

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Epithelial-mesenchymale Transition und
tumorinfiltrierende Immunzellen im duktalem
Adenokarzinom des Pankreas
Eine TMA-gestützte Analyse möglicher
prognostischer Biomarker

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Michelle Schmitz
aus Bernkastel-Kues

Mainz, 2025

Urheberrechtsschutz (InC-1.0)

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 31.10.2025

Meiner Familie

„Man sieht nur mit dem Herzen gut. Das Wesentliche ist für die Augen unsichtbar“

Antoine de Saint-Exupéry aus „Der kleine Prinz“

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XII
Gender-Disclaimer	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeines und Epidemiologie.....	1
1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	1
1.2.1 Familiäres Pankreaskarzinom	2
1.3 Klinik und Diagnostik.....	2
1.3.1 Symptomatik	2
1.3.2 Diagnostik	3
1.3.3 Screening.....	4
1.4 Klassifikation und Stadieneinteilung	5
1.4.1 ICD-10-Klassifikation	5
1.4.2 TNM- und UICC-Klassifikation	5
1.4.3 Differenzierungsgrad	6
1.4.4 Residualtumor und Resektionsrand	6
1.4.5 UICC-Stadien des Pankreaskarzinoms	7
1.5 Therapie	8
1.5.1 Kurative Therapie	8
1.5.2 Palliative Therapie	10
1.6 Prognose	10
1.7 Pathologie und Molekularpathologie	10
1.7.1 Lokalisation und makroskopisches Erscheinungsbild	10
1.7.2 Histologie des PDAC	11
1.7.3 Molekularpathologie und Karzinogenese	11
1.8 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT).....	12
1.8.1 Induktion von EMT.....	13
1.8.2 EMT und die Rolle des Transkriptionsfaktors ZEB1 im Pankreaskarzinom	14
1.8.3 Regulation von EMT	14
1.9 Tumorerfiltrierende Immunzellen	16

1.9.1	Interaktion von EMT und Immunzellinfiltrat.....	18
2	Projektbeschreibung	19
2.1	Fragestellungen	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Material.....	20
3.2	Methoden	26
3.2.1	Patientenkollektiv und Gewebeproben	26
3.2.2	Datenmanagement.....	26
3.2.3	Probenauswahl und Annotation	26
3.2.4	Immunhistochemie	27
3.2.5	Digitale Bildanalyse	30
3.2.6	Statistische Auswertung.....	31
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Cut-off Werte und Kategorien der Markeranalysen.....	33
4.2	Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs	34
4.3	Assoziation von klinisch-pathologischen Merkmalen und Gesamtüberleben.....	38
4.3.1	Assoziation von Geschlecht und Alter und Gesamtüberleben	38
4.3.2	Assoziation von TNM-Stadium und Gesamtüberleben.....	39
4.3.3	Assoziation von Grading, Resektionsstatus und Gesamtüberleben.....	40
4.3.4	Assoziation von UICC-Stadium und Gesamtüberleben	40
4.4	Qualitative Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen.....	41
4.4.1	Färbungen der tumorinfiltrierenden Immunzellen	41
4.4.2	Färbungen der EMT-Marker.....	47
4.5	Univariate Ereigniszeitanalysen zur Assoziation der Expression immunhistochemischer Marker mit dem Gesamtüberleben	49
4.5.1	Assoziation von tumorinfiltrierenden Immunzellen und Gesamtüberleben.....	49
4.5.2	Assoziation von EMT-Markern und Gesamtüberleben im Pankreaskarzinom	53
5	Diskussion	55
5.1	Datenanalyse und Patientenkollektiv.....	55
5.2	Klinisch-pathologische Parameter	55
5.2.1	Geschlecht, Altersverteilung und Tumorlokalisierung.....	55
5.2.2	TNM-Klassifikation und UICC-Stadien.....	56

5.2.3	Grading	58
5.2.4	Resektionsstatus	58
5.3	Allgemeine Überlebenszeitanalyse	59
5.4	Färbung und Analyse der Immunzell- und EMT-Marker	59
5.4.1	Methodik und Limitationen der Auswertung mittels digitaler und semiquantitativer Bildanalyse	59
5.4.2	Analyse der Immunzell-Marker	60
5.4.3	EMT-Marker im Pankreaskarzinom	64
5.5	Möglichkeiten weitergehender Analysen	65
6	Zusammenfassung	66
7	Literaturverzeichnis	69
8	Danksagung	81
9	Lebenslauf	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Risikofaktoren für Pankreaskarzinome aus (12).	2
Abbildung 2: Therapiepfade beim Pankreaskarzinom modifiziert aus (10).....	8
Abbildung 3: ABC-Kriterien der Resektabilität aus (3).	9
Abbildung 4: Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms aus (2).....	11
Abbildung 5: Genmutationen und Signalwege in der molekularen Pathogenese des Pankreaskarzinoms aus (2).....	12
Abbildung 6: Ablauf der Epithelial-mesenchymalen Transition modifiziert nach (86).	12
Abbildung 7: Subtypen der Epithelial-mesenchymalen-Transition aus (87).	13
Abbildung 8: Kontrolle von EMT und MET aus (111).	15
Abbildung 9: Anfertigung eines TMA modifiziert nach (144).	27
Abbildung 10: Polymerkonjugat-Methode aus (150).	28
Abbildung 11: Workflow einer digitalen Bildanalyse mit QuPath.....	31
Abbildung 12: Histogramm der Altersverteilung.	35
Abbildung 13: Prozentuale Verteilung der Tumorlokalisation.....	35
Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der TNM-Stadien.....	36
Abbildung 15: Prozentuale Verteilung von Grading und Resektionsstatus.....	36
Abbildung 16: Verteilung der UICC-Stadien.	37
Abbildung 17: Gesamtüberleben der PDAC-Kohorte von 2007-2017.	37
Abbildung 18: Gesamtüberleben nach Geschlecht und Altersgruppen.	38
Abbildung 19: Gesamtüberleben nach TNM-Stadium.	39
Abbildung 20: Gesamtüberleben nach Grading und Resektionsstatus.	40
Abbildung 21: Gesamtüberleben nach UICC-Stadium.....	40
Abbildung 22: Exemplarische Darstellung der CD3-Färbung am PDAC.	41
Abbildung 23: Verteilung CD3+ Zellen (a) und relative Verteilung der Subgruppen (b).....	42
Abbildung 24: Exemplarische Darstellung der CD4 Färbung am PDAC.	42
Abbildung 25: Verteilung CD4+ Zellen (a) und relative Verteilung der Subgruppen (b).....	43
Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der CD8 Färbung am PDAC.	43
Abbildung 27: Verteilung CD8+ Zellen (a) und relative Verteilung der Subgruppen (b).....	44
Abbildung 28: Exemplarische Darstellung der FOXP3 Färbung am PDAC.....	44
Abbildung 29: Verteilung FOXP3+ Zellen (a) und relative Verteilung der Subgruppen (b).....	45
Abbildung 30: Exemplarische Darstellung der CD68 Färbung am PDAC.	45
Abbildung 31: Verteilung CD68+ Zellen (a) und relative Verteilung der Subgruppen (b).....	46
Abbildung 32: Exemplarische Darstellung der CD56-Färbung am PDAC.	46
Abbildung 33: Relative Verteilung der Subgruppen CD56+ Zellen.	46
Abbildung 34: Exemplarische Darstellung der N-Cadherin Färbung am PDAC.	47
Abbildung 35: Relative Verteilung der Subgruppen N-Cadherin+ Zellen.....	47
Abbildung 36: Exemplarische Darstellung der ZEB1 Färbung am PDAC.....	47
Abbildung 37: Relative Verteilung der Subgruppen ZEB1+ Zellen.	48

Abbildung 38: Assoziation von CD3+ und Gesamtüberleben.	49
Abbildung 39: Assoziation von CD4+ und Gesamtüberleben.	50
Abbildung 40: Assoziation von CD8+ und Gesamtüberleben.	50
Abbildung 41: Assoziation von CD68+ und Gesamtüberleben.	51
Abbildung 42: Assoziation von FOXP3+ und Gesamtüberleben.....	51
Abbildung 43: Assoziation von CD56+ und Gesamtüberleben.	52
Abbildung 44: Assoziation von ZEB1+ und Gesamtüberleben.	53
Abbildung 45: Assoziation von N-Cadherin+ und Gesamtüberleben.....	53

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Aqua dest	Destilliertes Wasser
CA 19-9	Carbohydrat-Antigen 19-9
CD	Cluster of differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CRM	circumferential resection margin
CT	Computertomographie
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
et al.	et alii
EUS	Endoskopischer Ultraschall
FOLFIRINOX	Folinsäure, 5-Fluorouracil, Irinotecan, Oxaliplatin
FPC	Familiäres Pankreaskarzinom
G	Grading
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
KM	Kontrastmittel
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
MDCT	Multidetektorcomputertomographie
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MHC	Major Histocompatibility Complex
miR	micro-RNA
MRCP	Magnetresonanzcholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztherapie
nab	Nanoparticle albumin bound
NCAM	neural cell adhesion molecule
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
pH	Pondus hydrogenii
R	Resektionsrand
RKI	Robert Koch Institut
rtu	ready-to-use
SD	Standardabweichung
TCR	T-cell receptor
TGF- β	Transforming Growth factor β
Th	T-Helferzellen
TILS	Tumorfiltrierende Lymphozyten
TMA	Tissue-Microarray
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor- α
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
Treg	regulatorische T-Zellen
UICC	Union internationale contre le cancer
WHO	World Health Organization
ZEB1	Zinc finger-E-Box-binding homöobox 1

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ICD-Klassifikation des Pankreaskarzinoms modifiziert nach (44).....	5
Tabelle 2: Vergleich der TNM-Klassifikation der 7. und 8. Auflage modifiziert nach (45, 46).....	5
Tabelle 3: Differenzierungsgrade von Pankreaskarzinomen modifiziert nach (49)	6
Tabelle 4: R-Klassifikation maligner Tumoren modifiziert nach (50).....	7
Tabelle 5: Vergleich der UICC-Klassifikation des Pankreaskarzinoms der 7. Und 8. Auflage modifiziert nach (45).....	7
Tabelle 6: Geräte.....	20
Tabelle 7: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien	22
Tabelle 9: Herstellung der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	23
Tabelle 10: Paraffineinbettung	24
Tabelle 11: Antikörper	24
Tabelle 12: Software	25
Tabelle 13: Geräte und Software der digitalen Bildanalyse	30
Tabelle 14: Cut-off-Werte der Immunzell-Marker	33
Tabelle 15: Kategorien der semiquantitativen Analyse von ZEB1, CD56 und N- Cadherin	33
Tabelle 16: Tabellarische Übersicht des Kollektivs	34
Tabelle 17: Zusammenfassung der Überlebenszeitanalysen der Immunzell-Marker.....	52
Tabelle 18: Zusammenfassung der Überlebenszeitanalysen der EMT-Marker.....	53

Gender-Disclaimer

In der vorliegenden Arbeit wird auf die unterschiedliche Benennung weiblicher, männlicher oder diverser Sprachformen zu Gunsten der Lesbarkeit verzichtet. Es wird das generische Maskulinum verwendet. Dieses bezieht sich, sofern nicht anders kenntlich gemacht, auf alle Geschlechter.

1 Einleitung

1.1 Allgemeines und Epidemiologie

Tumoren des Pankreas werden nach Klassifikation der *World Health Organization* (WHO) anhand histologischer Merkmale unterteilt. Dabei wird unterschieden zwischen Tumoren, die den duktaalen Zellen des Pankreasgangs entspringen, Tumoren der Azinuszellen, sowie Neoplasien der endokrinen Zellen (1).

Mit über 95 % stellt das duktaale Adenokarzinom des Pankreas, „*Pancreatic ductal adenocarcinoma*“ (PDAC) die häufigste maligne Entität dar (2, 3). Zellen der Pankreasgänge entarten meist über Vorläuferläsionen (4). In dieser Arbeit soll es um das duktaale Adenokarzinom des Pankreas gehen, im Text auch als Pankreaskarzinom oder PDAC bezeichnet. Zystische Neoplasien stammen ebenfalls von den duktaalen Zellen ab, stellen aber nur einen geringen Anteil der malignen Tumoren des Pankreas dar (3). Ebenfalls selten sind Azinuszellkarzinome (ca. 1 %) oder endokrine Tumoren (ca. 2 %) (5).

