumorprogression fördert. (Bhatia et al., 2022)

Treg haben einen immunsuppressiven Effekt auf Zellen wie z.B. CD8⁺ T-Zellen. Die Immunsuppression von Tumorzellen entspringt überwiegend der PD-L1-Expression, welche an PD-1 auf der Oberfläche von Effektor-T-Zellen und M2-Tumormakrophagen (M2 TAM) bindet. Der PD-1/PD-L1-Signalweg (der CTLA-4/B7 Signalweg) generiert Signale zur Inaktivierung von T-Zellen, die eine Immunevasion möglich machen und ein immunsuppressive Mikroumgebung schaffen. (Zhu et al., 2023)

Dementsprechend korreliert ein hoher Gehalt an Treg mit einer schlechteren Prognose wie kürzerem erkrankungsfreiem Intervall und schlechterem Überleben. (Zheng et al., 2013)

Treg sind überwiegend im Tumorstroma lokalisiert und die Hauptmasse findet sich in den assoziierten Lymphknoten des PDAC. (Ware et al., 2020)

Der Gehalt an Treg nimmt von pankreatischer intraepithelialer Neoplasie (PanIN) bis zum PDAC kontinuierlich zu. Neue Studien über die Mechanismen von Treg haben interessante Ergebnisse gezeigt. Es zeigte sich, dass eine Deletion der Treg den immunsuppressiven Effekt der Tumor-Mikroumgebung des PDAC nicht abmildern konnte. Vielmehr kam es durch den Verlust des inhibitorischen Effektes von TGC- β auf tumorassoziierte Fibroblasten zu einer Erholung der Immunsuppression und Förderung der Karzinogenese. (Aykut et al., 2020; Zhang et al., 2020)

Makrophagen und tumor-assoziierte Makrophagen (TAM):

Makrophagen benutzen Phagozytose, um alte oder gefährliche Zellen und Zelldetritus zu entfernen und produzieren Zytokine, proteolytische Enzyme und Metabolite. Makrophagen liegen neben Blutgefäßen und je gefäßreicher eine Läsion ist, desto mehr Makrophagen hat sie. Makrophagen machen den größten Teil der Zellen in der Tumor-Mikroumgebung des PDAC aus (bis 50% der Tumormasse). (Zhu et al., 2023)

Tumorzellen rekrutieren mithilfe verschiedener Zytokine zirkulierende Monozyten in die Tumor-Mikroumgebung und induzieren ihre Transformation zu Makrophagen. Diese infiltrierenden Makrophagen werden tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) genannt. TAM sollten eine anti-tumorgene Rolle spielen, sind aber in ihrer Gesamtheit gesehen immunsuppressiv und Tumor-fördernd. Tumorzellen haben nicht nur Mechanismen zur Vermeidung von Phagozytose, sondern können auch die Differenzierung von TAM in immunsuppressive Subtypen fördern. Zusätzlich fördern TAM die Angiogenese. (Wei et al., 2022)

TAM exprimieren Immun-Checkpoint-Liganden wie PD-L1, in Kombination mit Immun-Checkpoint-Rezeptoren wie PD-1 fördern diese die CD8⁺ T-Zell-Dysfunktion. Zudem

sezernieren TAM verschiedene Zytokine, die die Aktivität von Immun-Effektor-Zellen reduzieren und andere immunsuppressive Zellen wie Treg rekrutieren. TAM fördern weiterhin die Tumordinvasion und Metastasierung, indem sie die Matrix mit verschiedenen Substanzen fördernd beeinflussen. Zudem spielen TAM eine wichtige Rolle in der Medikamenten-Resistenz, indem sie zum Beispiel die Wirkung von Impfstoffen vermindern. (Zhu et al., 2023)

Die Population an TAM ist heterogen und kann funktionell in zwei verschiedene Subtypen eingeteilt werden:

M1-TAM sind klassifiziert als pro-inflammatorischer oder „killing“ Phänotyp. Sie sind charakterisiert durch Phagozytose und die Produktion großer Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen. Sie können zusätzlich die Immunaktivität von Immunzellen wie T1-Helferzellen stimulieren und damit Tumorzellen zerstören.

M2-TAM werden als Tumor-fördernder oder restaurativer Phänotyp beschrieben. Bestimmte Interleukine wie IL-4 können die Polarisation von M2-Makrophagen stimulieren und so über die Bildung von TGF- β und IL-10 die immunsuppressive Aktivität von T2-Helferzellen und Treg steigern und so Invasion, Metastasierung und Therapieresistenz fördern. Dementsprechend sind M2-TAM mit einer schlechteren Prognose assoziiert. (Baig et al., 2020)

1.2.5 Immunologische Subtypen des duktales Adenokarzinom des Pankreas

Die in Kapitel 1.2.1-1.2.2 beschriebenen Studien haben gezeigt, dass eine Unterteilung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas auch hinsichtlich immunologischer Kriterien möglich ist. Diese Subtypen zeigen eine hohe Varianz in ihrem genetischen Hintergrund sowie der zellulären Zusammensetzung ihrer Tumor-Mikroumgebung, die in verschiedenen Phänotypen und prognostischen/prädiktiven Kategorien resultiert. (Karamitopoulou, 2019)

Folgende Phänotypen lassen sich definieren:

„Immune-Escape“- Phänotyp:

Dieser Phänotyp beinhaltet den Großteil der duktales Adenokarzinome des Pankreas. Er zeigt hochgradig immunsuppressive Eigenschaften mit einer Tumor-Mikroumgebung reich an Treg und M2-polarisierten Makrophagen und ist arm an T-Effektor-Zellen. (Facciabene et al., 2012)

Er ist assoziiert mit einem aggressiven Phänotyp mit hochgradigem EMT-like Tumor budding und ungünstigen klinisch-pathologischen Eigenschaften mit schlechter Prognose. (Karamitopoulou, 2019)

„Immune-Rich“-Phänotyp:

Dieser Phänotyp beinhaltet duktale Adenokarzinome des Pankreas mit hochgradig zytotoxischem Immunphänotyp. Diese Pankreaskarzinome sind charakterisiert durch eine „immun-reiche“ Tumor-Mikroumgebung mit zahlreichen CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen und M1-Makrophagen bei geringem Gehalt an immunsuppressiven Zellen wie Treg und M2-Makrophagen. Diese Tumore zeigen ein niedriges Level an Tumor-Budding und günstige klinisch-pathologische Eigenschaften wie ein verlängertes Überleben. (Wartenberg et al., 2018)

„Immune-Exhausted“-Phänotyp:

Dieser Phänotyp beinhaltet duktale Adenokarzinome des Pankreas mit einer Kombination aus ungünstigen klinisch-pathologischen Eigenschaften wie häufiges Tumor-Budding kombiniert mit einer immun-reichen Mikroumgebung. Man vermutet, dass der Selektionsdruck eines hoch zytotoxischen Immunphänotyps zur Entwicklung von immun-evasiven Mechanismen in den Tumorzellen führt wie z.B. einer Amplifikation von PD-L1/2- Genen, Hochregulierung inhibitorischer Zytokine und des JAK/STAT-Pathways. (Spranger and Gajewski, 2018)

Dadurch wird, trotz einer „Immun-reichen“ Mikroumgebung, der eigentlich vorhandene Anti-Tumor-Effekt der Tumorumgebung negiert und diese Tumore zeigen ein biologisches Verhalten ähnlich von Tumoren mit einer immunsuppressiven Mikroumgebung. Diese Tumore zeigen eine hohe PD-L1 Expression, eine immunogene Mikroumgebung reich an T-Zellen, inklusive Treg, sowie einen Verlust von DNA mismatch repair-Proteinen. (Karamitopoulou, 2019)

1.3 Immuntherapie

Die Immuntherapien maligner Tumoren haben sich mit gutem Erfolg entwickelt, allerdings ist die Anwendung dieser Therapien beim Pankreaskarzinom bislang nicht befriedigend. Dazu ist es notwendig, die immunologischen Charakteristika des PDAC genau zu verstehen. Als mögliche Mechanismen kommen hierbei zum Beispiel eine Manipulation der T-Zell-vermittelten Immunantwort über eine Blockade der Immun-Checkpoints wie z.B. PD-L1 und CTLA-4 oder auch eine Blockade des TGF- β -Signalweges in Betracht. Zudem gibt es

zahlreiche weitere Angriffsmöglichkeiten, z.B. über eine Manipulation von Tyrosinkinase oder bestimmter metabolischer Checkpoints, um eine „tumor-feindliche“ Mikroumgebung zu erschaffen. Auch die Möglichkeit eines Tumorpfostoffes wird zurzeit untersucht. Um einen therapieresistenten „immun-kalten“ Tumor wie das Pankreaskarzinom in einen therapierbaren „immun-heißen“ Tumor umzuwandeln, benötigt es eine Kombination aus geeigneten Targets wie Immun-Checkpoint-Molekülen und effektiven Tumor-Antigenen. Zudem ist eine weitere Erforschung der Tumor-Mikroumgebung nötig, um durch ein besseres Verständnis der immunregulatorischen Mechanismen die Effektivität der Immuntherapie zu verbessern. (Zhu et al., 2023)

Die vorliegende Arbeit soll hierzu einen Beitrag leisten, indem sie die Möglichkeit einer verbesserten Risikostratifizierung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas mittels immunhistochemischer Marker bereits bei Diagnosestellung mittels endosonographischer Feinnadelaspirate untersucht. Der Schwerpunkt liegt hierbei insbesondere auf der Darstellung tumorassoziiertes Makrophagen sowie regulatorischer T-Zellen.

2 DIE ENDOSONOGRAPHISCHE FEINNADELASPIRATION

Die Feinnadelpunktion (FNP) ist eine minimal-invasive Diagnosemethode, die in den Händen geübter Untersucher eine hohe Trefferquote und diagnostische Sensitivität garantiert. Hierbei können in Kombination mit modernen endoskopischen und bildgebenden Verfahren nicht-tastbare, sehr kleine, topographisch komplexe oder in Körperhöhlen gelegene Läsionen zuverlässig abgeklärt werden.

Bei der endosonographisch unterstützten Feinnadelaspiration (EUS-FNA) werden intraabdominell gelegene Läsionen mittels eines über den Magen-Darm-Trakt vorgeschobenen Echoendoskops dargestellt und dann unter ständiger Ultraschallkontrolle über den im Echoendoskop gelegenen Arbeitskanal fächerförmig biopsiert. Bei den hier untersuchten Fällen wurden G19 (1,1 mm) und G22 (0,7 mm) Nadeln verwendet.

Als Aufarbeitungsmethoden des gewonnenen Materials kommen neben der weitverbreiteten Feuchtfixation von handgefertigten Ausstrichpräparaten auch die flüssigkeitsbasierte Zellasservierung mit (halb-)automatisierter Dünnschichttechnik (Zytozentrifuge, ThinPrep®) sowie die Anfertigung von Zellblockmaterial in Frage.

Die flüssigkeitsbasierten Verfahren haben den Vorteil einer einfachen Materialasservierung durch den Punktierenden sowie Materialtrennung bei multiplen Punktionen und bieten optimales Material für Zusatzanalysen sowie die Möglichkeit einer Archivierung von zusätzlichem Zellmaterial. Zudem besteht hier auch die Möglichkeit einer Beurteilung von sehr blutreichen Aspiraten und es treten keine Ausstrichartefakte auf. Nachteile dieser Methoden sind Schrumpfungartefakte und Haufenbildung der Zellen, eine „Sprengung“ von Zellverbänden und der Verlust von nicht-epithelialen Zellen und Hintergrundmaterial. (Spieler et al., 2007)

Die Lufttrocknung hat Nachteile für Diagnostik und Immunzytochemie, bietet allerdings den Vorteil einer möglichen On-Site-Evaluation durch einen Zytopathologen. Neue Studien zeigen allerdings, dass eine On-Site-Evaluation („rapid on-site evaluation“, ROSE) von Material gewonnen mit einer „klassischen“ Aspirationsnadel (FNA) mittels endosonographisch gestützter Feinnadelaspiration (EUS-FNA) keinen Vorteil gegenüber einer endosonographischen Feinnadelbiopsie (EUS-FNB) mit speziell für diesen Zweck entwickelten Biopsienadeln zeigt. (De Lusong and Pajes, 2023)

Mögliche Komplikationen im Rahmen einer EUS-FNA sind abhängig von der Lokalisation des zu punktierenden Organs. Die endosonographisch gestützte Feinnadelaspiration von Läsionen des Pankreas ist eine sichere Methode der Probengewinnung mit einer niedrigen Komplikationsrate von 0-13%. Als häufigste Komplikation trat in <1% eine akute Pankreatitis auf. Weitere mögliche Komplikationen beinhalten Infektionen, Blutungen, Organperforationen, Stichkanalmetastasen, Schmerzen und Komplikationen im Rahmen der notwendigen Sedierung/Anästhesie. (Weston and Coronel, 2022)

3 FRAGESTELLUNGEN

In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob eine Risikostratifizierung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas mittels immunhistochemischer Marker am endosonographischen Feinnadelaspirat (EUS-FNA) möglich ist.