In Deutschland erkrankten 2020 über 20.000 Menschen an Pankreaskarzinomen. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 76 Jahren für Frauen und bei 72 Jahren für Männer (6). 90 % aller Erkrankungsfälle wurden nach dem 55. Lebensjahr diagnostiziert. Die Mehrheit aller Patienten war bei Diagnosestellung in einem Alter zwischen 70 und 80 Jahren (7). Inzidenz, Prävalenz und Mortalität stiegen in den letzten 25 Jahren kontinuierlich an (8). Aufgrund fehlender Frühsymptome erfolgt die Diagnosestellung meist in fortgeschrittenen Stadien (9). Zum Zeitpunkt der Diagnose liegt bei nur etwa 15-20 % der Patienten eine operativ behandelbare Erkrankung vor (10). Einhergehend mit der schlechten Prognose decken sich Neuerkrankungs- und Sterberaten nahezu. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag 2020 in Deutschland bei etwa 11 %. 2020 zählte das Pankreaskarzinom bei beiden Geschlechtern zur vierthäufigsten krebisbedingten Todesursache in Deutschland (6). Weltweit sind Pankreaskarzinome für 4,6 % aller Todesfälle durch Krebs verantwortlich (8). Bis zum Jahr 2030 wird prognostiziert, dass Pankreaskarzinome die zweithäufigste krebisassoziierte Todesursache weltweit darstellen könnten (11).

All dies gibt Anlass, die Tumorbiologie des PDAC weiter zu erforschen, um bessere Diagnose- und Therapiemöglichkeiten zu etablieren und damit die Prognose von Erkrankten zu verbessern.

1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Pankreaskarzinome treten in Industrienationen wie Nordamerika oder Europa häufiger auf als in weniger entwickelten Ländern (7), was auf eine Verbindung von Erkrankungsrisiko, Lebensstil und sozioökonomischen Gegebenheiten hindeutet (12). Auch die demografische Entwicklung, mit zunehmend alternder Bevölkerung in den entwickelten Ländern, trägt hierzu bei (13).

Abbildung 1 gibt eine Übersicht wichtiger Risikofaktoren von Pankreaskarzinomen. Als wichtigster und gesicherter Risikofaktor gilt das Rauchen von Zigaretten (14). Raucher haben im Vergleich zu Nichtrauchern ein 75 % höheres Risiko zu erkranken (15). Zudem weisen Raucher eine erhöhte Mortalität bei Erkrankung auf als Nichtraucher (16). Ob Passivrauchen das Erkrankungsrisiko ebenfalls erhöht, wird unterschiedlich diskutiert (17, 18). Hinsichtlich des Konsums von Alkohol divergiert die Studienlage. Eine Metaanalyse zeigte, dass der Konsum von mehr als 30 g Alkohol pro Tag ein erhöhtes Risiko für Pankreaskarzinome darstellt (19). Geringer und moderater Konsum konnte bisher nicht mit einem signifikant höheren Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht werden (20). Ebenfalls gesicherter Risikofaktor stellt Übergewicht dar. Eine Steigerung des *Body-Mass-Index* um fünf Punkte geht mit einem 10 % höheren Erkrankungsrisiko einher (21). Ein bestehender Diabetes mellitus Typ 1 oder 2 stellt einen weiteren Risikofaktor für Pankreaskarzinome dar (22, 23). Ein neu aufgetretener Diabetes mellitus kann auch erstes Symptom eines Pankreaskarzinoms sein (24).

Eine chronische Pankreatitis führt zur allmählichen Fibrosierung und zum Funktionsverlust endokriner und exokriner Zellen. 5 % der Patienten mit chronischer Pankreatitis erkranken an einem Pankreaskarzinom. Ihr Risiko ist gegenüber Patienten ohne Pankreatitis um das 13-fache erhöht (25, 26).

Eine weitere Assoziation besteht zum ABO-Blutgruppensystem. Patienten der Blutgruppe 0 haben gegenüber Patienten der Blutgruppe A, AB oder B ein geringeres Erkrankungsrisiko (27). Zusätzlich werden weitere Einflussfaktoren wie der Konsum von rotem Fleisch, Infektionen mit Hepatitis B, *Helicobacter pylori*, sowie die Zusammensetzung des Darmmikrobioms diskutiert (12, 28).

Factor	Direction of association	Strength of association	Type of studies conducted	Related notable findings
Smoking	Positive	Strong association; 74% increased risk in current smokers; 20% increased risk in former smokers	Case-control, cohort, nested case-control studies	Dose responsive; risk remains 10-20 yr following smoking cessation
Alcohol	Mixed between no association and positive	Various; 15%-43% increased risk in meta-analysis	Meta-analysis of cohort studies	Dose responsive; sex dependent; Increased risk in spirit drinkers; link with chronic pancreatitis which is a risk factor for pancreatic cancer
Obesity	Positive	10% increased risk for every 5 BMI units	Cohort studies	Link with Type 2 diabetes which is associated with increased risk of pancreatic cancer
Dietary factors	Variable	Non-significant positive association for red meat; 17% increased risk associated with 50 g/d of processed meat consumption compared to 20 g/d	Cohort studies	Overall consensus cannot be made and further research is required
<i>Helicobacter pylori</i>	Positive	45% increased risk	Meta-analysis of case-control studies	Significant publication bias and small numbers included therefore further studies are required

Abbildung 1: Risikofaktoren für Pankreaskarzinome aus (12).

1.2.1 Familiäres Pankreaskarzinom

Ein familiäres Pankreaskarzinom (FPC) liegt vor beim Auftreten eines Pankreaskarzinoms bei zwei oder mehr verwandten Personen ersten Grades, die nicht die Kriterien für ein anderes, hereditäres Tumorsyndrom erfüllen (3). Bei etwa 5-10 % aller Pankreaskarzinome handelt es sich um ein FPC (29). In diesen Familien werden Screening-Untersuchungen ab dem 50. Lebensjahr oder zehn Jahre vor Auftreten der Erkrankung beim jüngsten Fall empfohlen (3). Obwohl in den meisten Fällen keine spezifischen Keimbahnmutationen nachzuweisen sind, empfiehlt sich eine genetische Beratung und Diagnostik (3).

Neben dem FPC gibt es weitere hereditäre Tumorsyndrome, die ein erhöhtes Risiko für Pankreaskarzinome darstellen. Dazu gehören das Peutz-Jeghers-Syndrom, die hereditäre Pankreatitis mit Keimbahnmutation im PRSS1-Gen oder SPINK1-Gen, das FAMMMPC (Familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanom-Pankreaskarzinom-Syndrom), sowie das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom mit Keimbahnmutation im BRCA2- oder PALB2-Gen (3).

1.3 Klinik und Diagnostik

1.3.1 Symptomatik

Die größte Herausforderung bei der Diagnostik von Pankreaskarzinomen stellt das Fehlen spezifischer Symptome in frühen Stadien dar (3). Die zu Beginn auftretenden Symptome sind meist unspezifisch. Oberbauch- und Rückenschmerzen, ein neu aufgetretener, schmerzloser Ikterus oder eine akute Pankreatitis können Hinweise auf ein Pankreaskarzinom sein. Übelkeit, Gewichtsverlust oder ein sich verschlechternder Diabetes mellitus können ebenfalls unspezifische Symptome darstellen (3, 10).

Befindet sich der Tumor im Pankreaskopf, kann es zur Verlegung des Ductus choledochus kommen. Als klinisches Korrelat für den Verschluss präsentiert sich das Courvoisier-Zeichen, eine prallelastisch tastbare, schmerzlose Gallenblase begleitet von einem Ikterus (30).

Paraneoplastische Erscheinungen wie eine Thrombophilie, die Thrombophlebitis migrans (Trousseau Syndrom) oder eine Panniculitis nodularis (Pfeifer-Weber-Christian-Syndrom) können ebenfalls auftreten (30).

Ist es zur Metastasierung gekommen, können, je nach Lokalisation der Metastasen, im Verlauf eine Leberinsuffizienz, Aszites, Knochenschmerzen oder neurologische Defizite hinzutreten (10).

1.3.2 Diagnostik

1.3.2.1 Apparative Diagnostik

Bildgebend eignet sich initial die Abdomensonographie als Diagnostikverfahren bei Verdacht auf eine Pathologie der Bauchspeicheldrüse (10). Goldstandard der apparativen Primärdiagnostik beim Pankreaskarzinom ist die Computertomographie (CT) mit Kontrastmittel (KM), durchgeführt als Multidetektorcomputertomographie (MDCT) (31). Sie erlaubt eine präzise anatomische Darstellung, sowie die Möglichkeit zur Mitbeurteilung von Nachbarorganen und Gefäßen. Eine Alternative stellt die Magnetresonanztomographie (MRT) dar. Hiermit ist zusätzlich eine frühzeitige Erkennung von Leberläsionen möglich (32). Gemäß aktueller S3-Leitlinie gelten das MDCT, sowie das MRT, kombiniert mit der Magnetresonanzcholangiopankreatikographie (MRCP) als am besten geeignete Verfahren zur Detektion von Pankreaskarzinomen (3). Als Methode zur Diagnostik für Karzinome früher Stadien steht der endoskopische Ultraschall (EUS) zur Verfügung. Dieses Verfahren erlaubt eine Beurteilung der lokalen Ausbreitung und einer möglichen Gefäßbeteiligung. Zusätzlich ist in bestimmten Fällen eine Entnahme von Biopsien möglich (10). Krebsvorstufen und sehr kleine Tumoren lassen sich weder im CT, noch im MRT oder dem EUS hinreichend nachweisen. Durch eine endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) lassen sich diese mit einer Sensitivität von 92 % darstellen (33). Einen weiteren Vorteil der ERCP stellt die Möglichkeit zur gleichzeitigen therapeutischen Intervention dar. Bei Bedarf kann eine Galleableitung über einen Stent erzielt werden (34). Ist eine Darstellung des Gallengangsystems oder der Ausführungsgänge des Pankreas erforderlich, ist die MRCP-Untersuchung das Verfahren der Wahl (35).

Die höchste Treffsicherheit erzielt man demnach mit der Durchführung eines sogenannten „One-stop-shop“-MRT. Diese Untersuchung besteht aus MRT, MRCP, MR-Angiographie und Endosonographie. 90 % der Tumoren lassen sich so diagnostizieren (30).

1.3.2.2 Labordiagnostik und Histologie

Etabliertester Serummarker zur Diagnostik von Pankreaskarzinomen ist das Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA 19-9). Es weist eine Sensitivität von 72 % und eine Spezifität von 86 % auf (36). Die Bestimmung erfolgt bei Nachweis einer Raumforderung des Pankreas. Hohe Werte korrelieren mit einem höheren Tumorstadium (37) und schlechterem Überleben (38). Aus diesem Grund wird die Bestimmung von CA 19-9 zur Einschätzung der Resektabilität empfohlen (3). Ein Anstieg des Markers nach primär erfolgreicher Resektion weist zudem auf ein mögliches Rezidiv hin. Patienten mit initial hohen CA 19-9 Werten haben ein erhöhtes Rezidiv- und Metastasierungsrisiko und profitieren von einer neoadjuvanten Chemotherapie. Kontrollen des Wertes unter Chemotherapie lassen einen Rückschluss auf das Therapieansprechen zu (39, 40).

Weiterer Marker ist das Carcinoembryonale Antigen (CEA). Auch bei diesem Marker korreliert eine Erhöhung mit schlechterem Überleben nach Resektion (41). Eine weitere Rolle kommt CEA bei der Differentialdiagnostik zystischer Pankreasläsionen zu. Nach EUS-Punktion zystischer Läsionen sollte eine CEA-Bestimmung der Zystenflüssigkeit erfolgen. Werte oberhalb definierter Grenzwerte weisen auf das Vorliegen einer muzinösen Neoplasie hin (3). CEA weist eine geringere Spezifität für Pankreaskarzinome auf als CA 19-9 (37).

Die Entnahme von Biopsien bei der Endosonographie ist nur in Einzelfällen sinnvoll. Ist beispielsweise die Dignität des Tumors unklar oder besteht ein Verdacht auf Metastasierung oder Zweitmalignom, kann eine Punktion sinnvoll sein. Auch bei Tumoren, die primär einer palliativen Chemotherapie zugeführt werden sollen, ist eine vorherige histologische Diagnosesicherung indiziert (3).

1.3.2.3 Staging

Zur lokalen Ausbreitungsdiagnostik werden ein MDCT oder die Endosonographie verwendet (3). Alternativ kommt ein MRT zum Einsatz. Zudem wird eine kontrastmittelgestützte CT-Untersuchung der Lunge, des Abdomens und des Beckens durchgeführt. Bei resektablen Tumoren wird eine MRT-Untersuchung der Leber ergänzt (3). Eine Staging-Laparoskopie ist nur in Einzelfällen, beispielsweise bei sehr hohen CA 19-9-Werten (42), oder dem initialen Verdacht auf eine Peritonealkarzinose, sinnvoll (3). Eine Einschätzung des Allgemeinzustandes der Patienten mit Hilfe der Instrumente des geriatrischen Assessments ist ebenfalls sinnvoll. Der klinische Zustand des Patienten, gemessen am *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG)-Status oder dem Karnofsky-Index, sollte erhoben werden und hat Einfluss auf die weitere Therapieplanung (10).

1.3.3 Screening

Ein allgemeines Screening auf Pankreaskarzinome für die Normalbevölkerung wird aktuell nicht empfohlen (43). Liegt eine genetische Disposition oder Anamnese für ein familiäres Pankreaskarzinom vor, sind jährliche Untersuchungen mittels EUS oder MRT/MRCP ab dem 50. Lebensjahr oder zehn Jahre vor Erkrankungsbeginn des jüngsten betroffenen Verwandten indiziert (3).

1.4 Klassifikation und Stadieneinteilung

1.4.1 ICD-10-Klassifikation

Tabelle 1: ICD-Klassifikation des Pankreaskarzinoms modifiziert nach (44)

C25.-	Bösartige Neubildung des Pankreas
C25.0	Pankreaskopf
C25.1	Pankreaskörper
C25.2	Pankreasschwanz
C25.3	Ductus pancreaticus
C25.4	Endokriner Drüsenteil (inkl. Langerhans-Inseln)
C25.7	Sonstige Teile des Pankreas (inkl. Pankreashals)
C25.8	Pankreas, mehrere Bereiche überlappend
C25.9	Pankreas, nicht näher bezeichnet

1.4.2 TNM- und UICC-Klassifikation

Die Tumor-Nodus-Metastasen (TNM)-Klassifikation beschreibt die anatomische Ausdehnung von Tumoren. Das T-Stadium steht dabei für die lokale Ausdehnung des Primärtumors, das N-Stadium für das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, sowie das M-Stadium für das Vorhandensein von Fernmetastasen. Die Regeln zur Klassifikation werden für jede Tumorentität durch die *Union internationale contre le cancer* (UICC) festgelegt (3). In Bezug auf Pankreaskarzinome ergab sich mit Veröffentlichung der 8. Auflage 2017 eine Veränderung der TNM-Klassifikation (45, 46). Tabelle 2 vergleicht die Änderungen zwischen 7. und 8. Auflage.

Tabelle 2: Vergleich der TNM-Klassifikation der 7. und 8. Auflage modifiziert nach (45, 46)

	7. Auflage	8. Auflage
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T1	Tumor auf Pankreas beschränkt, max. Ø ≤ 2 cm	max. Ø ≤ 2 cm
T2	Tumor auf Pankreas beschränkt, Ø > 2 cm	max. Ø > 2cm, ≤ 4 cm
T3	Organübergreifende Ausbreitung ohne Beteiligung des Truncus coeliacus oder der AMS	max. Ø > 4cm
T4	Infiltration Truncus coeliacus	Infiltration Truncus coeliacus,

	oder der AMS (nicht resektabel)	A.hepatica comm., AMS
Nx	LK können nicht beurteilt werden	LK können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen LK-Metastasen	Keine regionalen LK-Metastasen
N1	Regionale LK-Metastasen	Metastasen in 1-3 regionalen LK
N2	-	Metastasen in ≥ 4 regionalen LK
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen	Fernmetastasen

1.4.3 Differenzierungsgrad

Über das Grading (G) wird im histopathologischen Befund der Differenzierungsgrad der Tumorzellen beschrieben. Einbezogen werden Drüsendifferenzierung, Muzinproduktion, Mitosenanzahl und Kernatypien (47). Das Grading hat Einfluss auf die Prognoseabschätzung (48).

Tabelle 3: Differenzierungsgrade von Pankreaskarzinomen modifiziert nach (49)

G1	Glanduläre Differenzierung mit intensiver Schleimproduktion und geringer Kernpolymorphie
G2	Mäßig differenzierte gangartige Strukturen und tubuläre Drüsen mit verminderter Schleimproduktion und mittelgradige Kernpolymorphie
G3	Schlecht differenzierte Drüsen und mukoepidermoide, pleomorphe Strukturen mit hochgradiger Kernpolymorphie

1.4.4 Residualtumor und Resektionsrand

In der histopathologischen Aufarbeitung wird eine Aussage zum Resektionsrand (R) des Präparates getroffen. Die R-Klassifikation beschreibt, ob, und in welchem Ausmaß sich Tumorgewebe nach Resektion oder Therapie in situ befindet (50).

Tabelle 4: R-Klassifikation maligner Tumoren modifiziert nach (50).

Rx	Residualtumor nicht beurteilbar
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Beim Pankreaskarzinom besteht, analog zum Rektumkarzinom, eine Besonderheit. Zusätzlich zum R0-Status wird bestimmt, wie weit die Tumorzellen vom jeweiligen Resektionsrand entfernt sind. Es handelt sich um das Konzept des zirkumferentiellen Resektionsrandes (CRM, (*circumferential resection margin*)). Befinden sich Tumorzellen weniger als einen Millimeter entfernt vom Resektionsrand, wird CRM+ klassifiziert (R0, CRM+ = *narrow*). Befinden sich die Zellen mehr als einen Millimeter vom Rand entfernt, wird CRM- klassifiziert (R0, CRM- = *wide*) (3). Diese präzise Unterteilung ermöglicht gezieltere Aussagen zur Prognose und zum Rezidivrisiko der Patienten (51, 52).

1.4.5 UICC-Stadien des Pankreaskarzinoms

Tabelle 5: Vergleich der UICC-Klassifikation des Pankreaskarzinoms der 7. Und 8. Auflage modifiziert nach (45)

	7. Auflage			8. Auflage		
	T	N	M	T	N	M
IA	T1	N0	M0	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0	T3	N0	M0
IIB	T1-3	N1	M0	T1-3	N1	M0
III	T4	Jedes N	M0	T4 (Jedes T)	Jedes N (N2)	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1	Jedes T	Jedes N	M1

1.5 Therapie

Wie in Abbildung 2 skizziert, erfolgt nach abgeschlossener Diagnostik die Einteilung in drei Patientengruppen. Lokal begrenzte Tumoren lassen sich mittels Resektion und adjuvanter Chemotherapie behandeln. Lokal fortgeschrittene, nicht fernmetastasierte, Tumoren werden einer neoadjuvanten Chemotherapie zugeführt und im Anschluss, bei Anschlagen der Therapie, reseziert. Patienten mit fernmetastasierten Tumoren werden innerhalb palliativer Therapiekonzepte behandelt (10). Zum Zeitpunkt der Diagnose liegt in etwa 50 % der Fälle bereits eine Metastasierung vor, 30 % befinden sich in einem lokal fortgeschrittenen Stadium (53).

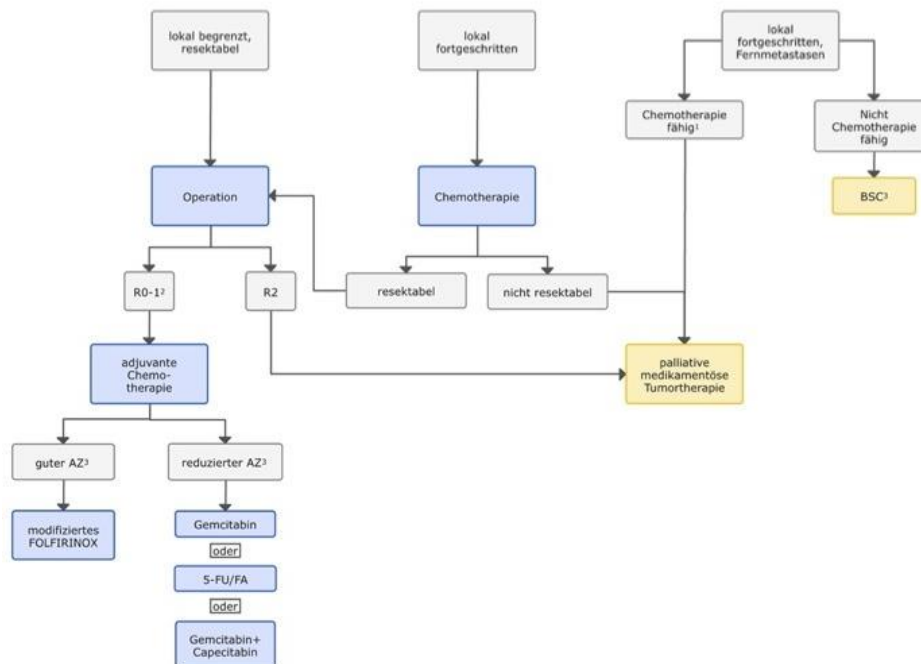


Abbildung 2: Therapiefade beim Pankreaskarzinom modifiziert aus (10).

1.5.1 Kurative Therapie

1.5.1.1 Operative Therapie

Die wichtigste kurative Therapieoption beim Pankreaskarzinomen stellt die R0-Resektion mit Lymphadenektomie dar (30). Zum Zeitpunkt der Diagnose erfüllen etwa 15-20 % aller Patienten die Kriterien für den Eingriff (54).

Pankreaskarzinome breiten sich oft diskontinuierlich aus und haben eine ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion (3). Daher fehlen einheitliche Empfehlungen zum minimalen Resektionsabstand. Es soll der größtmögliche Abstand gewählt werden. Zusätzlich wird die Anwendung des bereits oben beschriebenen CRM-Konzepts empfohlen (3). Schuhbauer et alii (et al.) konnten zeigen, dass die Einteilung von Patienten, angelehnt an die Tumorfreiheit des Resektionsrandes, in entsprechende Gruppen von Bedeutung für die Einschätzung der Prognose ist (55). Die *International Association of Pancreatology* (IAP) hat zudem eine Empfehlung zur differenzierten Beurteilung der Resektabilität anhand verschiedener Kriterien ausgesprochen. Es erfolgt eine Bewertung anatomischer, biologischer (CA 19-9) und konditionaler (ECOG-Performance-Status) Parameter. Demnach können Tumoren in die Gruppen resektabel, borderline-resektabel und lokal fortgeschritten eingeteilt werden (siehe Abbildung 3) (3, 56).

Tabelle 15: ABC-Kriterien der Resektabilität gemäß des International Association of Pancreatology (IAP) Konsensus (Isaji et al.) [267]

Resektabilität	A (anatomisch)	B (biologisch)	C (konditional)
Resektablel (R, resectable)	R-Typ A	Neg: R-Typ A	Neg: R-Typ A
		Pos: BR-Typ B	Pos: BR-Typ C
Grenzwertig-resektablel (BR, borderline resectable)	BR-Typ A	Neg: BR-Typ A	Neg: BR-Typ A
		Pos: BR-Typ AB	Pos: BR-Typ AC
Lokal-fortgeschritten (LA, locally advanced)	LA-Typ A	Neg: LA-Typ A	Neg: LA-Typ A
		Pos: LA-Typ AB	Pos: LA-Typ AC

Abkürzungen:
A: „anatomical“: Verhältnisse zu den Gefäßen
B: „biological“: CA19-9 > 500 IU/ml oder befallen regionale Lymphknoten (PET-CT oder bioptisch)
C: „conditional“: ECOG-Performance-Status 2 oder höher
Neg: negativ für die o.g. Parameter
Pos: positiv für die o.g. Parameter
Weitere Kombinationen möglich: z.B. BR-BC, BR-ABC, LA-ABC etc.

Abbildung 3: ABC-Kriterien der Resektabilität aus (3).

Die Art des Operationsverfahrens orientiert sich an der Lokalisation des Primärtumors. Für Pankreaskopfkarzinome im UICC-Stadium I und II stehen die pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie nach Traverso-Longmire (PPPD) und die partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch-Whipple als Operationsverfahren zur Verfügung (30). Hinsichtlich des Überlebens zeigen beide Verfahren vergleichbare Ergebnisse (57, 58). Liegt der Tumor im Pankreaskorpus und/oder im Pankreasschwanz, erfolgt eine Pankreaslinksresektion mit Splenektomie. Bei Tumoren, die das gesamte Organ betreffen, erfolgt die vollständige Pankreatektomie (10, 30). Borderline-resektable Tumoren sind anatomisch potentiell resektable Tumoren, bei denen einige Faktoren zu einem erhöhten Risiko für Fernmetastasierung oder Therapieversagen hinzutreten. Dazu gehören der Kontakt zu umliegenden Gefäßen, erhöhte Serumspiegel von CA 19-9 und ein erhöhter Wert im ECOG-Status (56). Patienten mit diesen Tumoren erhalten vor der Operation eine neoadjuvante Chemotherapie (3).

1.5.1.2 Neoadjuvante Chemotherapie

Wird ein Pankreaskarzinom als resektabel eingeschätzt, empfiehlt sich außerhalb von klinischen Studien kein Einsatz einer neoadjuvante Chemotherapie (59). Einige Studien unterstreichen dennoch den potentiellen Nutzen einer neoadjuvanten Therapie, auch bei resektablen Tumoren (60, 61). Bei borderline-resektablen oder lokal fortgeschrittenen Tumoren wird eine neoadjuvante Chemotherapie nach dem FOLFIRINOX-Schema oder einer Kombination aus Gemcitabin und nab-Paclitaxel durchgeführt (3).