Folgende Fragestellungen werden untersucht:

- Lassen sich die in der Literatur beschriebenen, an Resektaten erhobenen Befunde bezüglich immunologischer Expression im duktales Adenokarzinom des Pankreas an endosonographischen Feinnadelaspiraten (EUS-FNA) zuverlässig reproduzieren?
- Besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression der hier untersuchten immunhistochemischen Marker (CD68 (PG-M1), CD163 (MRQ-26), FOXP3 (EP340), CTLA-4 (F-8)) und der Überlebenszeit der Patienten?
- Ist eine Aussage zur Prognose eines Patienten unter Auswertung der oben genannten Parameter am endosonographischen Feinnadelaspirat (EUS-FNA) möglich?

4 MATERIAL UND METHODEN

Die vorliegende Untersuchung wurde retrospektiv an Patienten aus den Jahren 2015-2019 durchgeführt, bei denen die Diagnosesicherung eines Pankreaskarzinoms mittels endosonographischer Feinnadelaspiration (EUS-FNA) durchgeführt wurde. Alle Punktionen wurden im Pankreaskarzinomzentrum der Klinik für Allgemeine Innere Medizin und Gastroenterologie, Evangelisches Krankenhaus Mülheim an der Ruhr, von erfahrenen Untersuchern durchgeführt.

4.1 Aufarbeitung der Proben

Es wurden zwei unterschiedliche Aufarbeitungsmethoden des Punktatmaterials angewendet: Bis Mai 2017 erfolgte die Aufarbeitung der flüssigen Punktatbestandteile als Zytozentrifugat und hiervon gesondert die Aufarbeitung im Probengefäß enthaltener fester Bestandteile als Paraffinblockmaterial.

Ab Mai 2017 erfolgte sowohl die Aufarbeitung der flüssigen als auch der festen Bestandteile in einem gemeinsamen Zellblockpräparat.

Die initiale Asservierung der Gewebeproben erfolgte jeweils, unabhängig von der folgenden Aufarbeitung, in CytoRichRed[®]. CytoRichRed[®] ist ein hämolytisches Allzweck-Asservationsmedium der Firma ThermoScientific und setzt sich aus Alkohol-, Glykol- und Aldehyverbindungen zusammen.

Tabelle 1: Übersicht der Zusammensetzung des Asservationsmediums CytoRichRed

Inhaltsstoffe	Gewichtsanteile (%)
Isopropylalkohol	25
Methylalkohol	10
Ethylenglykol	8
Formaldehyd	0,5
Wasser	57

4.1.1 Aufarbeitung der flüssigen Bestandteile

Bis Mai 2017 wurden aus den übersandten Probengefäßen zunächst die festen Gewebsbestandteile extrahiert und separat aufgearbeitet (siehe 4.1.2 Solide Bestandteile).

Zur Anfertigung von Zytozentrifugaten wurde das flüssige Transportmedium der verschiedenen Nadelpassagen einer Lokalisation kombiniert und in Zentrifugenröhrchen überführt. Das Material wurde mit der Zentrifuge der Firma Hettich Rotofix 32A für 10 Minuten bei 2200 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde in das Original-Probengefäß zurückgeführt und für mögliche weitere Untersuchungen zwei Wochen lang im Kühlschrank asserviert. Der Zellabsatz wurde mit 1 mL CytoRichRed[®] aufgeschüttelt und für mindestens 20 Minuten stehen gelassen. Bei blutigem Material werden zur verstärkten Erythrolyse 2 mL CytoRichRed[®] zugesetzt.

Das Sediment wurde anschließend mit einer Pasteurpipette suspendiert, um stark anhaftende Zellen vom Zentrifugenröhrchen zu lösen. Bei blutigem oder trübem Zellabsatz wurde das Material vor Verbringen in die Zytokammer zusätzlich mit CytoRichRed[®] verdünnt, um transparente Zellbilder und einzelne Zelllagen ohne Überlappung der Zellen zu erzielen und eine Überlagerung des mikroskopischen Bildes durch Erythrozyten zu vermeiden.

Die Zytokammern wurden mit 4 Tropfen des vorbereiteten Probenmaterials befüllt und bei 600 rpm für 7 Minuten zentrifugiert (CytoSpin 4 der Firma ThermoShandon). Von trüben Proben wurden aufgrund der höheren Zelldichte nur 2 Tropfen verwendet. Nach der Zentrifugation wurde der Objektträger mit dem nun aufgebrauchten Zellbutton luftgetrocknet und vor dem Färben mindestens 10 Minuten in 100% Alkohol überführt. Die Zytozentrifugenpräparate können dann gefärbt werden.

Flüssiges Untersuchungsgut kann ferner als Zellblock aufgearbeitet werden. Zellblockpräparate bieten den Vorteil, dass Einzelzellen in verschiedenen Schnittebenen begutachtet werden können. Zudem erlauben sie eine immunhistochemische Untersuchung der Probe

Die ersten Schritte zur Herstellung eines Zellblocks sind analog zu der Aufarbeitung liquider Bestandteile. Zunächst wird Probenmaterial abzentrifugiert und der Überstand zurück ins Gefäß verbracht. Anschließend werden dem Zellsediment zwei Reagenzien zugefügt, Plasma und Thrombin. Durch das Plasma wird der Suspension Fibrinogen hinzugefügt. Danach wird das Thrombin hinzugegeben und das Gemisch erneut aufgeschüttelt. Das Thrombin ist dafür verantwortlich, dass sich das im Plasma befindliche

Fibrinogen in Fibrin spaltet. Das entstandene Fibrin lagert sich anschließend zu Fibrin-Polymeren zusammen und bewirkt durch den „Crosslinked“-Mechanismus, dass die Zellen aneinanderhaften und sich somit ein Koagel bildet. Das so entstandene Koagel wird in eine Einbettkassette gegeben und analog zu solidem Gewebe als Formalin-fixiertes, paraffin-eingebettetes Material (FFPE) aufgearbeitet. Die FFPE-Proben werden gemäß den gesetzlichen Vorgaben mindestens 10 Jahre asserviert. Das hier untersuchte Material war maximal 9 Jahre und minimal 5 Jahre gelagert.

4.1.2 Solide Bestandteile

Häufig befinden sich in einer eingesandten zytologischen Probe auch solide Bestandteile (z.B. Gewebepartikel wie die im Rahmen der EUS-FNA gewonnenen Stanzzyylinder (sog. Mini-Histologie.).

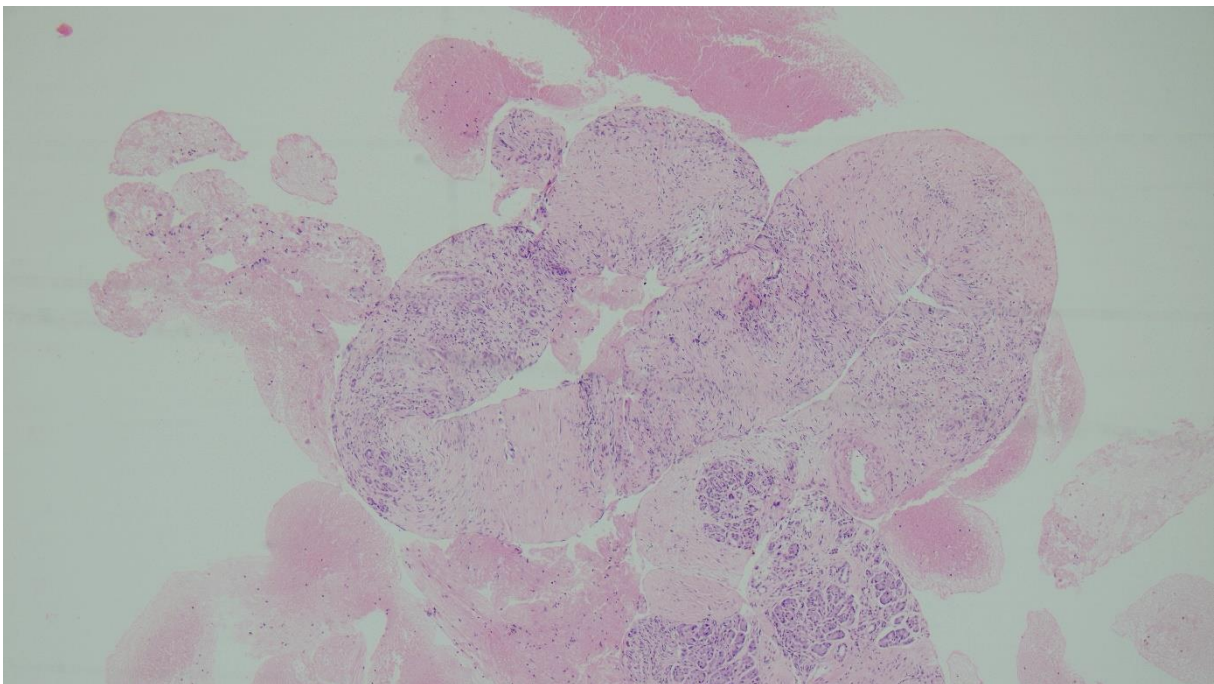


Abbildung 1: Sog. "Mini-Histologie" (EUS-FNA aus einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas, HE, 5x)

Die festen Bestandteile in dem Probenmaterial werden direkt in eine Einbettkapsel überführt und anschließend fixiert. Im Falle der soliden Bestandteile sowie der aus den flüssigen Gewebsbestandteilen angefertigten Zellblöcke sind die weiteren Aufarbeitungsschritte analog zu denen einer histologischen Aufarbeitung von primär Formalin-fixierten Gewebeproben.

Hierbei erfolgt zunächst die Entwässerung des Gewebes mittels aufsteigender Alkoholreihe und die anschließende Durchtränkung der Gewebeproben mit Paraffin.vollautomatisiert in Einbettautomaten (Tissue-Tek® VIP® von Sakura Finetek Europe). Anschließend wird das Material als Paraffinblock ausgegossen, geschnitten und gefärbt. Im vorliegenden Material wurden jeweils Hämatoxylin-Eosin (HE) -und Periodic-acid-Schiffs-Reaction (PAS)-Färbungen angefertigt

Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten ausschließlich an FFPE-Material.

4.2 Patientendaten

Die Patientendaten und Befunde wurde aus Patientenakten in Papier- und elektronischer Form zusammengestellt.

Es wurden zunächst die Befunde aller im Zeitraum von 2015 bis 2019 im Pankreaskarzinomzentrum untersuchten Patienten gesichtet. Aus diesem Kollektiv wurden die Patienten selektiert, bei denen im genannten Zeitraum die Diagnose eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas anhand des durch EUS-FNA gewonnenen Probenmaterials gestellt werden konnte.

Aus den dazugehörigen Patientenakten, den endosonographischen Befunden sowie den Unterlagen der behandelnden onkologischen Praxis wurden relevante klinische Daten (Zeitpunkt der Erstdiagnose, TNM-Tumorstadium bei Diagnosestellung, Therapieverlauf, Sterbedaten) entnommen (s. Kapitel 5).