1.5.1.3 Adjuvante Chemotherapie

Eine adjuvante Chemotherapie dient der Reduktion von Rezidiven und verbessert, im Vergleich zur alleinigen chirurgischen Resektion, das Langzeitüberleben (62). Bei allen Patienten mit Tumoren im UICC-Stadium I-III besteht die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie (3, 10). Hierzu stehen verschiedene Therapieregime zur Verfügung. Die Auswahl lehnt sich an am jeweiligen ECOG-Performance-Status der Patienten (3). Erste Wahl bei Patienten mit einem ECOG von 0 bis 1 ist das modifizierte FOLFIRINOX-Schema. Das Schema beinhaltet die Wirkstoffe Folinsäure, 5-Fluorouracil (5-FU), Irinotecan und Oxaliplatin (3). Hiermit lassen sich die besten Ergebnisse hinsichtlich des Gesamtüberlebens erzielen (63). Patienten mit

eingeschränktem Allgemeinzustand (ECOG > 1-2) erhalten eine Therapie mit Gemcitabin oder Gemcitabin und Capecitabin (3, 64). Der prognostische Nutzen einer adjuvanten Radiotherapie ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig erwiesen (65, 66). Bei R0-Resektion ist keine adjuvante Radiotherapie empfohlen und bei R1-Resektion sollte die Durchführung ausschließlich innerhalb klinischer Studien erfolgen (3).

1.5.2 Palliative Therapie

Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom profitieren, bei gutem Allgemeinzustand (ECOG 0-2) von einer palliativen Chemotherapie (3). Lebensqualität und Überlebenszeit lassen sich hierdurch verbessern (67). Darüber hinaus stehen supportive Maßnahmen, wie eine suffiziente Schmerztherapie, Ernährungstherapie, Schaffung einer Galleableitung bei Verschlussikterus, sowie rehabilitative Maßnahmen im Vordergrund des palliativen Versorgungskonzepts (3). Zusätzlich ist stets der Einschluss von Patienten in klinische Studien mit zielgerichteten Therapien zu überprüfen (3).

1.6 Prognose

Die Prognose von Pankreaskarzinomen gehört zu den schlechtesten aller Krebserkrankungen (68). Trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie liegt das 5-Jahres-Gesamtüberleben in Deutschland sowohl für Männer, als auch für Frauen bei unter 10 % (6). Die Überlebensraten variieren weltweit zwischen 2 % und 9 % (7). Die vollständige Resektion des Tumors ist nach wie vor die einzige kurative Therapieoption. Allerdings erfüllen nur etwa 20 % der Patienten bei Diagnosestellung die Kriterien für eine solche Operation (54). Auch nach der Operation liegt das 5-Jahres-Gesamtüberleben bei nur etwa 20-25 %. Vorteilhaft wirken sich ein negativer Lymphknotenstatus, sowie die Kombination aus negativem Lymphknotenstatus und R0-Resektion aus. Sie erhöhen das Gesamtüberleben auf ca. 30-40 % (69). Die Mortalität nach Duodenopankreatektomie liegt in spezialisierten Zentren bei unter 2 %, die Morbidität allerdings weiterhin bei 30-50 % (68).

Unabhängig von oben genannten Faktoren stellt der Allgemeinzustand des Patienten einen wichtigen prognostischen Faktor dar. Ein niedriger ECOG-Status (0 oder 1) ist mit einem besseren Überleben verbunden als ein höherer (2 oder 3) (70).

Der wichtigste Prognosefaktor bleibt aktuell das Tumorstadium nach UICC. Patienten im Stadium IA haben ein medianes Überleben von 38 Monaten, im Stadium IB liegt es bei 24 Monaten, in Stadium IIA bei 18 Monaten, im Stadium IIB bei 17 Monaten und bei einem Stadium III bei 14 Monaten (71). Eine R1-Resektion, eine starke Entdifferenzierung des Tumors (G3), Lymphgefäßinvasion, sowie die Höhe des CA 19-9 Spiegels vor und nach Resektion beeinflussen ebenfalls die Prognose (68). Beim metastasierten Pankreaskarzinom (UICC Stadium IV) liegt das mediane Gesamtüberleben bei 12 Monaten (72).

1.7 Pathologie und Molekularpathologie

1.7.1 Lokalisation und makroskopisches Erscheinungsbild

Häufigste Lokalisation ist der Pankreaskopf (70 %), gefolgt vom Pankreaskorpus mit 5-15 % und dem Pankreasschwanz mit 10-15 % (49). Makroskopisch präsentieren sich die Tumoren meist als unscharf begrenzte, grau-gelbliche Formationen von solider Konsistenz (73). Bei Diagnose erreicht der Tumor häufig eine Größe von 2-5 cm und hat meist in umliegende Strukturen wie die AMS, die Vena lienalis, das Duodenum, die Pfortader oder die Vena cava inferior infiltriert (73, 74). Eine Metastasierung in peripankreatische Lymphknoten, sowie entlang des Truncus coeliacus oder der Aorta ist ebenso typisch (5). Im Verlauf tritt häufig eine Metastasierung über die Pfortader in die Leber oder eine Peritonealkarzinose hinzu (5).

1.7.2 Histologie des PDAC

Histologisch präsentieren sich unregelmäßig geformte, drüsige, tubuläre Strukturen (49). Der Differenzierungsgrad reicht von gut differenziert (G1 und G2) bis entdifferenziert (G3). Die Mehrzahl der Tumoren sind gut bis mäßig differenziert (5). Die entarteten Zellen variieren stark in Form und Größe (Pleomorphie). Bei den Zellkernen lässt sich eine ausgeprägte Anisokaryose, sowie eine vermehrte Mitoseaktivität beobachten. Die Tumorzellen finden sich sowohl einzeln als auch in clusterartigen Verbänden (49). Ebenfalls charakteristisch ist eine Infiltration benachbarter Nervenfasern (Perineuralscheideninfiltration) (75). Die Tumormasse ist umgeben von reichlich desmoplastischem Stroma (ca. 90 % der Tumormasse) (76). In diesem befinden sich unter anderem Fibroblasten, Myofibroblasten, Kollagen Typ 1, Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten und Plasmazellen (77, 78).

1.7.3 Molekularpathologie und Karzinogenese

Die Mehrheit der Pankreaskarzinome entwickelt sich nach aktuellem Kenntnisstand aus präkanzerösen Vorstufen (3). Zu diesen zählen die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinös-zystische Neoplasie (MCN) (49, 74). Die Karzinogenese verläuft, wie in Abbildung 4 veranschaulicht, stufenweise und folgt einem sogenannten Tumorprogressionsmodell (2). Analog zum Tumorprogressionsmodell von Vogelstein et al. im kolorektalen Karzinom, kommt es im Laufe der Zeit durch Akkumulation von genetischen und epigenetischen Aberrationen zur Entartung der Zellen (79).

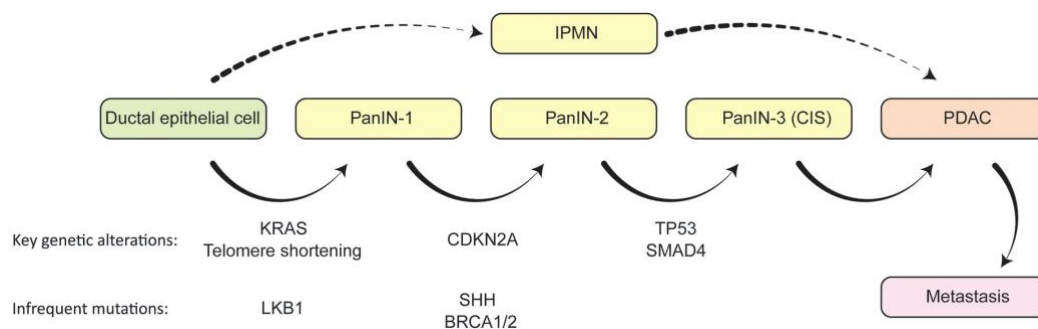


Abbildung 4: Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms aus (2).

Vier Gene und die damit verbundenen Signalwege (Übersicht in Abbildung 5) sind für die Tumorentstehung und -verbreitung bei Pankreaskarzinomen von besonderer Bedeutung. Eine Schlüsselrolle hat die Aktivierung des Onkogens KRAS (*Kirsten Rat Sarcoma Virus*). Diese liegt bei 92 % aller Pankreaskarzinome vor (2). Zudem erfolgt eine Inaktivierung der Tumorsuppressorgene CDKN2A/p16, SMAD4 und TP53 (2).

Die häufigste Vorläuferläsion von Pankreaskarzinomen ist die PanIN (80). Bereits in diesen Vorläuferläsionen kann in über 90 % der Fälle eine Mutation von KRAS nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass KRAS in diesem Zusammenhang als Initiator-Mutation fungiert. Für den weiteren Progress ist die Akkumulation zusätzlicher genetischer Veränderungen notwendig (80). KRAS ist ein sogenanntes G-Protein. In gesunden Zellen liegt es, gebunden an Guanosindiphosphat (GDP), als KRAS-GDP vor und steuert Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Migration über Signalwege wie RAF/MEK/ERK, PI3K oder RAL-GEF. In Tumorzellen kommt es zur ständigen, ungeordneten Aktivierung dieser Prozesse, da KRAS dauerhaft als aktiviertes KRAS-Guanosintriphosphat (GTP) vorliegt (2).

Bei CDKN2A handelt es sich um ein Gen, welches für das Protein p16/INK4A codiert. Dieses sorgt für einen Zellzyklusarrest durch eine Blockade der S-Phase (81). p16 induziert in KRAS-aktivierten Zellen Seneszenz. 95 % der Pankreaskarzinome weisen einen Verlust dieses Gens auf (82).

Bei 75 % aller Pankreaskarzinome gibt es einen Funktionsverlust von TP53 (2). TP53 kann in gesunden Zellen bei DNA-Schädigung einen Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren (83). Mutiertes TP53 wird als Treiber von Proliferation und invasiver Metastasierung bei Pankreaskarzinomen diskutiert (2).

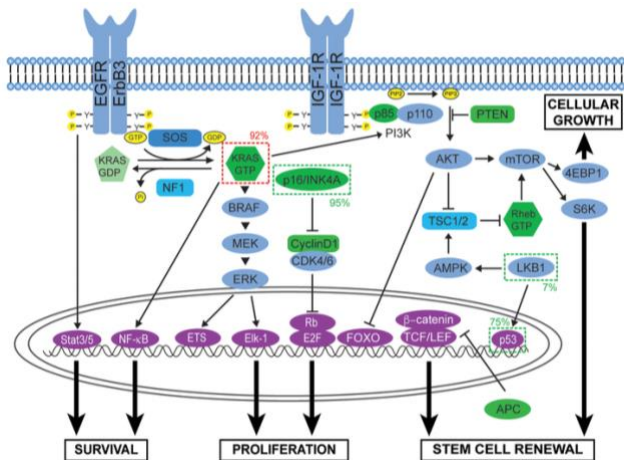


Abbildung 5: Genmutationen und Signalwege in der molekularen Pathogenese des Pankreaskarzinoms aus (2).

1.8 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Epitheliale Zellen haben die Eigenschaft, sich untereinander durch Zell-Zell-Kontakte, wie *tight junctions* und Desmosomen zu verbinden. Über Hemidesmosomen sind die Zellen mit der Basalmembran verbunden. Die Zelle erhält so ihre apikal-basale Polarität. Der Apex ist der Richtung Oberfläche weisende Zellanteil, die Basis, der in Richtung Basalmembran weisende. Im Gegensatz dazu befinden sich mesenchymale Zellen im lockeren Zelleverband, ohne feste Zellkontakte und Polarität. Sie sind über *gap junctions* miteinander verbunden und locker in die Extrazellulärmatrix eingebettet. Sie sind in der Lage zu anderen Orten zu migrieren (84).

Als Epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet man die Umwandlung einer Zelle mit epithelialen Eigenschaften zu einer Zelle mit mesenchymalen Eigenschaften. Erstmals beschrieben wurde der Prozess 1982 durch Greenburg und Hay (85). Abbildung 6 zeigt schemenhaft den Ablauf der Epithelial-Mesenchymalen-Transition.

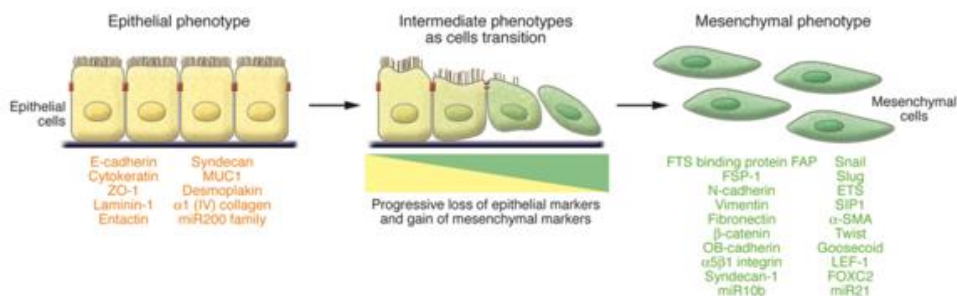


Abbildung 6: Ablauf der Epithelial-mesenchymalen Transition modifiziert nach (86).

Es wird zwischen drei verschiedenen Formen von EMT unterschieden (Abbildung 7) (87). Der Vorgang der Epithelial-mesenchymalen Transition ist im menschlichen Organismus bereits in der Embryonalentwicklung von Bedeutung (88). Dieser Vorgang

wird als EMT Typ 1 bezeichnet und trägt zur Embryogenese und Organentwicklung bei (86). Bei Prozessen wie Wundheilung, Geweberegeneration oder Fibrosierung von Organen kommt es teils zur Umwandlung von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalem Charakter, vornehmlich in Fibroblasten. Dies ist immer verbunden mit einem Trauma oder einer Entzündung. Beschriebene Vorgänge gehören zur EMT Typ 2 (86). Eine weitere Form, EMT Typ 3, vollzieht sich in Krebszellen. In diesen Zellen kommt es zu genetischen und epigenetischen Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Dies initiiert die Umwandlung von Epithelzellen zu mesenchymalen Zellen. Die Zellen durchbrechen in Folge die Basalmembran, verlassen den Gewebeverband und erhalten die Fähigkeit zur Migration. Am Ort der Metastasenbildung lässt sich der umgekehrte Vorgang beobachten. Es kommt zur sogenannten Mesenchymal-epithelialen Transition (MET). Durch Signale im dortigen Umfeld erlangen die Zellen epithelialen Charakter, wachsen und dringen in umliegendes Gewebe ein (86, 87, 89).

Characteristics	Types of EMT		
	Type 1	Type 2	Type 3
Moment of appearance during human life	Embryo formation: ✓ Organ development	Adult life: ✓ Trauma ✓ Inflammation	Adult life: ✓ Epithelial cancer
Physiological processes in which EMT is involved	Generates the first set of mesenchymal cells = primary mesenchyme	Wound healing Tissue regeneration Organ fibrosis	
Pathological processes in which EMT is involved	Without	Ongoing fibrosis with organ destruction	Systemic progression = metastases

Abbildung 7: Subtypen der Epithelial-mesenchymalen-Transition aus (87).

Durch EMT veränderte Zellen weisen eine Reihe morphologischer Besonderheiten auf. Es kommt unter anderem zu Veränderungen am Zytoskelett. Zell-Zell-Kontakte werden unterbrochen und der Kontakt zur Basalmembran geht verloren. Dadurch schwindet die für Epithelzellen charakteristische apikal-basale Polarität (90, 91). Molekulare Grundlage ist der Verlust von Proteinen wie E-Cadherin und die vermehrte Expression mesenchymaler Proteine wie N-Cadherin, Fibronectin und Vimentin (92).

Ein weiteres wichtiges Protein ist β -Catenin. β -Catenin sorgt unter physiologischen Bedingungen dafür, dass Cadherine mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbunden sind. Im gesunden Gewebe findet man β -Catenin membranständig. In durch EMT veränderten Zellen befindet sich β -Catenin hingegen im Zytoplasma und im Zellkern und kann dort als Aktivator des EMT-relevanten Transkriptionsfaktors Snail wirken (93-96).

1.8.1 Induktion von EMT

EMT wird hauptsächlich durch Entzündungsreaktionen und epigenetische Veränderungen induziert (89). Auf molekularer Ebene hat der Wachstumsfaktor *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) einen entscheidenden Einfluss. Dem Wachstumsfaktor kommt dabei eine duale Rolle zu. Er kann proliferative und antiproliferative Prozesse beeinflussen. In Zellkulturen zeigte sich, dass TGF- β sowohl EMT als auch Apoptose in Zellen induzieren kann. Die wachstumshemmende Wirkung von TGF- β ist mitunter abhängig von der Aktivität des Proteins SMAD4. Kommt es zum Funktionsverlust von SMAD4, so hat der Einfluss von TGF- β eine wachstumsfördernde Wirkung auf die Zelle. Kontextabhängig kann TGF- β somit EMT, als auch die Apoptose von Tumorzellen induzieren. Dies wird als „lethal-EMT“ bezeichnet (2). An der Zellmembran bindet TGF- β an seinen Rezeptor, eine Serin/Threonin-Kinase. Diese aktiviert die intrazellulären Proteine SMAD2 und 3, welche wiederum an SMAD4 binden. Der Komplex wird in den Zellkern verlagert und kann dort als Transkriptionsfaktor EMT-relevante Gene aktivieren (2). Weiterhin notwendig für eine durch TGF- β induzierte EMT ist die Aktivierung der *extracellular signal-regulated kinase* (Erk). Erk kann durch mutiertes KRAS in seiner Aktivität modifiziert werden. Über diesen Mechanismus hat KRAS einen Einfluss auf die TGF- β -Signalgebung (87).

Wie bereits im Kapitel Molekularpathologie und Karzinogenese beschrieben, findet sich eine Punktmutation im KRAS-Onkogen bei über 90 % aller Pankreaskarzinome. Es ist damit die am häufigsten vorkommende Mutation dieser Tumorentität. Sie führt zu einer konstitutionellen Aktivierung des Ras-Proteins, welches EMT aufrechterhält, Proliferation fördert und zur Apoptoseresistenz, sowie invasivem Wachstum führt (87). Ebenfalls beeinflusst werden EMT und MET durch das Mikromilieu der Zellen, gebildet durch Fibroblasten, Immunzellen und der extrazellulären Matrix (97). Im Pankreaskarzinom konnte gezeigt werden, dass polymorphkernige Neutrophile (PMNs) EMT induzieren können, indem Zell-Zell-Kontakte durch die in ihnen enthaltene Elastase zerstört werden (98).

1.8.2 EMT und die Rolle des Transkriptionsfaktors ZEB1 im Pankreaskarzinom

Pankreaskarzinome wachsen invasiv, metastasieren früh und reagieren oft schlecht auf Chemotherapeutika (99). Mittlerweile ist bekannt, dass EMT hierbei eine große Rolle spielt. Einer der wichtigsten Vorgänge ist der sogenannte *cadherin switch* (99). Es erfolgt eine Herabregulation von E-Cadherin zugunsten einer Mehrexpression von N-Cadherin. Die Zelle gewinnt so mesenchymalen Charakter. Zudem erfolgt die Aktivierung von TGF- β . Durch sogenannte „EMT-aktivierende Transkriptionsfaktoren“ (99) wird die Expression von E-Cadherin herabreguliert. Zu diesen Faktoren zählen Snail, ZEB1, ZEB2 und Twist (99).

Ein wichtiger EMT-Aktivator im Pankreaskarzinom ist der Transkriptionsfaktor ZEB1. ZEB1 steht für *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*. Eine verminderte Aktivität von ZEB1 ist mit einer vermehrten Expression epithelialer Marker und mit verbessertem Ansprechen auf Chemotherapeutika assoziiert (100). Es existieren zwei miteinander verwandte Proteine, ZEB1 und ZEB2. Bei beiden handelt es sich um sogenannte Zinkfingerproteine, die als Transkriptionsfaktoren bei der Induktion von EMT fungieren. Eine gängige Hypothese besagt, dass andere aktivierte Transkriptionsfaktoren wie Snail EMT zunächst anstoßen und ZEB1 die Aufrechterhaltung des Vorgangs steuert (101). ZEB1 wird in diesem Zuge als *master regulator* (102) in Epithelzellen gesehen. Auf mRNA-Level können durch ZEB1 etwa 200 Gene herunterreguliert werden. Bei diesen Genen handelt es sich meist um Gene für Proteine, die zur Aufrechterhaltung der apikal-basalen Polarität oder der Zell-Zell-Adhäsion dienen (102).

Auch in anderen Tumorentitäten wurde die Wirkung von ZEB1 auf Tumorwachstum und Metastasierung untersucht. Im Kolonkarzinom gilt ZEB1 als Faktor, der zu vermehrter Metastasenbildung und einem Stopp des zellulären Seneszenz-Programms führt (103).

Führt man einen Knockout von ZEB1 im Mausmodell durch, zeigt sich, dass diese Tumoren eine bessere Differenzierung aufweisen, weniger invasiv wachsen und seltener metastasieren. Zudem kam es zur verminderten Expression von ZEB2, Slug und Snail. Allerdings verhinderte der Knockout nicht gänzlich das Tumorwachstum. ZEB1-defiziente Mäuse zeigten gut differenzierte Tumoren mit homogenem Zellbild. Ein Verlust von ZEB1 führte zudem zu geringerer zellulärer Plastizität (104). Transkriptionsfaktoren wie Snail und Twist scheinen im Pankreaskarzinom eine eher untergeordnete Rolle bei der Induktion von EMT zu spielen (104, 105).

1.8.3 Regulation von EMT

Wie beschrieben, handelt es sich bei EMT um einen Vorgang, der physiologisch bereits in der Embryonalentwicklung von Bedeutung ist (87). Kommt es zur ungerichteten Aktivierung, kann EMT zum Tumorwachstum und zur Entwicklung von Metastasen beitragen (106).

Induziert durch KRAS und TGF- β , werden Transkriptionsfaktoren wie ZEB1 aktiviert. Durch sogenannte *microRNAs* (miRNAs), nicht kodierende RNA-Abschnitte, kann die Genexpression reguliert werden (107). ZEB1 unterdrückt die Expression von Genen, die für die epitheliale Differenzierung von Bedeutung sind (108). Eine Aktivierung des Programms führt dazu, dass Tumorzellen ihre Zell-Zell-Kontakte verlieren und den

Zellverband verlassen, um zu migrieren (109). Zellen, in denen EMT aktiviert ist, neigen dazu, bei Exposition gegenüber Toxinen, zu denen auch Chemo- und Radiotherapie gehören, kaum in die Apoptose zu gehen (106). Eine Regulation oben genannter Vorgänge findet über zwei Feedbackschleifen (Abbildung 8) statt. In der ersten Schleife beeinflussen sich der Transkriptionsfaktor ZEB1 und miR-200 gegenseitig. ZEB1 wird durch Faktoren wie TGF- β , Tumornekrosefaktor- α (TNF-alpha) oder Hypoxie aktiviert. Es kommt zu EMT. Zellen gehen vermindert in die Apoptose und erhalten stammzellartige Eigenschaften. miR-200 fördert Prozesse wie MET, Zelldifferenzierung, Apoptose und Seneszenz. Dabei inhibiert ZEB1 miR-200 und umgekehrt (110). In der zweiten Schleife kommt es zur gegenseitigen Regulation von Snail und miR-34. miR-34 und miR-200 tragen beide zusätzlich zu einer verminderten Expression von Stammzellmarkern wie CD44 und CD133 bei. Eine Aktivierung von miR-34 erfolgt durch den Tumorsuppressor p53 (111, 112).

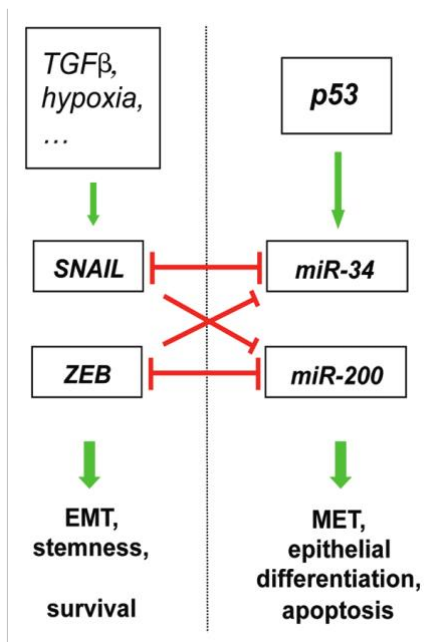


Abbildung 8: Kontrolle von EMT und MET aus (111).

In den vergangenen Jahren wurde EMT zum Teil kontrovers diskutiert. Zheng et al. zeigten an Mausmodellen, dass die Ausschaltung von EMT-relevanten Faktoren keinen Einfluss auf die Invasivität oder das Metastasierungsverhalten von Tumoren hatte. Es kam trotz Ausschaltung zur Expression mesenchymaler Marker. Lediglich die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber einer Chemotherapie konnte gesteigert werden (105). Auch in einer weiteren Arbeit wurde die Rolle von EMT für die Bildung von Metastasen kritisch hinterfragt. Eine Unterdrückung von EMT, ausgelöst durch Überexpression von miR-200, konnte eine Metastasierung der Zellen von Mammakarzinomen nicht verhindern. Auch in diesem Fall zeigte sich lediglich eine geringere Rückfallrate, sowie ein besseres Ansprechen gegenüber der Chemotherapie (113).

Brabletz et al. unterstreichen dennoch die Wichtigkeit von EMT und begründen obige Erkenntnisse damit, dass es sich bei EMT um einen komplexen Vorgang handele, der sich nicht allein anhand der Ausschaltung zweier Gene und der damit verbundenen Konsequenzen beschreiben lasse (114). Einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren für EMT, ZEB1, scheint zum Beispiel nicht immer notwendig zu sein, damit Tumorzellen in der Lage sind zu metastasieren. Die Erklärung könnte sein, dass Zellen nicht zwangsläufig, durch EMT induziert, ihre epithelialen Eigenschaften verlieren müssen, um zu migrieren. Sie könnten sich auch als kleine Zellgruppen vom Tumor lösen und verbreiten. Hierbei spielen sogenannte *leader-cells* (115) eine wichtige

Rolle. *Leader-cells* sind Zellen der Invasionsfront. Sie haben mesenchymale Eigenschaften, verlieren aber nicht den Kontakt zum Gewebeverband. Auch Fibroblasten aus dem Tumorstroma können nach entsprechender Aktivierung als *leader-cells* fungieren (115).