Asserviertes Paraffinblockmaterial sowie die zugehörigen zytologischen/histologischen Präparate dieser Patienten wurde gesichtet, nach Qualität und Gewebemenge selektiert und die dazugehörigen Zellblockpräparate der immunhistochemischen Untersuchung mit den Antikörpern gegen CD68, CD163, CTLA-4 sowie FOXP3 zugeführt. Bei Patienten, bei denen nach Diagnosestellung am EUS-FNA-Material eine weitere chirurgische Therapie (z.B. Pankreasresektion, Metastasektomie) erfolgt war, erfolgte die Sichtung und Selektion der Schnitte des Operationsmaterials sowie die immunhistochemische Untersuchung analog zum EUS-FNA-Material.

Zellblockpräparate mit weniger als 100 Tumorzellen auf dem relevanten Schnittpräparat wurden von der Auswertung ausgenommen.

4.2.1 Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der Antikörper erfolgte unter dem Lichtmikroskop durch die Autorin anhand eines semiquantitativen Vier-Stufen-Systems (Score 0-3), abhängig vom Prozentsatz gefärbter Immunzellen an der Gesamtzellzahl.

Tabelle 2: Score zur Auswertung der Immunhistochemie

Score	0	1	2	3
% positiver Immunzellen	Negativ	<10%	10-30%	>30%

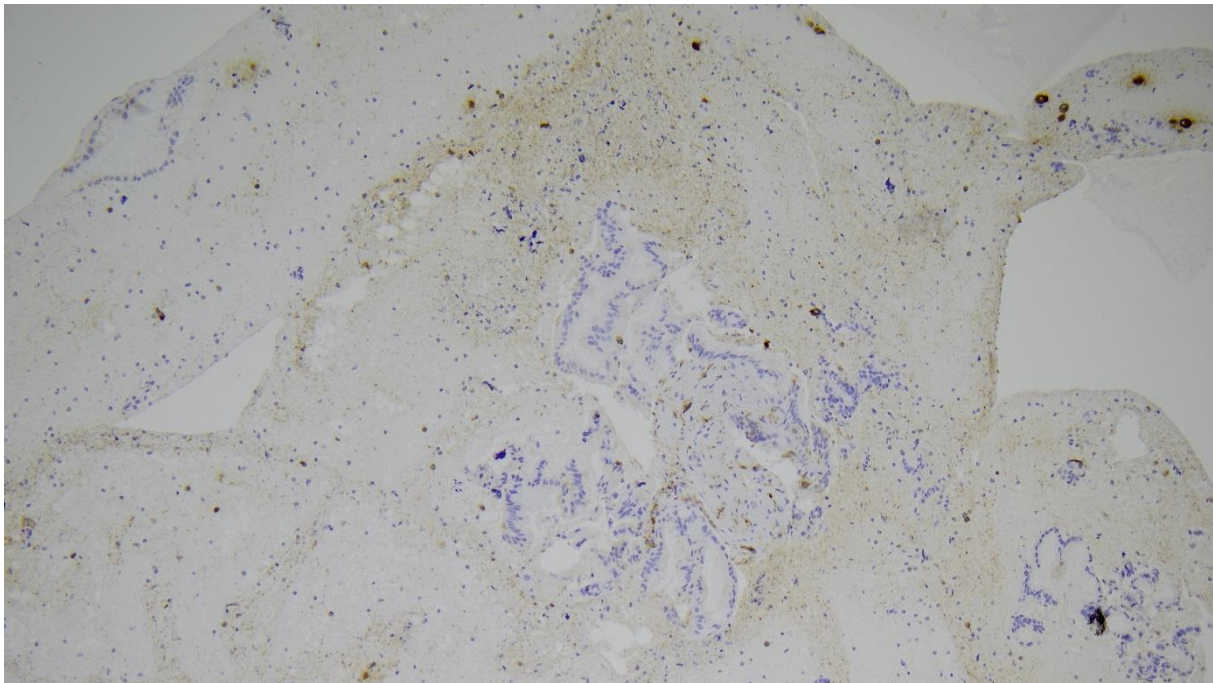


Abbildung 2: Beispielhafte Auswertung Immunhistochemie: Score 1(Anti-CD68, 10x)

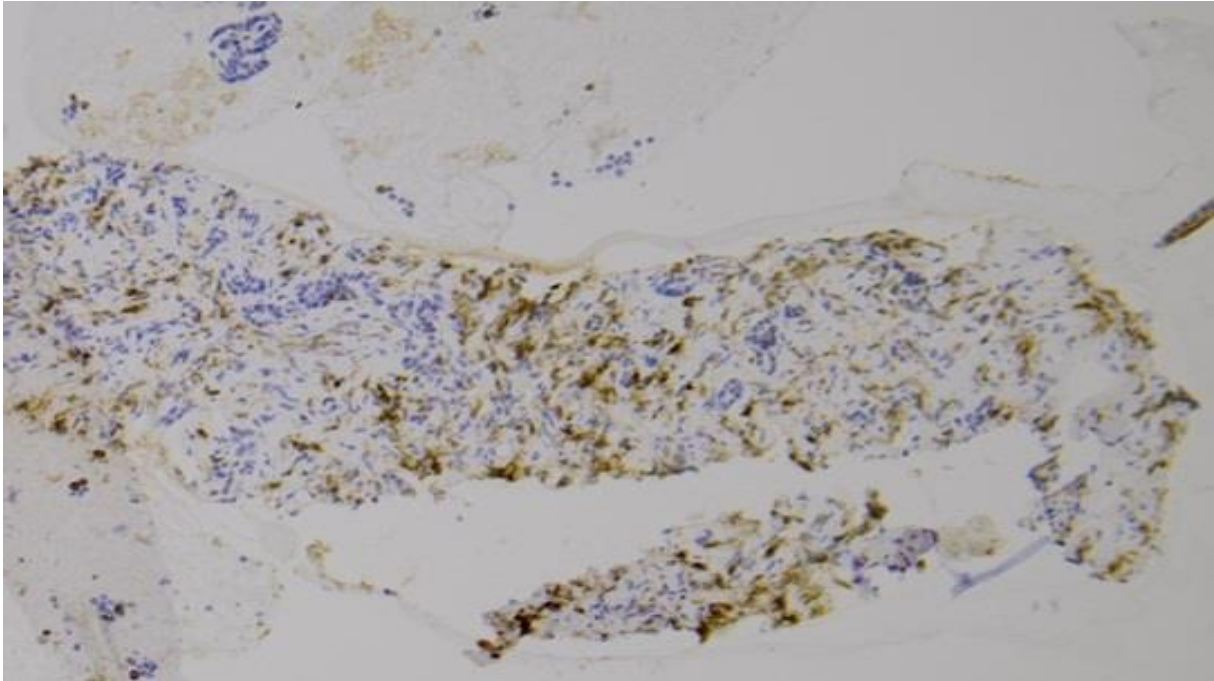


Abbildung 3: Beispielhafte Auswertung Immunhistochemie: Score 2 (Anti-CD68, 10x)

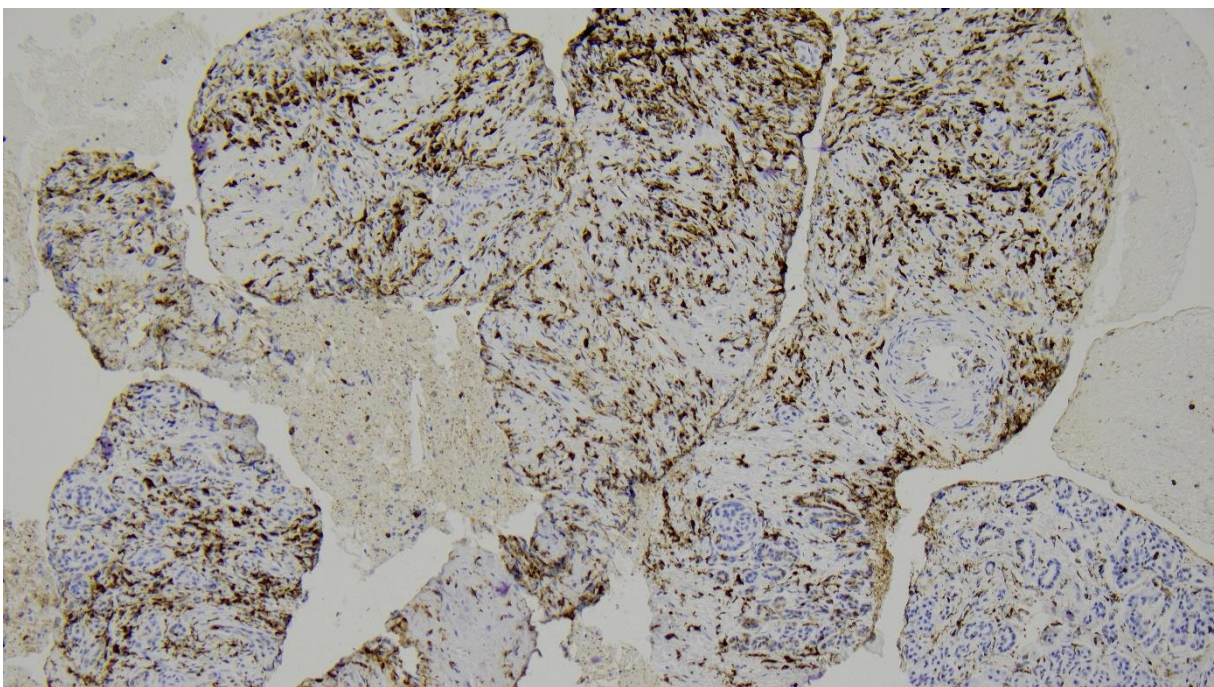


Abbildung 4: Beispielhafte Auswertung Immunhistochemie: Score 3 (Anti-CD68, 10x)

4.2.2 Statistische Analyse

Berechnet wurden Überlebenszeitanalysen mittels COX-Regressionsanalyse. Zur besseren graphischen Darstellbarkeit wurde aus den hierbei erhobenen Ergebnissen ein Forest-Plot erstellt.

Die erhobenen Daten wurden mittels IBM SPSS Statistics 29.0.0.0 und Microsoft® Excel® für Microsoft 365 MSO (Version 2310 Build 16.0.16924.20054) 64 Bit errechnet.

4.3 Antikörper

4.3.1 CD163 (MRQ-26)

CD163 (MRQ-26; Fa. Cell Marque) ist ein monoklonaler primärer Maus-Antikörper zum Laborgebrauch zur Erkennung des Proteins CD163 an formalinfixiertem, Paraffin-eingebetteten Gewebe.