Wie Tumorzellen sich verbreiten und Metastasen gebildet werden, ist von Bedeutung für die klinische Therapie der Erkrankung. Die Invasionsfront, als Schnittstelle zwischen Tumor und Normalgewebe enthält hierzu wichtige Informationen. Gegenstand von Untersuchungen sind Prozesse wie *tumour-budding* (116, 117). Hierunter versteht man das Vorkommen von fünf oder mehr einzelnen Tumorzellen in der direkten Tumorumgebung. Bei diesem Prozess spielt der Verlust von E-Cadherin, sowie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Slug und ZEB1 ebenfalls eine Rolle (116, 117). Bronsert et al. fertigten eine dreidimensionale Rekonstruktion der Invasionsfront an histopathologischen Schnitten an, um die intratumorale Heterogenität und die Prozesse an der Invasionsfront besser abbilden zu können. Hierbei zeigte sich, dass Tumorzellen nahezu nie als einzelne Zelle an einen anderen Ort migrieren. Vor allem bei Zellen der Invasionsfront war zusätzlich erkennbar, dass EMT-Faktoren wie ZEB1 stärker exprimiert wurden als in anderen Tumorzellen. Epitheliale Marker wie E-Cadherin wurden hier vermindert exprimiert. Auch nahmen die Zellen mesenchymale Eigenschaften, wie eine spindelförmige Morphologie, an. Es kam auch in diesem Fall nicht zum vollständigen Verlust epithelialer Marker (116).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass EMT, oder, wie in der Arbeit von Krebs et al. formuliert, „*cellular plasticity*“ (104), ein komplexer Vorgang ist, dessen Beschreibung sich nicht mit der Aktivierung oder Inaktivierung von einem oder mehreren Transkriptionsfaktoren realisieren lässt. Hierbei spielen eine Reihe von Faktoren, wie die Stoffwechsellage oder die Umgebungsreaktion der Zelle, eine Rolle. Hinzu kommt, dass es sich um einen dynamischen Zustand handelt, der sich nur unzureichend durch experimentelle Momentaufnahmen beschreiben lässt (104).

1.9 Tumorinfiltrierende Immunzellen

In den meisten Tumoren finden sich tumorinfiltrierende Immunzellen. Einen Großteil davon stellen tumorinfiltrierende Lymphozyten dar (TILS). Ausgelöst durch Tumorantigene stoßen diese Zellen eine Immunreaktion des menschlichen Körpers gegen den Tumor an (118). Es existieren verschiedene Arten von Immunzellen mit unterschiedlichen Funktionen und unterschiedlichem Einfluss auf das Tumorwachstum. Die Interaktionen zwischen Tumor- und Immunzellen sind komplex. Eine wichtige Untergruppe bilden hier die T-Lymphozyten. Diese lassen sich in verschiedene Subgruppen einordnen. CD8+ T-Lymphozyten können Tumorzellen direkt abtöten. CD4+ T-Lymphozyten werden als T-Helferzellen (Th) bezeichnet und bilden wiederum zwei Untergruppen. Th1-Zellen helfen bei der Aktivierung von CD8+ T-Zellen. Th2-Zellen sind an der humoralen, antikörpervermittelten Immunantwort, sowie der Rekrutierung von Eosinophilen beteiligt (119). Die Funktion der CD4+ T-Lymphozyten wird durch regulatorische T-Zellen beeinflusst (Treg). Diese tragen auf ihrer Oberfläche den Marker FOXP3 und werden auch als FOXP3+ Zellen bezeichnet (120). Regulatorische T-Zellen können die antitumorale Immunantwort modulieren und unterdrücken (120).

Der Einfluss der Immunzellen auf Tumorwachstum, -progression und das Überleben der Patienten wurde in einer Vielzahl von Studien untersucht. Es scheint, dass die Charakterisierung des Immunzellinfiltrats ein geeignetes Tool zur Prognoseabschätzung, in Ergänzung zur rein histopathologischen Stadieneinteilung, darstellt (121). Eine Metaanalyse von Orhan et al. fasst die Erkenntnisse zur prognostischen Wertigkeit von TILS im Pankreaskarzinom zusammen. Grundsätzlich war eine hohe Anzahl von T-Zellen (CD3+) im Tumor mit einer besseren Prognose verbunden. Im Speziellen waren hohe Werte CD4+ Zellen und CD8+ Zellen mit einem besseren Outcome assoziiert. Patienten mit hoher Anzahl FOXP3+ regulatorischer T-Zellen hatten ein schlechteres Gesamtüberleben (122). Die Betrachtung einzelner, absoluter Zahlenwerte wurde den komplexen Vorgängen innerhalb des

Immunzellinfiltrates und den Wechselwirkungen mit dem Tumor nicht gerecht. Mittels Auswertung von Quotienten der genannten Subpopulationen ließen sich die Zusammenhänge besser darstellen (123). Mahajan et al. zeigten, dass die Anzahl von CD3+, CD4+, CD8+ und CD68+ Zellen unabhängige prognostische Marker hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens darstellten. Die Kombination aus niedriger Anzahl CD3+ und CD8+ Zellen, gepaart mit hoher Anzahl CD68+ Zellen war mit schlechterem Überleben der Patienten im Pankreaskarzinom assoziiert (124). In einer Arbeit von Nejati et al. wurden anhand von *Tissue-Microarrays (TMAs)* immunhistochemische Analysen der Marker CD4, CD8 und FOXP3 an Patienten mit Pankreaskarzinomen durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine hohe Anzahl CD4+ Zellen ein unabhängiger prognostischer Faktor für ein längeres Überleben ist. Ein hohes Level an FOXP3 war auch in dieser Studie mit kürzerem Überleben assoziiert (125). Auch Fukunaga et al. stellten in ihrer Arbeit dar, dass Patienten mit der Kombination von hoher Anzahl CD4+ und CD8+ Zellen eine bessere Prognose hatten als solche mit niedrigen Werten. Die Betrachtung der jeweiligen Marker allein ließ auch in diesem Fall keine valide Aussage hinsichtlich der Prognose zu (126). Hu et al. untersuchten ebenfalls den Einfluss von CD4+ Lymphozyten. Hier schien der Zusammenhang komplexer zu sein als bei CD8+ Lymphozyten. Insbesondere die sogenannten regulatorischen T-Zellen, zu deren Markern FOXP3 gehört, spielten eine komplexe Rolle in der Tumorumgebung. Es wird vermutet, dass sie die körpereigene Immunantwort gegen den Tumor drosseln und somit das Tumorstadium verstärken könnten. Die Metaanalyse, die acht Studien zum Thema FOXP3+ regulatorische T-Zellen in Pankreaskarzinomen zusammenfasst, besagt, dass eine hohe Anzahl FOXP3+ Zellen mit einem schlechteren Gesamtüberleben verbunden war (127). Delayre et al. untersuchten an einem Patientenkollektiv den prognostischen Einfluss von TILS des Pankreas. Eine hohe CD4/CD3-Ratio war hier mit einer schlechteren Prognose assoziiert (128). Ino et al. zeigten an immunhistochemischen Analysen von über 200 Patienten, dass eine hohe Anzahl CD8+ Zellen und CD4+ Zellen mit einem besseren Überleben verknüpft waren. Ebenso niedrige Level CD68+ Zellen und FOXP3+ Zellen. Die Kombination aus hoher Anzahl CD4+ und CD8+ Zellen, gepaart mit einer niedrigen Anzahl regulatorischer T-Zellen stellte sich als signifikanter, unabhängiger prognostischer Marker dar (129). Auch im Hinblick auf das Therapieansprechen stellt das Immunzellinfiltrat im Pankreaskarzinom eine wichtige Einflussgröße dar. Eine hohe Anzahl CD3+ Zellen und CD8+ Zellen im Tumorgewebe von Pankreaskarzinomen hatte einen positiven Einfluss hinsichtlich des Ansprechens auf eine Chemotherapie (130).

CD68 als Marker von Makrophagen und Monozyten spielt schon seit längerem eine Rolle als prognostischer Marker in Tumoren. CD68+ Zellen werden auch als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) bezeichnet (131). Die Tumoren selbst exprimieren dabei CD68 und können so der körpereigenen Immunantwort entgehen (132). Es zeigte sich, dass im Hodgkin-Lymphom eine hohe Anzahl CD68+ Zellen mit Metastasierung und einer schlechteren Prognose vergesellschaftet war (133). Der Einfluss CD68+ Zellen auf Tumorstadium und -progress scheint allerdings unterschiedlich zu sein. Im kolorektalen Karzinom war eine hohe Expression von CD68 mit einem besseren Überleben vergesellschaftet (134, 135). Beim Urothelkarzinom der Blase war eine hohe Anzahl CD68+ Zellen mit schlechterem Überleben assoziiert (136). Auch beim Glioblastom war eine hohe Anzahl CD68+ Zellen mit vermehrtem Tumorstadium verbunden (137). Dies lässt sich dadurch erklären, dass Makrophagen sich zu sogenannten M1- und M2-Makrophagen differenzieren und somit unterschiedliche Funktionen ausüben können. M1-Makrophagen helfen bei der Abwehr von Krankheitserregern, initiieren Entzündungen und wirken antitumoral. M2-Makrophagen hingegen wirken immunsuppressiv und können Tumoren dabei helfen, dem Immunsystem zu entkommen (138). M1-Makrophagen sind gekennzeichnet durch CD40 und CD64 auf ihrer Oberfläche, M2-Makrophagen durch CD163 (139).

1.9.1 Interaktion von EMT und Immunzellinfiltrat

EMT und das Immunzellinfiltrat scheinen sich in Tumoren wechselseitig zu beeinflussen. Im triple-negativen Mammakarzinom zeigte sich, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau des EMT-Markers ZEB1 und der Verteilung der Immunzellen in der Tumorumgebung gibt. Ein hohes Level an ZEB1+ Zellen, sowohl intratumoral als auch stromal, ging mit einer geringen Dichte CD8+ Zellen im Tumor einher (140). Im kolorektalen Karzinom war eine dichte Infiltration mit CD68+ Makrophagen mit einer geringeren Expression des EMT-Markers Snail und weniger *tumor-budding* verbunden (134).

FOXP3 scheint ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Induktion und Regulation von EMT zu spielen. Im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom war eine hohe Anzahl FOXP3+ Zellen mit einer schlechteren Prognose assoziiert und zeigte sich als unabhängiger prognostischer Marker (141). In vitro-Experimente zeigten zusätzlich, dass eine höhere Anzahl von FOXP3+ Zellen Zellwachstum, -migration und Invasivität des Tumors förderte, sowie die Expression von E-Cadherin verminderte. Zusätzlich kam es zur vermehrten Expression von N-Cadherin und Slug. Ein Knockout des FOXP3-Gens führte hingegen zur Aufhebung der beschriebenen Prozesse (141). Die Anzahl FOXP3+ Zellen korrelierte im Pankreaskarzinom mit der Anzahl befallener Lymphknoten (142).

2 Projektbeschreibung

Trotz zahlreicher Fortschritte im klinischen Management von malignen Tumoren, konnte in den letzten Jahrzehnten beim Pankreaskarzinom kein wesentlicher Fortschritt im Hinblick auf die Früherkennung des Tumors oder das Gesamtüberleben unter Therapie erzielt werden. Aus diesem Grund ist es essenziell, die Tumorbiologie des Pankreaskarzinoms besser zu verstehen. Hierzu müssen spezifische Biomarker identifiziert und deren Einfluss auf das Tumorstadium und das Überleben der Patienten untersucht werden, um Angriffspunkte für neue Therapiemöglichkeiten zu schaffen.

Kern der Arbeit ist die Analyse ausgewählter immunhistochemischer Marker der Epithelial-mesenchymalen-Transition (EMT) und der tumorinfiltrierenden Immunzellen mittels digitaler, automatisierter Bildanalyse. Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen werden zusammen mit den Überlebensdaten der Patienten ausgewertet. Ziel ist es, Aussagen über den Zusammenhang der Expression des Biomarkers im Tumor und der Prognose des Patienten zu generieren.

2.1 Fragestellungen

1. Wie korrelieren histopathologische und klinische Daten mit dem Gesamtzeitüberleben der Patienten?
2. Korreliert die Höhe der Anzahl an positiven Zellen für Färbungen verschiedener EMT- und Immunzellmarker mit dem Gesamtzeitüberleben der Patienten?