CD163, auch bekannt als cysteinreiches Scavenger-Rezeptor-Typ-1-Protein M130, ist ein akutes, phasenreguliertes und signalinduzierendes Transmembranprotein, das ausschließlich auf Zellen monozytischer Herkunft vorkommt. (Buechler et al., 2000)

CD163 spielt eine entscheidende Rolle bei der Makrophagen-Clearance und der Endozytose von Hämoglobin-/Haptoglobin-Komplexen. (Kristiansen et al., 2001)

CD163 trägt daher zur entzündungshemmenden Reaktion bei und schützt Gewebe vor oxidativem und entzündlichen Hämoglobin. (Etzerodt and Moestrup, 2013)

Anti-CD163 markiert Zellen der monozytischen Makrophagen-Linie (M2-Makrophagen). (Backe et al., 1991)

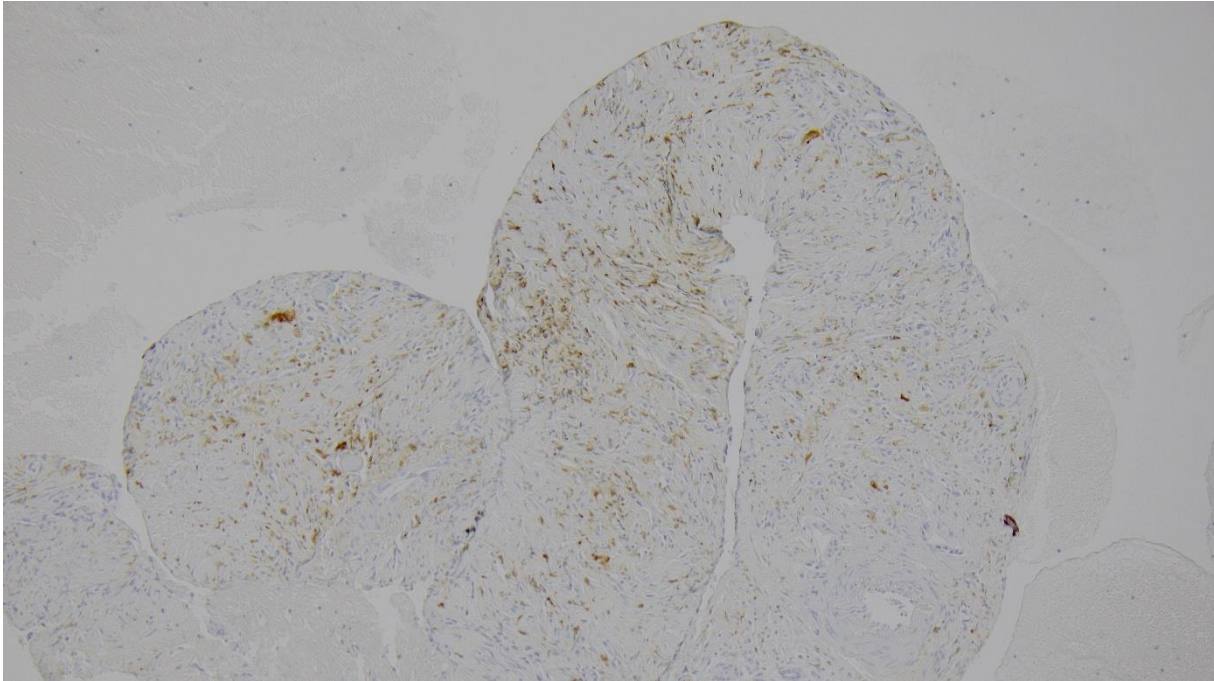


Abbildung 5: Färbung mit Anti-CD163 Antikörper mit Markierung von M2-Makrophagen (EUS-FNA Pankreas, 10x)

4.3.2 CD68 (PG-M1)

CD68 (PG-M1; Fa. DAKO) ist ein monoklonaler Maus-Antikörper zur Verwendung in der Immunhistochemie, er markiert M1-Makrophagen.

CD68 ist ein hochglykolisiertes Membranprotein, es zählt zur Familie der Lysosomal-/Glykoprotein-/Plasmamembran-Shuttleproteine die bei der Endozytose und/oder beim lysosomalen Trafficking eine Rolle spielen. CD68 wird in zytoplasmatischen Granula stark und auf der Oberfläche von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, Basophilen und NK-Zellen schwach exprimiert. CD68 tritt auch im Zytoplasma nicht-hämatologischer Gewebe auf. (Goyert, 1996)

Das CD68-Molekül-Antigen ist sehr heterogen. Im Gegensatz zu anderen CD68-Antikörpern weist der hier vorliegende PG-M1-Antikörper ein fixiermittelresistentes Epitop auf der Makrophagen-beschränkten Form des CD68-Antigens auf. (Falini et al., 1993)

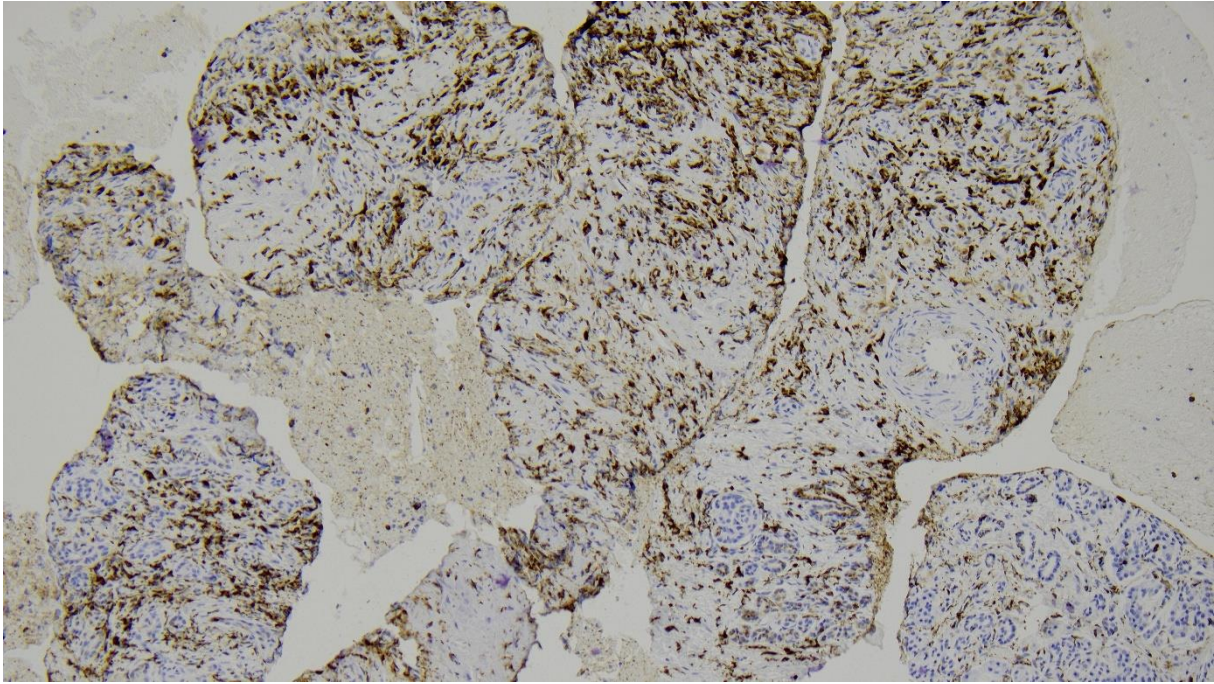


Abbildung 6: Färbung mit Anti-CD68 Antikörper mit Markierung von M1-Makrophagen (EUS-FNA Pankreas, 10x)

4.3.3 FOXP3 (EP340)

FOXP3 (EP340; Fa. DCS Innovative Diagnostik-Systeme) ist ein Mitglied der Forkhead Box (FOX)-Transkriptionsfaktoren, von denen festgestellt wurde, dass sie die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen (Treg) regulieren. Treg sind als immunsuppressive Zellen definiert, die die lokale Unterdrückung der Antitumorimmunität vermitteln und auch die Funktion von dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und B-Zellen hemmen können. Intratumorale FOXP3-positive Zellen sind laut Literatur mit einem höheren Rezidivrisiko und einem schlechteren Gesamtüberleben verbunden. (Hinz et al., 2007; Kim et al., 2013)

FOXP3 (EP340) ist ein Kaninchen-Antikörper gegen rekombinantes humanes FOXP3 von DCS innovative Diagnostik-Systeme.

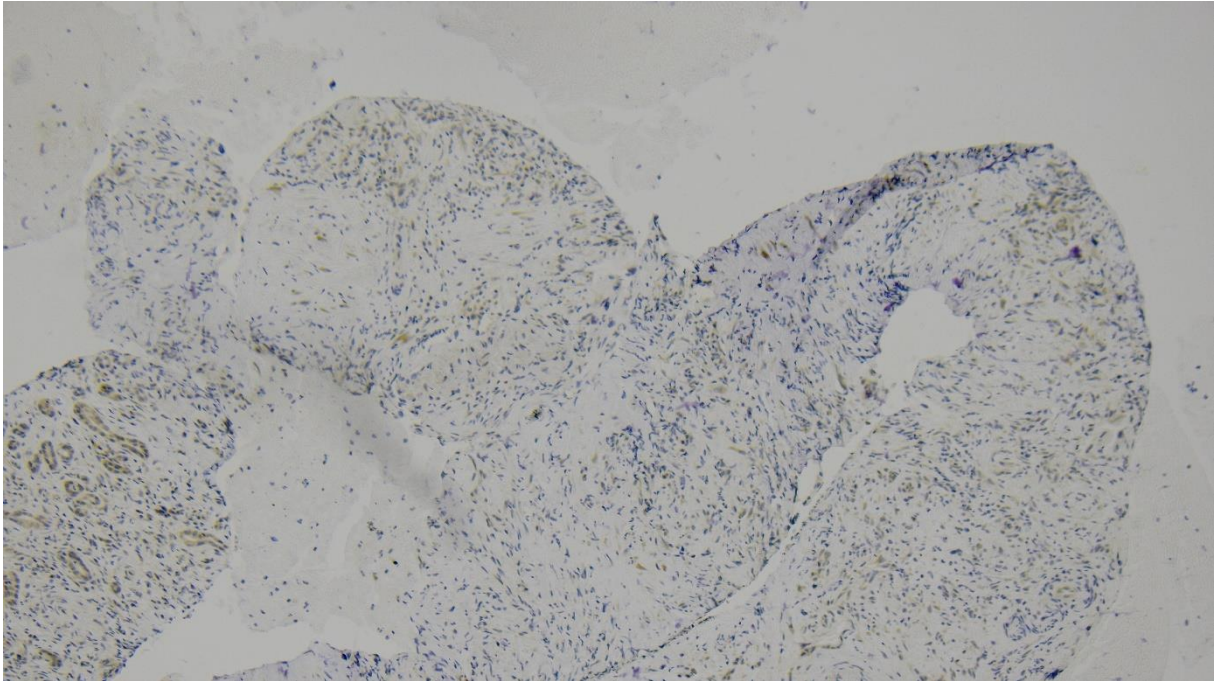


Abbildung 7: Färbung mit Anti-FOXP3 Antikörper mit Markierung von regulatorischen T-Zellen (EUS-FNA Pankreas, 10x)

4.3.4 CTLA-4 (F-8)

CTLA-4 (F-8; Fa. Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, spezifisch gegen den C-terminus von menschlichem CTLA-4.

CTLA-4 spielt eine Rolle in der Suppressor-Funktion von regulatorischen T-Zellen (Treg). (Tai et al., 2012)

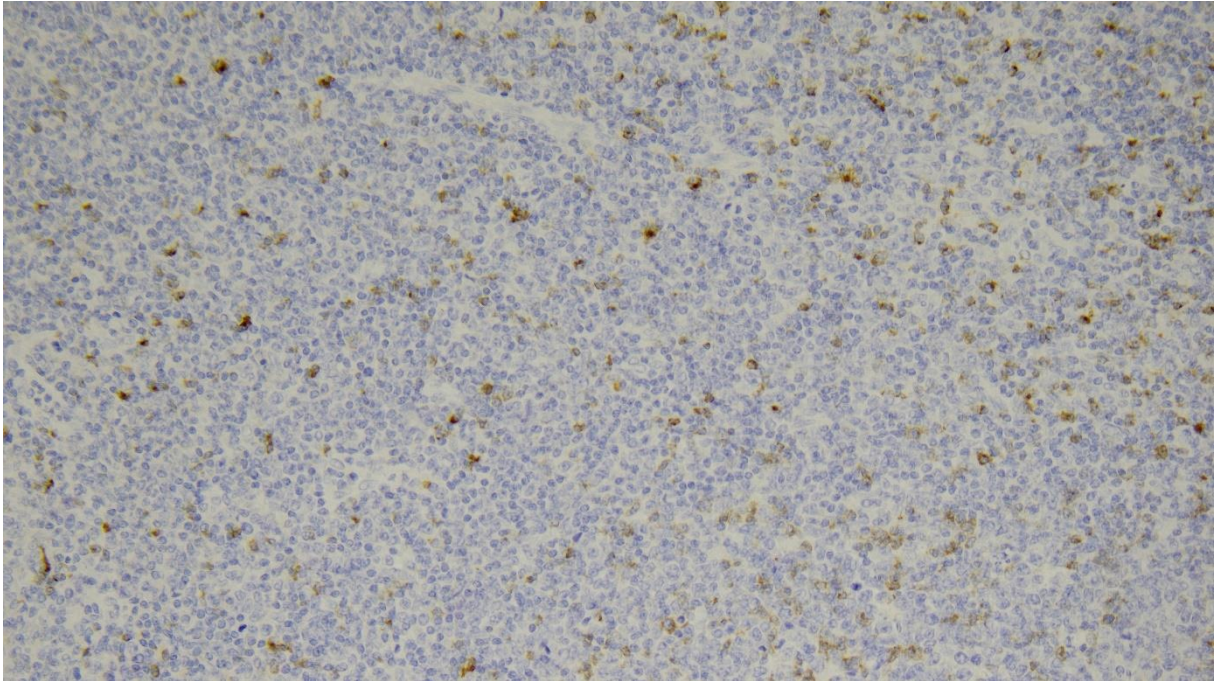


Abbildung 8: Färbung mit Anti-CTLA4 Antikörper mit Markierung von regulatorischen T-Zellen (Lymphknoten, 20x)

1

¹ Kapitel 4.1 in Anlehnung an P. Gabrys: Endosonographic fine-needle aspiration in combination with simplified treatment in order to investigate the sensitivity of the method regarding the detection of pancreas and liver tumors (2016)

5 ERGEBNISSE

Es wurden insgesamt 58 Patienten (33 männlich, 25 weiblich; Durchschnittsalter 72 Jahre, min. 45 Jahre, max. 88 Jahre) untersucht, bei denen die Diagnose eines duktales Adenokarzinom des Pankreas mittels durch EUS-FNA gewonnenen Gewebeprobe gestellt wurde.

Bei 51 Patienten lagen Daten zum Sterbezeitpunkt vor, das Gesamtüberleben betrug hier im Mittel 299 Tage (min. 12 Tage, max. 1802 Tage).

Bei 55 Patienten lagen Angaben zu einem Progress vor, die Zeit bis zum ersten Progress nach Diagnosestellung betrug hier im Mittel 227 Tage.

Tabelle 3: Übersicht Patientenkollektiv

Patientenzahl (M:F)	58 (33:25)
Alter, Jahre (Mittelwert)	45-88 (72)
Überleben, Tage (Mittelwert)	12-1802 (299)

5.1 Tumorstadium bei Diagnose

Das Tumorstadium wurde anhand der zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erhobenen endosonographischen und bildgebenden Untersuchungen erhoben.

Hierzu wurde bei den Fällen von 2015-2017 die TNM-Klassifikation der 7. Ausgabe der AJCC und bei den Fällen ab 2017 die aktuell gültige TNM-Klassifikation der 8. Ausgabe der AJCC verwendet (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleich TNM-Klassifikation AJCC 7 und AJCC 8

Kategorie	7te Ausgabe AJCC	8te Ausgabe AJCC
T1	Tumor auf das Pankreas begrenzt, maximaler Tumordurchmesser ≤ 2 cm	Maximaler Tumordurchmesser ≤ 2 cm
T1a		<0,5 cm
T1b		0,5-1 cm
T1c		1-2 cm
T2	Tumor auf das Pankreas begrenzt, maximaler Tumordurchmesser ≥ 2 cm	Maximaler Tumordurchmesser > 2 cm und ≤ 4 cm
T3	Tumor bereitet sich jenseits des Pankreas aus, ohne Infiltration Truncus coeliacus/A. mesenterica superior	Maximaler Tumordurchmesser > 4 cm
T4	Tumor infiltrierte Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior	Tumor infiltrierte Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior mit Inoperabilität
N1	Regionale Lymphknotenmetastasen	1-3 befallene lokoregionäre Lymphknoten
N2		≥ 4 befallene lokoregionäre Lymphknoten
M1	Fernmetastasen	Fernmetastasen

5.1.1 T-Stadium bei Diagnose

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zeigte sich bei dem überwiegenden Teil der Patienten ein bereits lokal fortgeschrittener bzw. Pankreas-überschreitender Befund analog einem Stadium T2 oder T3 (T2=19 Patienten, T3=28 Patienten).

Bei 8 Patienten bestand bereits ein Stadium T4 und nur zwei Patienten zeigten ein frühes Stadium T1. Auf eine Unterteilung in T1a-c wurde aufgrund der geringen Fallzahl verzichtet. Bei einem Patienten fehlten Angaben zum initialen Tumorstadium.

5.1.2 N-Stadium bei Diagnose

Bei 16 Patienten fehlten Angaben zum Nodalstatus. Bei 6 Patienten bestand bei Diagnosestellung ein Stadium N0, während der überwiegende Teil der Patienten (36 Patienten) bei Diagnosestellung bereits einen nodal metastasierten Befund aufwiesen

5.1.3 M-Stadium bei Diagnose

Etwas mehr als die Hälfte der Patienten (30 Patienten) wiesen bei Diagnosestellung bereits Fernmetastasen gemäß einem Stadium M1 auf. Bei 28 Patienten lag initial ein nicht-fernmastasierter Befund vor.

Tabelle 5 Übersicht TNM-Stadium nach AJCC 7/8 bei Diagnose

T-Stadium		
	Keine Angabe	1
	1	2
	2	19
	3	28
	4	8
N-Stadium		
	Keine Angabe	16
	0	6
	1/2	36
M-Stadium		
	Keine Angabe	0
	0	28
	1	30

5.1.4 Expressions-Gruppen

Es wurde zunächst die Expression der verschiedenen immunhistochemischen Antikörper an dem vorliegenden Probenmaterial untersucht. Die Auswertung der Antikörper erfolgte anhand eines Vier-Stufen-Systems (Score 0-3), abhängig vom Prozentsatz gefärbter Immunzellen an der Gesamtzellzahl.

5.1.5 CD163

Mit dem Antikörper gegen CD163 konnte bei 55 von 58 Patienten eine auswertbare Färbung erreicht werden. In 3 von 58 Fällen war eine immunhistochemische Untersuchung der Probe nicht mehr möglich, da das Tumormaterial bereits im Rahmen der ursprünglichen Diagnostik aufgebraucht worden war.

Tabelle 6: Auswertung Score für Antikörper gegen CD163

Antikörper gegen CD163				
	Prozent	Gruppe	Häufigkeit	Prozent
Gültig	negativ	0	5	8,6
	<10%	1	37	63,8
	10%-30%	2	12	20,7
	>30%	3	1	1,7
	Gesamt		55	94,8
Fehlend			3	5,2
Gesamt			58	100,0

5.1.6 CD68

Mit dem Antikörper gegen CD68 konnte bei 55 von 58 Patienten eine auswertbare Färbung erreicht werden. In 3 von 58 Fällen war eine immunhistochemische Untersuchung der Probe nicht mehr möglich, da das Tumormaterial bereits im Rahmen der ursprünglichen Diagnostik aufgebraucht worden war.

Tabelle 7: Auswertung Score für Antikörper gegen CD68

Antikörper gegen CD68				
	Prozent	Gruppe	Häufigkeit	Prozent
Gültig	negativ	0	1	1,7
	<10%	1	17	29,3
	10%-30%	2	21	36,2
	>30%	3	16	27,6
	Gesamt		55	94,8
Fehlend			3	5,2
Gesamt			58	100,0

5.1.7 FOXP3

Mit dem Antikörper gegen FOXP3 konnte bei 54 von 58 Patienten eine auswertbare, teils schwache Färbung erreicht werden. In 4 von 58 Fällen war eine immunhistochemische Untersuchung der Probe nicht mehr möglich, da das Tumormaterial bereits im Rahmen der ursprünglichen Diagnostik aufgebraucht worden war.

Tabelle 8: Auswertung Score für Antikörper gegen FOXP3

Antikörper gegen FOXP3				
	Prozent	Gruppe	Häufigkeit	Prozent
Gültig	negativ	0	51	87,9
	<10%	1	2	3,4
	10%-30%	2	1	1,7
	>30%	3	0	0
	Gesamt		54	93,1
Fehlend			4	6,9
Gesamt			58	100,0

5.1.8 CTLA4

Mit dem Antikörper gegen CTLA4 konnte bei 56 von 58 Patienten eine auswertbare, teils schwache Färbung erreicht werden. In 2 von 58 Fällen war eine immunhistochemische Untersuchung der Probe nicht mehr möglich, da das Tumormaterial bereits im Rahmen der ursprünglichen Diagnostik aufgebraucht worden war.

Tabelle 9: Auswertung Score für Antikörper gegen CTLA4

Antikörper gegen CTLA4				
	Prozent	Gruppe	Häufigkeit	Prozent
Gültig	negativ	0	50	89,3
	<10%	1	6	10,7
	10%-30%	2	0	0
	>30%	3	0	0
	Gesamt		56	96,6
Fehlend			2	3,4
Gesamt			58	100,0

5.2 Zusammenhang zwischen Antikörper-Expression und Überlebenszeit

Die Bestimmung des Überlebenszeit in Zusammenhang mit der Antikörper-Expression erfolgte mittels Cox-Regression. Bei 14 Fällen lagen keine Angaben zum Todeszeitpunkt vor, die Anzahl der untersuchten Fälle betrug n=44.

Zusammenfassend zeigte sich hier für den Antikörper gegen CD68 eine verlängerte Überlebenszeit/niedrigere Hazard Ratio (HR =0,810) bei hoher Antikörper-Expression wohingegen für CD168, CTLA4 und FOXP3 eine hohe Antikörper-Expression mit einer verkürzten Überlebenszeit/höhere Hazard Ratio einherging (HR jeweils > 1). Die Ergebnisse waren jedoch für alle untersuchten Antikörper nicht statistisch signifikant (p-Wert > 0,05).

Tabelle 10: Übersicht Hazard Ratio/Signifikanz aller untersuchten Antikörper

	Signifikanz	Hazard Ratio	95,0% Konfidenzintervall für Hazard Ratio	
			Untere	Obere
CD68	0,286	0,810	,549	1,194
CD163	0,385	1,392	,661	2,932
FOXP3	0,705	1,138	,583	2,222
CTLA4	0,185	1,970	,722	5,374

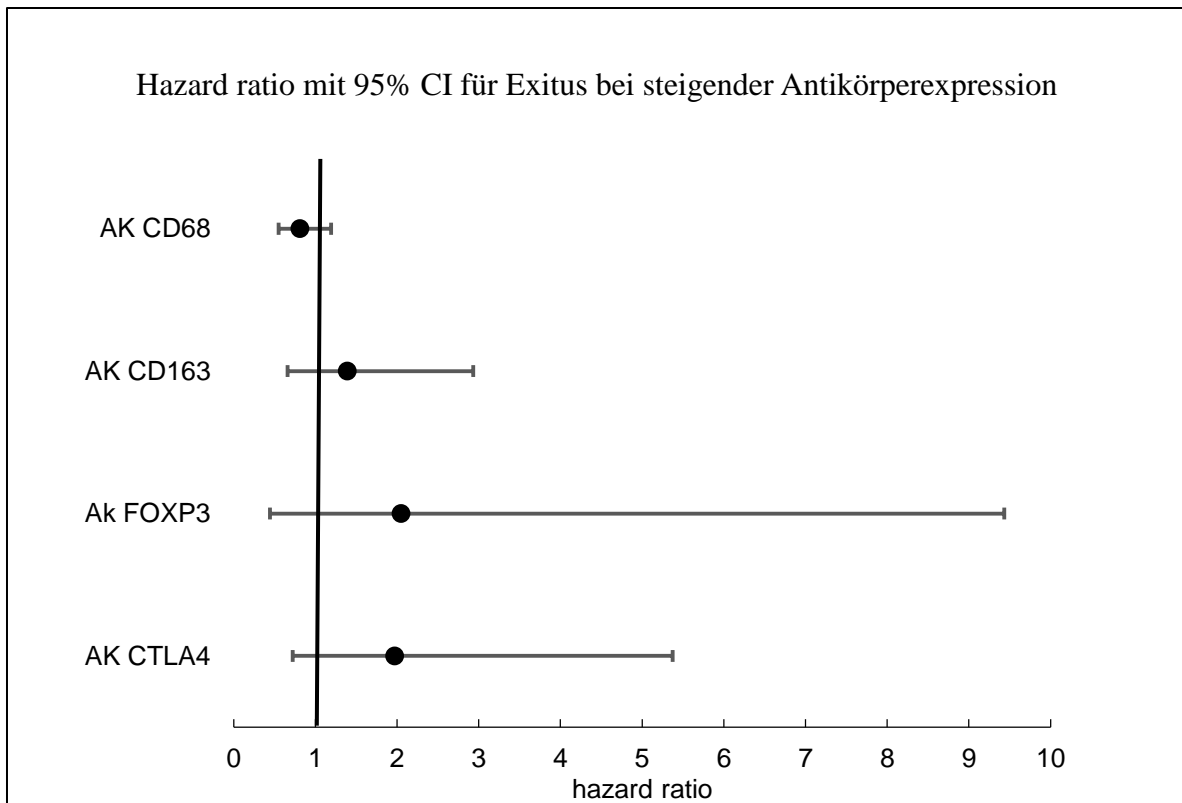


Abbildung 9: Darstellung der Hazard Ratio mit 95% CI für Exitus bei steigender Antikörperexpression mittels Forest Plot

6 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Risikostratifizierung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas anhand immunhistochemischer Marker an endosonographischen Feinnadelaspiraten (EUS-FNA).