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
1.0 mm Stanze	1.0 mm Punch P/N 02110005	Pathology Devices, San Diego, USA
Dampfgarer	Braun Dampfgarer 3216	Braun GmbH, Kronberg, Deutschland
Färbeautomat Hämatoxylin Eosin	Dako CoverStainer	Agilent, Santa Clara, USA
Färbeautomat IHC	Dako Autostainer/Autostainer plus	Dako/Agilent, Santa Clara, USA
Gewebeentwässerungsautomat	Sakura Tissue-Tek VIP 5	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Kryostat	Leica CM1900	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kühlplatte	Medite TKF 22	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Laborwaage	Sartorius LC 4200	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus BX46	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph MR 3001 IKA RCT	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland
Objektträger-strecktisch	Medite OTS 40	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Paraffin Filtrierautomat	Medite PLC 18	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Paraffin- Einbettssystem	Medite TES 99	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
pH-Meter	WTW Series InoLab® pH720	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Reference® 0,5-	Eppendorf Vertrieb GmbH,

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
	10 µl/100-1000 µl	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Rotationsmikrotom	Hyrax M55	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland
Rüttler	Heidolph Unimax 2010	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
TMA-Stanze	TMAarrayer P/N 02110016	Pathology Devices, San Diego, USA
Wärme- und Trockenschrank	Heraeus Function Line UT6	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

Tabelle 7: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller/Lieferant	Bestellnummer
Deckgläser 24x50 mm	Knittel Glasbearbeitungs-GmbH, Braunschweig, Deutschland	VD12450Y1A.01
Edelstahlgießformen 10x10x5 mm	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	6401015
Einbettkassetten	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Eisenroth, Deutschland	053700
Färbeküvetten	VWR International, Darmstadt, Deutschland	631-9328
Färbeküvetten nach Hellendahl	VWR International, Darmstadt, Deutschland	631-9310
Färbeküvetten nach Hellendahl Erweiterung	VWR International, Darmstadt, Deutschland	631-9311
Latexhandschuhe Sempercare	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Deutschland	45041
Magnetrührstäbchen	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	9197550
Messzylinder 250 mL	VWR International, Darmstadt, Deutschland	612-1536
Messzylinder 1000 ml	VWR International, Darmstadt, Deutschland	612-1538
Mikrotomklingen	PFM Medical AG, Köln, Deutschland	207500003

Material	Hersteller/Lieferant	Bestellnummer
Objektträger 76x26 mm	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland	02 1102
Menzel Gläser 25x75x1.0mm	Superfrost Plus Menzel- Gläser, Thermo Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	J1810AMN2
Pinsel	Pelikan Vertriebsgesellschaft GmbH & Co. KG, Hannover, Deutschland	-
Pinzette, anatomisch, gerade 13 cm	Carl Martin GmbH, Solingen, Deutschland	79213
Pinzette, geriffelte Spitzen DUMONT Pinzette 24	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland	T520
Zellstoff	Kurt Müller GmbH, Pulheim-Brauweiler, Deutschland	849405

Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller/Lieferant	Bestellnummer
Aqua dest.	Medizintechnik, Universitätsmedizin Mainz	-
Dako Bluingbuffer	Dako, Santa Clara, USA	CS702
Dako Eosin	Dako, Santa Clara, USA	CS701
Dako Hämatoxylin	Dako, Santa Clara, USA	CS700
Dako REAL™ Hematoxylin	Dako, Santa Clara, USA	S2020
Entellan	VWR (Merck) International GmbH, Darmstadt, Deutschland	1079610100
EnVision™ FLEX + Rabbit (Linker)	Dako, Santa Clara, USA	K8006
EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, low pH, 50x	Dako, Santa Clara, USA	K8005
EnVison™ FLEX High pH	Dako, Santa Clara, USA	K8010
Ethanol 70%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland	-
Ethanol 96%	SAV Liquid Production GmbH,	-

Substanz	Hersteller/Lieferant	Bestellnummer
	Flintsbach am Inn, Deutschland	
Ethanol 99%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland	-
Eukitt®Quick-hardening mounting medium	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	03989
Histo-Clear II	Fa.national Diagnostics	HS-202
Monoclonal Mouse Antihuman p2, Clone SX118	Dako, Santa Clara, USA	M7202
Paraffin	Klinika Medical GmbH, Usingen, Deutschland	2501008
Protein Block Serum-free, ready-to-use (rtu)	Dako, Santa Clara, USA	X0909
Xylol	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland	-

Tabelle 9: Herstellung der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Schritt	Reagenz	Dauer (Minuten)	Dauer (Minuten)
1	Histo-Clear II	3:00	3:30
2	Histo-Clear II	3:00	3:30
3	Ethanol 96%	0:10	
4	Ethanol 96%	2:00	
5	Ethanol 70%	2:00	
6	Leitungswasser	1:00	
7	Dako Hämatoxylin	1:30	
8	Leitungswasser	1:00	
9	Dako Bluing Buffer	1:30	
10	Leitungswasser	1:30	
11	Ethanol 70 %	1:00	
12	Dako Eosin	1:00	
13	Ethanol 96 %	1:00	

14	Ethanol 99 %	1:00	
15	Ethanol 99 %	1:00	
16	Ethanol 99 %	1:00	
17	Histo-Clear II	1:00	

Tabelle 10: Paraffineinbettung

Schritt	Reagenz	Dauer (Minuten)
1	Formalin 4 %	60
2	Formalin 4 %	120
3	Ethanol 70 %	60
4	Ethanol 80 %	60
5	Ethanol 96 %	60
6	Ethanol 96 %	60
7	Ethanol 100 %	60
8	Ethanol 100 %	90
9	Xylol	60
10	Xylol	60
11	Paraffin	60
12	Paraffin	60
13	Paraffin	90

Tabelle 11: Antikörper

Antikörper	2. Antikörper	Klon/Hersteller	Verdünnung	Erwartete Färbung
CD-3	Rabbit	IR503, Dako, Santa Clara, USA	rtu	T-Zellen
CD-4	Mouse	Clone 4B12, IR649, Dako, Santa Clara, USA	rtu	T-Zellen
CD-8	Mouse	Clone C8/144B IR623, Dako, Santa	rtu	T-Zellen

		Clara, USA		
CD-56	Mouse	Clone 123C3, IR 628, Dako, Santa Clara, USA	rtu	Natürliche Killerzellen
CD68	Mouse	Clone PG-M1, Dako, Santa Clara, USA	rtu	Makrophagen
FOXP-3	Mouse	Clone 236A/E7 Abcam, Cambridge, UK	rtu	Regulatorische T-Zellen
N-Cadherin	Rabbit	(D4R1H) XP®, Cell Signaling, Danvers, USA	1:100	Tumorzellmembran
ZEB-1	Rabbit	NBP1-05987 Novus Biologicals, Minneapolis, USA	1:200	Nukleär in Tumorzellen

Tabelle 12: Software

Name	Herausgeber	Verweis
EndNoteX9	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA	
GraphPad Prism Version 9.3.1 for Mac	GraphPad Software, San Diego, California USA	www.graphpad.com
Microsoft Office	Microsoft D GmbH, Unterschleißheim, Deutschland	
PathoPro	Ifms GmbH, Saarbrücken, Deutschland	
QuPath: Open-source software for digital pathology and image analysis	Bankhead, P. et al. (2017)	https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben

3.2.1.1 Patientenauswahl

Die Erstellung des Patientenkollektivs erfolgte über das Laborinformationssystem des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz. Hierüber ist es möglich anhand bestimmter Suchbegriffe, Zugriff auf histopathologische Befunde von Patienten zu erhalten. Es wurden die Suchbegriffe „Pan?reas?ar?inom“, „C.25“, „C.25.?“, „Adeno?ar?inom Pan?reas“ und „Pan?reaskopf?ar?inom“ verwendet. In die Suche einbezogen wurden Patientendaten der Jahre 2007 bis einschließlich 2017. Weiteres Einschlusskriterium war die Universitätsmedizin Mainz als Ort für die operative Intervention der Patienten. Weitere Voraussetzung war das Vorhandensein einer ausreichenden Menge an Gewebe des jeweiligen Patienten im Archiv des pathologischen Institutes. Bei keinem Patienten wurden identifizierende Merkmale wie Name, Adresse oder ähnliche Angaben in den Analysen verwendet.

Aus den jeweils verfügbaren Daten erfolgte die histopathologische Charakterisierung des Kollektivs anhand folgender Merkmale: Geschlecht, Alter bei Diagnose/OP, Tumorlokalisierung, TNM-Stadium, UICC-Stadium, Grading und Resektionsstatus. Bei einem Teil der Patienten konnten zusätzlich Überlebenszeitdaten erhoben werden. Durch die Arbeitsgruppe von [REDACTED] der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, wurden uns die Daten zu Todeszeitpunkt oder letzter Kontaktaufnahme, die im Rahmen des Nachsorgeprogramms ermittelt wurden, überlassen.

3.2.2 Datenmanagement

Die Daten wurden doppelt pseudonymisiert/anonymisiert ausgewertet. Die Auswahl der histologischen Präparate erfolgte dann anhand der in der histopathologischen Beurteilung befindlichen H-Nummer bzw. Schnellschnitt-Nummer. Im nächsten Schritt wurde zur Anonymisierung der Daten jedem Patienten in der Tabelle eine Patientenidentifikationsnummer (ID) zugeordnet.

3.2.3 Probenauswahl und Annotation

Anhand der histopathologischen Befunde wurden repräsentative HE-gefärbte Schnitte des Tumors und der Tumorumgebung mikroskopisch hinsichtlich ihrer Eignung für die Anfertigung des Arrays analysiert.

Es erfolgte die Annotation des Tumorzentrums, der Tumorinvasionsfront (*Invasive Margin*) und des gesunden exokrinen Pankreasgewebes. Bei schwer abgrenzbarer Tumormorphologie wurden die Annotationen gemeinsam mit einem gastrointestinal (GI)-pathologischen Experten durchgeführt. Zu den jeweiligen Gewebeschnitten wurden die entsprechenden Gewebelöcke zur Anfertigung des Arrays sortiert. Es handelt sich hierbei um Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe.

Durch Anfertigung eines *Tissue-Microarrays* (TMA) lässt sich ein breites Spektrum immunhistochemischer Analysen gleichzeitig und an vergleichsweise geringen Gewebemengen durchführen. Dazu werden kleine Zylinder von Tumorgewebe aus dem Donorblock entnommen und mittels spezieller Stanzgeräte in vorher angefertigte Paraffinblöcke (Empfängerblöcke) eingesetzt (siehe Abbildung 9). Der Gewebeerlust am Donorblock ist gering und erlaubt so gegebenenfalls weitere notwendige, diagnostische Analysen für den Patienten (143). Ein vollständiger TMA-Block kann am Ende über 100 verschiedene Proben unterschiedlicher Tumoren, Tumorstadien oder Patienten enthalten. Da sich aus diesem mehrere hundert Schnitte anfertigen lassen, eröffnet sich die Möglichkeit, multiple Analysen, sei es via Immunhistochemie, FISH oder mRNA-Hybridisierungsmethoden, durchzuführen (143, 144).

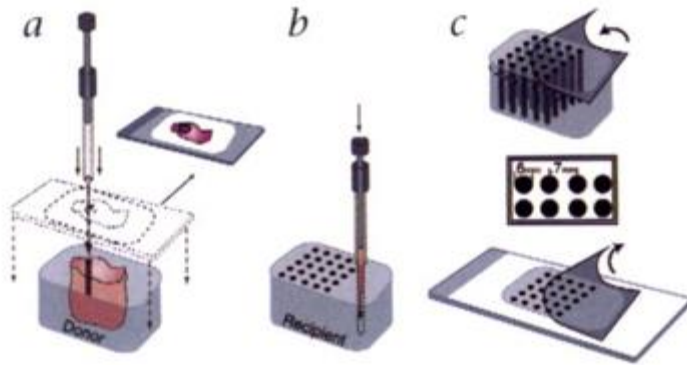


Abbildung 9: Anfertigung eines TMA modifiziert nach (144).

Ein weiterer Vorteil des Arrays ist die standardisierte Anordnung der Proben im Block gemäß einer Positionierung entlang einer x- und y-Achse nach dem Vorbild eines Koordinatensystems. Dies ermöglicht eine automatisierte Analyse der Färbungen mittels digitaler Bildanalyse-systeme (143).

Die Methode wurde erstmal im Jahr 1998 von Kononen et al. angewendet und seitdem kontinuierlich weiterentwickelt (145). Bedenken darüber, dass kleine Ausschnitte aus einer heterogenen Tumormasse einen relevanten Informationsverlust bedeuten könnten, wurden von Untersuchungen widerlegt. Essentiell bleibt die sorgfältige Auswahl repräsentativer Bereiche des Tumors für die zu stanzenen Proben (145, 146).