In den hier vorliegenden Untersuchungen am endosonographisch gewonnenen Feinnadelmaterial ließ sich eine Assoziation der Überlebenszeiten mit den Makrophagenpopulationen darlegen. So war ein höherer Gehalt an CD68-positiven M1-Makrophagen mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert. Bei höherem Gehalt an CD163-positiven M2-Makrophagen sowie von FOXP3- und CTLA4-positiven regulatorischen T-Zellen zeigte sich eine Assoziation mit kürzeren Überlebenszeiten. (Knudsen et al., 2017).

Somit lässt sich analog zu den an Operationspräparaten erhobenen statistisch signifikanten Ergebnissen bezüglich einer Risikostratifizierung anhand des immunologischen Mikromilieus auch am Feinnadelmaterial ein Trend bezüglich Überlebenszeit und Prognose der Patienten erkennen.

Zurzeit wird für alle Patienten mit Pankreaskarzinom, bei entsprechend ausreichendem Allgemeinzustand, eine systemische Therapie empfohlen, entweder als adjuvante Therapie nach erfolgter Resektion oder als palliatives Konzept zur Verbesserung von Überlebenszeit und Lebensqualität. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren kann eine intensivere Chemotherapie eine sekundäre Resektion möglich machen, bei grenzwertig resektablen Tumoren verbessert eine Chemotherapie das Überleben, selbst wenn die Resektabilität nicht beeinflusst wird. Allerdings beträgt zurzeit selbst unter der aktuell wirksamsten Chemotherapie FOLFIRINOX (Oxaliplatin plus Irinotecan plus 5-Fluorouracil) die Überlebenszeit nur etwa 11 Monate. Ein guter Allgemeinzustand ist hierbei Voraussetzung zur Therapie. Eine feste Rolle für die Immuntherapie gibt es noch nicht, bei den zielgerichteten Therapien ließen sich nur für den kleinen Teil der Patienten mit einer Keimbahn-BRCA-Mutation, KRAS-Wildtyp oder KRAS-G12C-Mutation Fortschritte erreichen. Weitere relevante Fortschritte in der Systemtherapie sowie ein besseres Verständnis gegenüber den Resistenzmechanismen gegenüber der klassischen Chemotherapie sind somit dringend erforderlich. (Springfeld et al., 2023).

In Anbetracht dieses immer höheren Stellenwertes von onkologischer Immuntherapie und der schlechten Prognose des duktales Adenokarzinoms des Pankreas erscheint somit die Analyse der untersuchten Antikörper bereits bei der initialen immunhistochemischen Untersuchung sinnvoll, um dem Patienten eine gezieltere Therapie zukommen lassen zu können.

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist ein hochgradig immun-evasiver Tumor mit einer hochgradig immunsuppressiven Tumormikroumgebung. Eine Single-Agent-Therapie mit Immuncheckpointinhibitoren wie sie bereits bei zahlreichen anderen Tumorerkrankungen wie z.B. dem malignen Melanom angewandt wird hat sich bis jetzt für das Pankreaskarzinom dementsprechend erwartungsgemäß nicht als sinnvoll gezeigt. Um eine effektive Tumorthherapie zu ermöglichen sind multimodale Therapiekonzepte von Nöten. Diese sollten zum einen immunsuppressive myeloische Zellen und stromale Elemente innerhalb der Mikroumgebung des Tumors neutralisieren und zum anderen T-Zell-Antigen spezifisch wirken und die Effektor-T-Zell-Funktion verbessern. (Bear et al., 2020)

Die Rolle regulatorischer T-Zellen sowie der Makrophagenpopulation innerhalb der Tumormikroumgebung ist komplex und zum Teil widersprüchlich. Trotz klinischer Korrelation eines hohen Gehaltes an regulatorischen T-Zellen mit einer schlechteren Prognose zeigt auch eine Erschöpfung an T-Zellen eine Akzeleration der Tumorentwicklung in vivo. Während manche Makrophagen-Subtypen zur T-Zell-Exklusion beitragen, verzögern andere die Tumorentwicklung. Gemäß den hier vorliegenden Untersuchungen ist die T-Zell-Regulation bereits im präoperativen Feinnadelaspirat analysierbar und mit der Prognose assoziiert. Dementsprechend könnte die weitere Analyse der Rolle dieser und der vielen verschiedenen Zelltypen innerhalb der Mikroumgebung des Pankreastumors die Möglichkeit für neue Therapieansätze bieten. (Principe et al., 2021)

Aktuell laufen über 40 klinische Studien bezüglich einer möglichen Therapie des Pankreaskarzinoms unter Zuhilfenahme zahlreicher, verschiedener immunmodulatorischer Substanzen wie beispielsweise dem Anti-CTLA4-IgG1-Antikörper Ipilimumab in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika und/oder anderen immunmodulatorischen Substanzen. Die Anzahl an aktiven Studien zu diesem Thema zeigt, wie hoch der Stellenwert einer additiven Immuntherapie bei der Behandlung des duktales Adenokarzinoms eingeschätzt wird.

Insbesondere bei Patienten mit einem als grenzwertig resektabel eingestuften Pankreaskarzinom könnte dies eine hervorgehobene Rolle spielen. Nach aktuellem Stand der Therapie wird hier zunächst eine neoadjuvante Chemotherapie empfohlen. Hierdurch soll eine Reduktion der Tumormasse und die konsekutive chirurgische Resektabilität des Tumors erreicht werden. Ein im Rahmen der diagnostischen und prätherapeutischen immunhistochemischen Untersuchungen bestimmter negativer prädiktiver Wert wie z.B. eine hohe Antikörperexpression von CD163, FOXP3 oder CTLA4, könnte hier gegebenenfalls zu einer früheren, einer intensiveren -oder auch einer durch eine gezielte Immuntherapie oder andere Maßnahmen ergänzten- neoadjuvanten Therapie mit größerer Tumorreduktion und besserer Resektabilität führen.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass eine solche Risikostratifizierung bereits im Rahmen der für die Diagnosestellung notwendigen Materialgewinnung mittels EUS-FNA möglich ist. Durch die genauere Bestimmung des Tumormikromilieus bereits bei der Diagnosestellung ergibt sich die Möglichkeit, bereits initial eine auf die spezielle Tumorbiologie des Patienten zugeschnittene Therapie zu planen und somit durch Optimierung der Therapie ein besseres Überleben zu erreichen. Zudem besteht zur Zeit der Trend auch primär operablen Patienten mit High Risk-Konstellation (z.B. hohes CA19-9, systemische Symptomatik, Lymphknotenbefall) großzügig eine neoadjuvante Therapie zukommen zu lassen (Henault et al., 2024). Eine Untersuchung der hier dargestellten Antikörper zum besseren Verständnis des individuellen Tumormikromilieus und somit des potenziellen biologischen Verhaltens bereits am Feinnadelmaterial im Rahmen der Diagnosestellung erlaubt möglicherweise eine bessere Identifikation der Hochrisikopatienten.

Die hier vorliegende Hazard Ratio signalisiert für diese Vermutung einen Trend, der sich allerdings nicht statistisch darstellen lässt.

Für die fehlende statistische Signifikanz sind mehrere Ursachen zu diskutieren:

so war das Färbeverhalten der zurzeit noch nicht zur Diagnostik zugelassenen Antikörper CTLA4 und FOXP3 schwierig auswertbar und teils schwach. Dies liegt zum einen an der Färbe- Eigenschaft der Antikörper beziehungsweise den zu detektierenden Proteinen (Brown et al., 2019). Zum anderen könnte das Alter einiger Paraffinblöcke zur geringen Reagibilität beigetragen haben: Bekanntlich nimmt die Färbequalität für manche Antikörper mit höherer Lagerdauer des FFPE-Materials ab (Grillo et al., 2017). Da einige der verwendeten

Zellblockpräparate bereits deutlich mehr als 1 Jahr alt waren, könne das zu der schwierigen Auswertbarkeit beigetragen haben.

Im Übrigen war das Material bereits im Rahmen der initialen Aufarbeitung und Diagnosesicherung aufgeschnitten und verbraucht worden, sodass in einigen Fällen für die vorliegenden aktuellen Untersuchungen nur noch spärlich auswertbares Tumorgewebe mit maximal 100 Tumorzellen vorlag,

Ein weiterer wichtiger Faktor ist sicherlich das kleine Patientenkollektiv. Tumoren des Pankreas sind eine seltene Tumorentität, die nur etwa 2-3% aller bösartigen Neubildungen bei Erwachsenen pro Jahr ausmachen (~7-9 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner bei Frauen und 10-12 Neuerkrankungen/100.000 Einwohnern bei Männern pro Jahr). In diese Zahl finden alle neoplastischen Erkrankungen des Pankreas Eingang (duktales Adenokarzinom, muzinöse und neuroendokrine Neoplasien, seltene Entitäten), wobei sich die hier vorliegende Arbeit speziell auf das duktales Adenokarzinom des Pankreas bezieht. Andere Entitäten wurden nicht berücksichtigt. Gemessen an der Inzidenz ist die hier vorliegende Fallzahl mit n=58 als hoch einzuschätzen.

Die vorliegenden wegweisenden Ergebnisse sollten zum einen durch Untersuchungen an höheren Fallzahlen z.B. im Rahmen einer multizentrischen Studie untermauert werden. Außerdem sollten die Studien auf eine Korrelation zum histopathologischen Befund des Resektates ausgeweitet werden, um die aufgezeigten Trends möglicherweise statistisch signifikant zu bestätigen.

7 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist auch unter aktuellen chemotherapeutischen Protokollen nur mit einer mittleren Überlebenszeit von wenigen Monaten assoziiert. Eine vielversprechende Therapieoption in der Behandlung solider maligner Neoplasien ist die Immuntherapie, wobei sich ein klinischer Benefit für eine single-agent-Immuntherapie für das PDAC bislang nicht nachweisen ließ. Mögliche Gründe für das schlechte Ansprechen könnten die komplexen immunsuppressiven Mechanismen innerhalb des Tumors sein, die durch die Tumormikroumgebung beeinflusst werden. Studien an Operationspräparaten haben gezeigt, dass speziell Tumor-assoziierte cluster of differentiation 68 (CD68) - positive M1-Makrophagen, cluster of differentiation 163 (CD163) -positive M2-Makrophagen und Forkhead-Box-Protein P3 (FOXP3) - sowie cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) -positive regulatorische T-Zellen (Treg) eine prognostische Relevanz haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob eine Risikostratifizierung des PDAC mittels immunhistochemischer Untersuchung mit Antikörpern gegen CD68, CD163, FOXP3, CTLA4 bereits an durch endosonographische Feinnadelaspiration (EUS-FNA) gewonnenem Zellmaterial möglich ist. Dies würde erlauben, bereits bei Diagnosestellung prätherapeutisch/präoperativ genauere Aussagen zur Prognose zu treffen bzw. eine zielgerichtete Immuntherapie ohne die Notwendigkeit zu einer weiteren, möglicherweise invasiven Probengewinnung zu treffen. Hierbei zeigte sich, vergleichbar mit den in der Literatur anhand von Operationspräparaten erhobenen Ergebnissen, für den Antikörper gegen CD68 eine verlängerte Überlebenszeit/niedrigere Hazard Ratio bei hoher Antikörperexpression. Für CD163, FOXP3 und CTLA4 ging eine hohe Antikörperexpression mit einer verkürzten Überlebenszeit/höheren Hazard Ratio einher. Bei geringer Fallzahl (n=58) und aufgrund des limitierten Materials konnten bei den Analysen keine signifikanten Ergebnisse nachgewiesen werden (p-Wert > 0,05).

Angesichts der doch ermutigenden Hazard Ratio, die die vorliegende Arbeit nachweist und insbesondere in Anbetracht des immer höheren Stellenwertes von personalisierten Immuntherapien bei Tumorerkrankungen und der nach wie vor schlechten Prognose des PDAC erscheinen weitere Untersuchungen zu diesem Themenkomplex mit höheren Fallzahlen sinnvoll, um so dem Patienten möglicherweise eine verbesserte bzw. gezieltere Therapie zukommen lassen zu können.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is still a difficult malignant tumor to treat and is only associated with a survival time of a few months even under current chemotherapy protocols.

A promising therapeutic option in the treatment of solid malignant neoplasms is immunotherapy, although a clinical benefit for single-agent immunotherapy for PDAC has not yet been proven. Reasons could be complex immunosuppressive mechanisms within the tumor, influenced by the tumor microenvironment. Studies on surgical specimens have shown that tumor-associated cluster of differentiation 68 (CD68)-positive M1 macrophages, cluster of differentiation 163 (CD163)-positive M2 macrophages and forkhead-box-protein P3 (FOXP3)- as well as cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4)-positive regulatory T-cells (Treg) have a prognostic relevance.

This work examined whether risk stratification of PDAC using immunohistochemical examination of CD68, CD163, FOXP3 and CTLA4 is already possible with material obtained by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (EUS-FNA). This would allow more precise statements about the prognosis to be made pretherapeutically/preoperatively at the time of diagnosis or to choose a targeted immunotherapy without the need for further, possibly invasive sample collection.

Comparable to the results obtained in the literature using surgical specimens, there was a prolonged survival time/lower hazard ratio with high antibody expression for the antibody against CD68, while high antibody expression was associated with a shortened survival time/higher hazard ratio for CD163, FOXP3 and CTLA4. The results were not significant (p -value > 0.05). Because of the small number of cases ($n=58$) and the limitations of the often-sparse material no significant results could be achieved.

Considering the encouraging Hazard ratio the presented work has shown further studies with higher case numbers seem sensible, especially in view of the increasing importance of personalized immunotherapy in tumor diseases and the still poor prognosis of PDAC to be able to provide the patient with improved or more targeted therapy.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aykut, B., Chen, R., and Miller, G. (2020). Regulatory T Cells Keep Pancreatic Cancer at Bay. *Cancer Discov* 10, 345-347.
2. Backe, E., Schwarting, R., Gerdes, J., Ernst, M., and Stein, H. (1991). Ber-MAC3: new monoclonal antibody that defines human monocyte/macrophage differentiation antigen. *J Clin Pathol* 44, 936-945.
3. Baig, M.S., Roy, A., Rajpoot, S., Liu, D., Savai, R., Banerjee, S., Kawada, M., Faisal, S.M., Saluja, R., Saqib, U., Ohishi, T., and Wary, K.K. (2020). Tumor-derived exosomes in the regulation of macrophage polarization. *Inflamm Res* 69, 435-451.
4. Bailey, P., Chang, D.K., Nones, K., Johns, A.L., Patch, A.M., Gingras, M.C., Miller, D.K., Christ, A.N., Bruxner, T.J., Quinn, M.C., Nourse, C., Murtaugh, L.C., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourbakhsh, E., Wani, S., Fink, L., Holmes, O., Chin, V., Anderson, M.J., Kazakoff, S., Leonard, C., Newell, F., Waddell, N., Wood, S., Xu, Q., Wilson, P.J., Cloonan, N., Kassahn, K.S., Taylor, D., Quek, K., Robertson, A., Pantano, L., Mincarelli, L., Sanchez, L.N., Evers, L., Wu, J., Pinese, M., Cowley, M.J., Jones, M.D., Colvin, E.K., Nagrial, A.M., Humphrey, E.S., Chantrell, L.A., Mawson, A., Humphris, J., Chou, A., Pajic, M., Scarlett, C.J., Pinho, A.V., Giry-Laterriere, M., Rooman, I., Samra, J.S., Kench, J.G., Lovell, J.A., Merrett, N.D., Toon, C.W., Epari, K., Nguyen, N.Q., Barbour, A., Zeps, N., Moran-Jones, K., Jamieson, N.B., Graham, J.S., Duthie, F., Oien, K., Hair, J., Grutzmann, R., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C.A., Wolfgang, C.L., Morgan, R.A., Lawlor, R.T., Corbo, V., Bassi, C., Rusev, B., Capelli, P., Salvia, R., Tortora, G., Mukhopadhyay, D., Petersen, G.M., Australian Pancreatic Cancer Genome, I., Munzy, D.M., Fisher, W.E., Karim, S.A., Eshleman, J.R., Hruban, R.H., Pilarsky, C., Morton, J.P., Sansom, O.J., Scarpa, A., Musgrove, E.A., Bailey, U.M., Hofmann, O., Sutherland, R.L., Wheeler, D.A., Gill, A.J., Gibbs, R.A., Pearson, J.V., Waddell, N., Biankin, A.V., and Grimmond, S.M. (2016). Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 531, 47-52.
5. Bear, A.S., Vonderheide, R.H., and O'Hara, M.H. (2020). Challenges and Opportunities for Pancreatic Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell* 38, 788-802.
6. Bhatia, R., Bhyravbhatla, N., Kisling, A., Li, X., Batra, S.K., and Kumar, S. (2022). Cytokines chattering in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol* 86, 499-510.
7. Brown, C., Sekhavati, F., Cardenas, R., Windmueller, C., Dacosta, K., Rodriguez-Canales, J., and Steele, K.E. (2019). CTLA-4 Immunohistochemistry and Quantitative Image Analysis for Profiling of Human Cancers. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 67, 901-918.
8. Buechler, C., Ritter, M., Orso, E., Langmann, T., Klucken, J., and Schmitz, G. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 67, 97-103.

9. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address, a.a.d.h.e., and Cancer Genome Atlas Research, N. (2017). Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 32, 185-203 e113.
10. Collisson, E.A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W.J., Truitt, M., Gu, S., Cooc, J., Weinkle, J., Kim, G.E., Jakkula, L., Feiler, H.S., Ko, A.H., Olshen, A.B., Danenberg, K.L., Tempero, M.A., Spellman, P.T., Hanahan, D., and Gray, J.W. (2011). Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* 17, 500-503.
11. De Lusong, M.A.A., and Pajes, A.N.N.I. (2023). Evaluation of Fine Needle Biopsy (FNB) for Endoscopic Ultrasound (EUS)-guided Tissue Acquisition of Pancreatic Masses to Negate the Need for Rapid On-site Evaluation: A Randomized Control Trial. *Acta Medica Philippina*.
12. Erdmann, F., Spix, C., Katalinic, A., Christ, M., Folkerts, J., Hansmann, J., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., and Penzkofer, A. (2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018.
13. Etzerodt, A., and Moestrup, S.K. (2013). CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal* 18, 2352-2363.
14. Facciabene, A., Motz, G.T., and Coukos, G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res* 72, 2162-2171.
15. Falini, B., Flenghi, L., Pileri, S., Gambacorta, M., Bigerna, B., Durkop, H., Eitelbach, F., Thiele, J., Pacini, R., Cavaliere, A., Martelli, M., Cardarelli, N., Sabbatini, E., Poggi, S., and Stein, H. (1993). PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am J Pathol* 142, 1359-1372.
16. Geng, X., Chen, H., Zhao, L., Hu, J., Yang, W., Li, G., Cheng, C., Zhao, Z., Zhang, T., Li, L., and Sun, B. (2021). Cancer-Associated Fibroblast (CAF) Heterogeneity and Targeting Therapy of CAFs in Pancreatic Cancer. *Front Cell Dev Biol* 9, 655152.
17. Goyert, S. (1996). MC12. CD68 workshop panel report. Paper presented at: Leukocyte typing VI White cell differentiation antigens Proceedings of the 6th International Workshop and Conference.
18. Grillo, F., Bruzzone, M., Pigozzi, S., Prosapio, S., Migliora, P., Fiocca, R., and Mastracci, L. (2017). Immunohistochemistry on old archival paraffin blocks: Is there an expiry date? *Journal of Clinical Pathology* 70, jclinpath-2017.
19. Häberle, L., Braren, R., Schlitter, A., and Esposito, I. (2015). Metastasierung von Pankreastumoren. *Verhandlungen 2015 der Deutschen Gesellschaft für Pathologie eV* 2, 176-180.
20. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12, 31-46.
21. Haqq, J., Howells, L.M., Garcea, G., Metcalfe, M.S., Steward, W.P., and Dennison, A.R. (2014). Pancreatic stellate cells and pancreas cancer: current perspectives and future strategies. *Eur J Cancer* 50, 2570-2582.

22. Henault, D., Westphalen, C.B., and O'Kane, G.M. (2024). The neoadjuvant approach in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma: lessons learned. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 9, 186-188.
23. Hessmann, E., Buchholz, S.M., Demir, I.E., Singh, S.K., Gress, T.M., Ellenrieder, V., and Neeße, A. (2020). Microenvironmental Determinants of Pancreatic Cancer. *Physiol Rev* 100, 1707-1751.
24. Hinz, S., Pagerols-Raluy, L., Oberg, H.H., Ammerpohl, O., Grussel, S., Sipos, B., Grutzmann, R., Pilarsky, C., Ungefroren, H., Saeger, H.D., Kloppel, G., Kabelitz, D., and Kalthoff, H. (2007). Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res* 67, 8344-8350.
25. Karamitopoulou, E. (2019). Tumour microenvironment of pancreatic cancer: immune landscape is dictated by molecular and histopathological features. *Br J Cancer* 121, 5-14.
26. Karamitopoulou, E., and Gloor, B. (2013). Tumour budding is a strong and independent prognostic factor in pancreatic cancer. Reply to comment. *Eur J Cancer* 49, 2458-2459.
27. Karamitopoulou, E., Haemmig, S., Baumgartner, U., Schlup, C., Wartenberg, M., and Vassella, E. (2017). MicroRNA dysregulation in the tumor microenvironment influences the phenotype of pancreatic cancer. *Mod Pathol* 30, 1116-1125.
28. Kim, M., Grimmig, T., Grimm, M., Lazariotou, M., Meier, E., Rosenwald, A., Tsaour, I., Blaheta, R., Heemann, U., Germer, C.T., Waaga-Gasser, A.M., and Gasser, M. (2013). Expression of Foxp3 in colorectal cancer but not in Treg cells correlates with disease progression in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 8, e53630.
29. Knudsen, E.S., Vail, P., Balaji, U., Ngo, H., Botros, I.W., Makarov, V., Riaz, N., Balachandran, V., Leach, S., Thompson, D.M., Chan, T.A., and Witkiewicz, A.K. (2017). Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Combinatorial Genetic, Stromal, and Immunologic Markers. *Clin Cancer Res* 23, 4429-4440.
30. Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., and Moestrup, S.K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409, 198-201.
31. Loveday, B.P., Lipton, L., and Thomson, B.N. (2019). Pancreatic cancer: An update on diagnosis and management. *Australian journal of general practice* 48, 826-831.
32. Moffitt, R.A., Marayati, R., Flate, E.L., Volmar, K.E., Loeza, S.G., Hoadley, K.A., Rashid, N.U., Williams, L.A., Eaton, S.C., Chung, A.H., Smyla, J.K., Anderson, J.M., Kim, H.J., Bentrem, D.J., Talamonti, M.S., Iacobuzio-Donahue, C.A., Hollingsworth, M.A., and Yeh, J.J. (2015). Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* 47, 1168-1178.
33. Mueller, S., Engleitner, T., Maresch, R., Zukowska, M., Lange, S., Kaltenbacher, T., Konukiewicz, B., Ollinger, R., Zwiebel, M., Strong, A., Yen, H.Y., Banerjee, R., Louzada, S., Fu, B., Seidler, B., Gotzfried, J., Schuck, K., Hassan, Z., Arbeiter, A., Schonhuber, N., Klein, S., Veltkamp, C., Friedrich, M., Rad, L., Barenboim, M., Ziegenhain, C., Hess, J., Dovey,

- O.M., Eser, S., Parekh, S., Constantino-Casas, F., de la Rosa, J., Sierra, M.I., Fraga, M., Mayerle, J., Kloppel, G., Cadinanos, J., Liu, P., Vassiliou, G., Weichert, W., Steiger, K., Enard, W., Schmid, R.M., Yang, F., Unger, K., Schneider, G., Varela, I., Bradley, A., Saur, D., and Rad, R. (2018). Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature* 554, 62-68.
34. Ostios-Garcia, L., Villamayor, J., Garcia-Lorenzo, E., Vinal, D., and Feliu, J. (2021). Understanding the immune response and the current landscape of immunotherapy in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 27, 6775-6793.
35. Paradise, B.D., Barham, W., and Fernandez-Zapico, M.E. (2018). Targeting Epigenetic Aberrations in Pancreatic Cancer, a New Path to Improve Patient Outcomes? *Cancers (Basel)* 10.
36. Principe, D.R., Korc, M., Kamath, S.D., Munshi, H.G., and Rana, A. (2021). Trials and tribulations of pancreatic cancer immunotherapy. *Cancer Lett* 504, 1-14.
37. Puleo, F., Nicolle, R., Blum, Y., Cros, J., Marisa, L., Demetter, P., Quertinmont, E., Svrcek, M., Elarouci, N., and Iovanna, J. (2018). Stratification of pancreatic ductal adenocarcinomas based on tumor and microenvironment features. *Gastroenterology* 155, 1999-2013. e1993.
38. Qian, Z.R., Rubinson, D.A., Nowak, J.A., Morales-Oyarvide, V., Dunne, R.F., Kozak, M.M., Welch, M.W., Brais, L.K., Da Silva, A., Li, T., Li, W., Masuda, A., Yang, J., Shi, Y., Gu, M., Masugi, Y., Bui, J., Zellers, C.L., Yuan, C., Babic, A., Khalaf, N., Aguirre, A., Ng, K., Miksad, R.A., Bullock, A.J., Chang, D.T., Tseng, J.F., Clancy, T.E., Linehan, D.C., Findeis-Hosey, J.J., Doyle, L.A., Thorner, A.R., Ducar, M., Wollison, B., Laing, A., Hahn, W.C., Meyerson, M., Fuchs, C.S., Ogino, S., Hornick, J.L., Hezel, A.F., Koong, A.C., and Wolpin, B.M. (2018). Association of Alterations in Main Driver Genes With Outcomes of Patients With Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *JAMA Oncol* 4, e173420.
39. Spieler, P., Ammann, M., and Schonegg, R. (2007). [Fine-needle aspiration cytology. Aspects of a minimally invasive diagnostic procedure]. *Pathologie* 28, 325-333.
40. Spranger, S., and Gajewski, T.F. (2018). Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses. *Nat Rev Cancer* 18, 139-147.
41. Springfield, C., Krug, S., Neoptolemos, J., and Jäger, D. (2023). Aktuelle systemische Therapie beim Pankreaskarzinom. *Die Onkologie* 29, 769-777.
42. Tai, X., Van Laethem, F., Pobezinsky, L., Guinter, T., Sharrow, S.O., Adams, A., Granger, L., Kruhlak, M., Lindsten, T., Thompson, C.B., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2012). Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells. *Blood* 119, 5155-5163.
43. Ware, M.B., El-Rayes, B.F., and Lesinski, G.B. (2020). Mirage or long-awaited oasis: reinvigorating T-cell responses in pancreatic cancer. *J Immunother Cancer* 8.
44. Wartenberg, M., Cibin, S., Zlobec, I., Vassella, E., Eppenberger-Castori, S., Terracciano, L., Eichmann, M.D., Worni, M., Gloor, B., Perren, A., and Karamitopoulou, E. (2018).

Integrated Genomic and Immunophenotypic Classification of Pancreatic Cancer Reveals Three Distinct Subtypes with Prognostic/Predictive Significance. *Clin Cancer Res* 24, 4444-4454.

45. Wei, K., Ma, Z., Yang, F., Zhao, X., Jiang, W., Pan, C., Li, Z., Pan, X., He, Z., Xu, J., Wu, W., Xia, Y., and Chen, L. (2022). M2 macrophage-derived exosomes promote lung adenocarcinoma progression by delivering miR-942. *Cancer Lett* 526, 205-216.

46. Weston, B.R., and Coronel, E.S. (2022). Diagnosis and Staging of Pancreatic Cancer: Role of Gastroenterologist: Endoscopic Ultrasound (EUS), EUS-Guided Biopsy. In *Pancreatic Cancer: A Multidisciplinary Approach*, M.S. Bhutani, M.H.G. Katz, A. Maitra, J.M. Herman, and R.A. Wolff, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 77-89.

47. Zhang, Y., Lazarus, J., Steele, N.G., Yan, W., Lee, H.J., Nwosu, Z.C., Halbrook, C.J., Menjivar, R.E., Kemp, S.B., Sirihorachai, V.R., Velez-Delgado, A., Donahue, K., Carpenter, E.S., Brown, K.L., Irizarry-Negron, V., Nevison, A.C., Vinta, A., Anderson, M.A., Crawford, H.C., Lyssiotis, C.A., Frankel, T.L., Bednar, F., and Pasca di Magliano, M. (2020). Regulatory T-cell Depletion Alters the Tumor Microenvironment and Accelerates Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Discov* 10, 422-439.

48. Zheng, L., Xue, J., Jaffee, E.M., and Habtezion, A. (2013). Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 144, 1230-1240.

49. Zhu, X.X., Li, J.H., Ni, X., Wu, X., Hou, X., Li, Y.X., Li, S.J., Zhao, W., and Yin, X.Y. (2022). Pancreatic ductal adenocarcinoma cells regulated the gemcitabine-resistance function of CAFs by LINC00460. *Cancer Sci* 113, 3735-3750.

50. Zhu, Y.H., Zheng, J.H., Jia, Q.Y., Duan, Z.H., Yao, H.F., Yang, J., Sun, Y.W., Jiang, S.H., Liu, D.J., and Huo, Y.M. (2023). Immunosuppression, immune escape, and immunotherapy in pancreatic cancer: focused on the tumor microenvironment. *Cell Oncol (Dordr)* 46, 17-48.

9 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht der Zusammensetzung des Asservationsmediums CytoRichRed.....	19
Tabelle 2: Score zur Auswertung der Immunhistochemie	23
Tabelle 3: Übersicht Patientenkollektiv	30
Tabelle 4: Vergleich TNM-Klassifikation AJCC 7 und AJCC 8.....	31
Tabelle 5 Übersicht TNM-Stadium nach AJCC 7/8 bei Diagnose	32
Tabelle 6: Auswertung Score für Antikörper gegen CD163	33
Tabelle 7: Auswertung Score für Antikörper gegen CD68.....	34
Tabelle 8: Auswertung Score für Antikörper gegen FOXP3	34
Tabelle 9: Auswertung Score für Antikörper gegen CTLA4	35
Tabelle 10: Übersicht Hazard Ratio/Signifikanz aller untersuchten Antikörper	35
Abbildung 1: Sog. "Mini-Histologie" (EUS-FNA aus einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas, HE, 5x).....	21
Abbildung 2: Beispielhafte Auswertung Immunhistochemie: Score 1(Anti-CD68, 10x)	23
Abbildung 3: Beispielhafte Auswertung Immunhistochemie: Score 2 (Anti-CD68, 10x)	24
Abbildung 4: Beispielhafte Auswertung Immunhistochemie: Score 3(Anti-CD68, 10x)	24
Abbildung 5: Färbung mit Anti-CD163 Antikörper mit Markierung von M2-Makrophagen (EUS-FNA Pankreas, 10x).....	26
Abbildung 6: Färbung mit Anti-CD68 Antikörper mit Markierung von M1-Makrophagen (EUS-FNA Pankreas, 10x).....	27
Abbildung 7: Färbung mit Anti-FOXP3 Antikörper mit Markierung von regulatorischen T-Zellen (EUS-FNA Pankreas, 10x).....	28
Abbildung 8: Färbung mit Anti-CTLA4 Antikörper mit Markierung von regulatorischen T-Zellen (Lymphknoten, 20x).....	29
Abbildung 9: Darstellung der Hazard Ratio mit 95% CI für Exitus bei steigender Antikörperexpression mittels Forest Plot.....	36

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADEX	<i>Aberrantly differentiated endocrine exocrine</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
CAF	<i>Cancer associated Fibroblast</i>
CD163	<i>Cluster of Differentiation 163</i>
CD68	<i>Cluster of Differentiation 68</i>
CKDN2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
et al	<i>et alteri</i>
EUS-FNA	<i>Endoscopic ultrasound fine-needle aspiration</i>
FFPE	<i>formalin-fixed paraffin-embedded tissue</i>
FNP	<i>Feinnadelpunktion</i>
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HR	<i>Hazard ratio</i>
IL-10	<i>Interleukin-10</i>
IL-4	<i>Interleukin-4</i>
JAK/STAT-Pathways	<i>Janus kinase -signal transducer and activator of transcription pathway</i>
Kras	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
MDSC	<i>myeloid derived suppressor cells</i>
NK	<i>Natürliche Killerzellen</i>
PanIN	<i>Pancreatic Intraepithelial Neoplasia</i>
PAS	<i>Periodic-acid-Schiffs-Reaction</i>
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PD-L1	<i>Programmed Cell Death Ligand 1</i>
pH	<i>potential hydrogen</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROSE	<i>rapid on-site evaluation</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SMAD4	<i>mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
TAM	<i>Tumor-assoziierte Makrophagen</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
Teff	<i>Effektor-T-Zellen</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
Treg	<i>Regulatorische T-Zellen</i>

11 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zunächst Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Schröder, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen, konstruktiven Hilfe und Kritik und der mannigfachen Ideengebung, die mir einen kritischen Zugang zu dieser Thematik eröffnete. Ich habe unsere Dialoge stets als Ermutigung und Motivation empfunden.

Ferner danke ich Frau Priv.-Doz. Dr. Gassel für die Möglichkeit, meine Dissertation in „unserem“ Institut anzufertigen, für die unbürokratische Bereitstellung der notwendigen Ressourcen und Mittel sowie für die kritischen Betrachtungen und Anmerkungen, ohne die die Erstellung meiner Dissertation unmöglich gewesen wäre. Auch für die kritische Auseinandersetzung mit meinem Themenkomplex und für die Durchsicht meiner Arbeit bedanke ich mich herzlichst.

Des Weiteren möchte ich mich bei unserem Laborteam unter der Leitung von Frau Kusch und meinen ärztlichen Kolleginnen für die Geduld und Bereitwilligkeit bedanken, mit der sie mir trotz der täglichen diagnostischen Aufgaben mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gehört meiner Ehefrau, Kerri, sowie meiner Familie und meinen Freunden, ohne deren moralische Unterstützung meine Dissertation niemals zustande gekommen wäre.

12 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.