Die Schnittpräparate, der ausgewählten Patienten wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur TMA-Anfertigung untersucht. Dabei spielte vor allem die Größe des repräsentativen Tumorareals eine Rolle. Auf den Stanzen sollte möglichst wenig stromales Gewebe oder Nekrose enthalten sein. Zu Beginn wurde die Größe der Gewebe-Stanzen auf 1 mm festgelegt. Ebenfalls wurde die spätere Anordnung der Proben im TMA mittels eines Schemas bestimmt. Es wurde für jeden Patienten je ein Core aus dem Tumorzentrum und zwei Cores aus der Tumordinvasionsfront entnommen. Hierdurch sollte eine möglichst detaillierte Abbildung der Heterogenität des Tumors gewährleistet werden. Zusätzlich wurde von jedem Patienten je ein Core aus gesundem Pankreasgewebe entnommen. Die auf den ausgewählten Objektträgern zuvor markierten Bereiche wurden nun aus dem jeweiligen Donorblock ausgestanzt und gemäß dem Schema in den Empfängerblock übertragen. Um eine gleichmäßige Oberfläche und suffiziente Haftung der Gewebezylinder im Empfängerblock zu erreichen, wurde dieser anschließend für 24 Stunden bei 72 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach dem Stanzen wurden die Paraffinblöcke auf einem Objektträger im Wärmeschranke für 24 Stunden gelagert, um eine gleichmäßige Oberfläche der Paraffinblöcke zu erhalten. Nach vorangegangener Kühlung erfolgte anschließend das Schneiden der TMAs auf dem Rotationsmikrotom in 2 μm dünne Schnittpräparate. Diese wurden sofort auf Objektträger aufgezogen und zur Beseitigung von Luftpfehlüssen auf dem Objektträgerstrecktisch angetrocknet. Anschließend folgte die Trocknung bei 37 °C über Nacht. Nach der Trocknung kann eine Lagerung der TMA-Objektträger bei 4 °C über längere Zeit erfolgen. Zusätzlich wurde von jedem TMA-Block jeweils ein Schnitt für die H.E. Färbung entnommen.

3.2.4 Immunhistochemie

3.2.4.1 Vorwort zu immunhistochemischen Färbungen

Grundlegendes Prinzip der Immunhistochemie ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Verschiedene Zellen, weisen spezifische Antigene, die auch Epitope genannt werden, auf. Wird Gewebe mit einem ausgewählten Antikörper behandelt, so kommt es zu einer spezifischen Bindung zwischen diesen Epitopen und dem zugefügten Antikörper.

Zur Sichtbarmachung des jeweiligen Epitops gibt es verschiedene Methoden. In den in diesem Projekt durchgeführten Färbungen wurde die zweistufige, auch indirekt genannte, Methode angewendet. Mit dieser Methode lässt sich eine höhere Signalintensität erzeugen. So kann auch bei nur geringen Mengen des Antigens durch die Signalverstärkung mittels Sekundärantikörper ein präziser Nachweis erfolgen. Der Antigen-Nachweis in den durchgeführten Färbungen erfolgte über die Polymer-Konjugat-Methode (Abbildung 10). Zum Gewebe wird ein Primärantikörper hinzugegeben, welcher mit dem zu detektierenden Antigen einen Antigen-Antikörper Komplex bildet. Anschließend erfolgte die Zugabe eines Polymers, welches aus dem Sekundärantikörper und Peroxidase-Enzymen bestand. Die Sichtbarmachung erfolgte über die Zugabe eines DAB-Chromogens, welches im Rahmen einer Enzym-Substrat Reaktion mit den Peroxidasen einen Farbumschlag erzeugte (147-150).

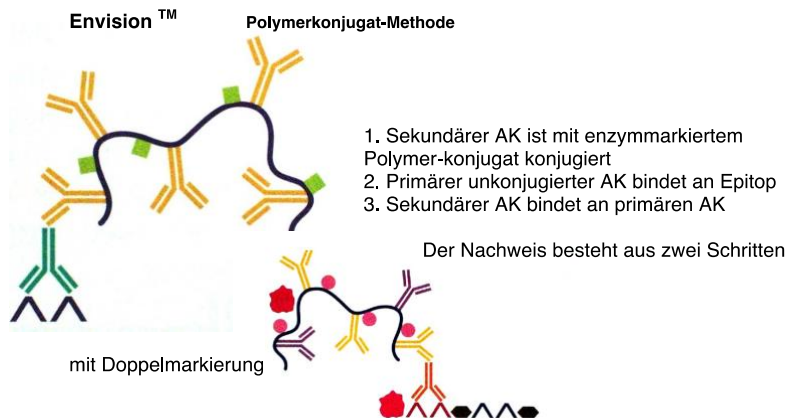


Abbildung 10: Polymerkonjugat-Methode aus (150).

3.2.4.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Um das Antigen für den Antikörper zugänglich zu machen, ist eine entsprechende Vorbehandlung notwendig. Zu Beginn wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten bei 60 % im Wärmeschrank entparaffiniert. Zur Entfernung des restlichen Paraffins wurden die Schnitte dreimal für je 5 Minuten in Xylol getaucht. Die Rehydrierung erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe; zweimaliges Tauchen für je 3 Minuten in 100 %iges Ethanol, in 96 %iges Ethanol, in 70 %iges Ethanol und abschließend in 50 %iges Ethanol. Anschließend folgte ein Abspülen unter Leitungswasser für etwa 3 Minuten. Dem schloss sich die Vorbehandlung im Dampfgerar an. Hierin befand sich ein auf 94 °C erhitzter TRIS-Puffer (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution Buffer) und Aqua dest zur Epitopdemaskierung. Je nach verwendetem Primärantikörper (siehe Tabelle 11) erfolgte die Vorbehandlung bei einem pH-Wert von 6,1 für 25 Minuten oder bei einem pH-Wert von 9 für 20 Minuten. Zur Reduktion der Oberflächenspannung und letztlich besseren Penetrierbarkeit der Antikörper wurden die Objektträger nach vorangegangenem Abkühlen unter fließendem Wasser einmalig über 5 Minuten in EnVision™ FLEX Wash-Buffer gespült. Anschließend kühlten die Schnitte unter fließendem Wasser für 7 Minuten ab und wurden dann für weitere 5 Minuten in den DAKO-Waschpuffer getaucht. Dies dient der Reduktion der Oberflächenspannung und der besseren Zugänglichkeit der Antigenstrukturen für den Antikörper.

Es folgte die Programmierung des *DAKO Cytomation Autostainers* und das Einsetzen der Objektträger nach vorgegebenem Schema in den Autostainer. Die Detektion der Antikörper erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe des Enzyms Meerrettich-Peroxidase (enthalten im Flex Envision™ Kit). Der endgültige Nachweis des Zielantigens und die Signalverstärkung mittels Sekundärantikörper erfolgten durch das EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen. Als letztes wurde im Autostainer eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin mit EnVision™ FLEX Hämatoxylin zur Sichtbarmachung der Zellkerne vorgenommen. Nach dem Entnehmen aus dem Autostainer erfolgte die Spülung mit

Leitungswasser, was durch die herbeigeführte pH-Erhöhung zum Farbumschlag nach blau-violett führt. Dem folgten erneut Bäder in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol je zweimal 2 Minuten, Xylol je dreimal 3 Minuten), um den Gewebeschnitten Wasser zu entziehen und eine Konservierung möglich zu machen. Im letzten Schritt wurden die Schnitte in Xylol getaucht und mit Entellan auf Objektträgern fixiert. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.4.3 Übersicht und Erläuterung der immunhistochemischen Marker

CD steht als Abkürzung für *Cluster of differentiation (CD)*. Es stellt ein Ordnungssystem für immunologische Oberflächenmarker dar. Die Oberflächenmarker sind als Glykoproteine in der Zellmembran verankert und dienen der Zellerkennung, Signaltransduktion oder fungieren als Enzyme (151).

1. CD3

Alle T-Lymphozyten tragen im menschlichen Körper das Oberflächenantigen CD3. Trifft ein Major Histocompatibility Complex-Molekül (MHC) auf einen T-Lymphozyten, verbindet sich das MHC mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR)-CD3-Komplex. CD3 vermittelt die weitere Signalweitergabe und initiiert so die Immunantwort (152).

2. CD4

CD4 kommt auf den Membranen von Monozyten, Makrophagen, sowie T-Helferzellen vor. Zusammen mit dem TCR findet die Erkennung an MHC-II gekoppelter Antigene statt. T-Helferzellen (Th) haben vielfältige Aufgaben. Th1-Zellen spielen eine Rolle bei der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, Th2-Zellen sind an der humoralen Immunantwort beteiligt. Daneben existieren noch regulatorische T-Zellen (Treg), welche die Antwort der übrigen T-Zellen regulieren und bremsen können (84).

3. CD8

CD8 befindet sich auf zytotoxischen T-Zellen, zum Teil auch auf regulatorischen T-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Thymozyten und dendritischen Zellen. Zusammen mit dem TCR findet die Erkennung an MHC-I gebundener Antigene statt. CD8+ NK-Zellen können Tumorzellen zerstören (84).

4. Forkhead-Box-Protein P3 (FOXP3)

FOXP3 ist ein intrazellulärer Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression von Genen für Proteine, die an der Differenzierung regulatorischer T-Zellen (Treg) beteiligt sind (84).

5. CD68

CD68 ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche von Makrophagen und Monozyten. Auch Tumorzellen können CD68 exprimieren, um so der Immunantwort des Körpers zu entgehen (132).

6. Zinc-finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1)

ZEB1 ist ein zur ZEB-Familie gehörender Transkriptionsfaktor. Er gilt als einer der Induktoren der Epithelial-mesenchymalen Transition. Zudem hat er Bedeutung bei der Regulation von Stammzellen und bei der Beeinflussung des Zellzyklus (153).

7. N-Cadherin (Cadherin 2 oder neuronales Cadherin)

N-Cadherin zählt zur Gruppe der Cadherine. Das sind transmembranöse Glykoproteine, die an Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind (154). Bei der Epithelial-mesenchymalen Transition in Tumorzellen erfolgt ein sogenannter *Switch* von E-

Cadherin zu N-Cadherin, der dafür sorgt, dass sich die Zellen aus dem Epithelverband lösen und migrieren können (155).

8. CD56 (Neural cell adhesion molecule 1, NCAM)

CD56 befindet sich hauptsächlich auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Daneben findet man es auch auf Subgruppen von T-Zellen, dendritischen Zellen oder Monozyten. NK-Zellen gehören dem angeborenen Immunsystem an und sind in der Lage virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen anzugreifen (156).

3.2.5 Digitale Bildanalyse

Tabelle 13: Geräte und Software der digitalen Bildanalyse

Gerät/Software	Name	Hersteller
Whole-Slide Imaging Scanner	NanoZoomer 2.0-HT C9600series	Hamamatsu Photonics, Japan
Viewer Software	NDP.scan U1007 4-01	Hamamatsu Photonics, Japan
Viewer Software	NDP.view2 U12388-01	Hamamatsu Photonics, Japan
Digitales Bildanalyseprogramm	QuPath: Open-source software for digital pathology and image analysis	Bankhead, P. et al. (2017) Scientific Reports https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5

Es ist möglich, histopathologische Schnittpräparate mittels *Whole-Slide-Scanner* zu digitalisieren (157). Dies macht sie einer digitalen Bildanalyse zugänglich, welche eine Möglichkeit darstellt, effiziente, objektive und reproduzierbare Analysen durchzuführen. Dieses Qualitätsmerkmal ist vor allem bedeutsam, wenn Erkenntnisse in Korrelation zu Überlebensdaten gesetzt werden oder klinische Entscheidungspfade darauf aufgebaut werden sollen (158).

Im vorliegenden Projekt wurde das Open-Source Programm *QuPath* (158) zur digitalen Bildanalyse verwendet. Nach Digitalisierung der TMA-Slides mittels Scanner wurden die Bilddaten in eine Ordnerstruktur in QuPath geladen. Im Anschluss erfolgte ein automatisches *TMA-Dearraying*. Hierbei können beschädigte Gewebereiche oder Bereiche, die nicht in die Analysen einfließen sollen, exkludiert werden. Im nächsten Schritt erfolgte eine, durch das Programm automatisierte Erkennung und Annotierung von Gewebe innerhalb der markierten Cores. Die sogenannte *simple tissue detection*. Dem folgte die Programmierung der *positive cell detection*. Diese ermöglicht, dass gefärbte Zellen auch als solche erkannt werden und nimmt zusätzlich eine Eingruppierung nach Färbintensität (1+, 2+, 3+) vor. Die genaue Einstellung der jeweiligen Parameter zur *positive cell detection* erfolgt für jeden Marker durch den Benutzer individuell. Anschließend wurden alle Cores eines TMAs ausgewählt und der entsprechende Analyse-Algorithmus auf diese angewendet. Ergebnis ist sowohl eine grafische als auch numerische Ausgabe der Ergebnisse. Positive Zellen werden nach Abstufung der Farbtintensität rot, orange und gelb dargestellt. Zellen, in denen der Marker nicht angefärbt werden konnte werden in blau dargestellt. Die Daten der numerischen Auswertung lassen sich in Form einer CSV-Datei exportieren und für weiterführende Analysen verwenden. Exemplarisch sind in Abbildung 11 die einzelnen Schritte eines durchgeführten Workflows der Software dargestellt.

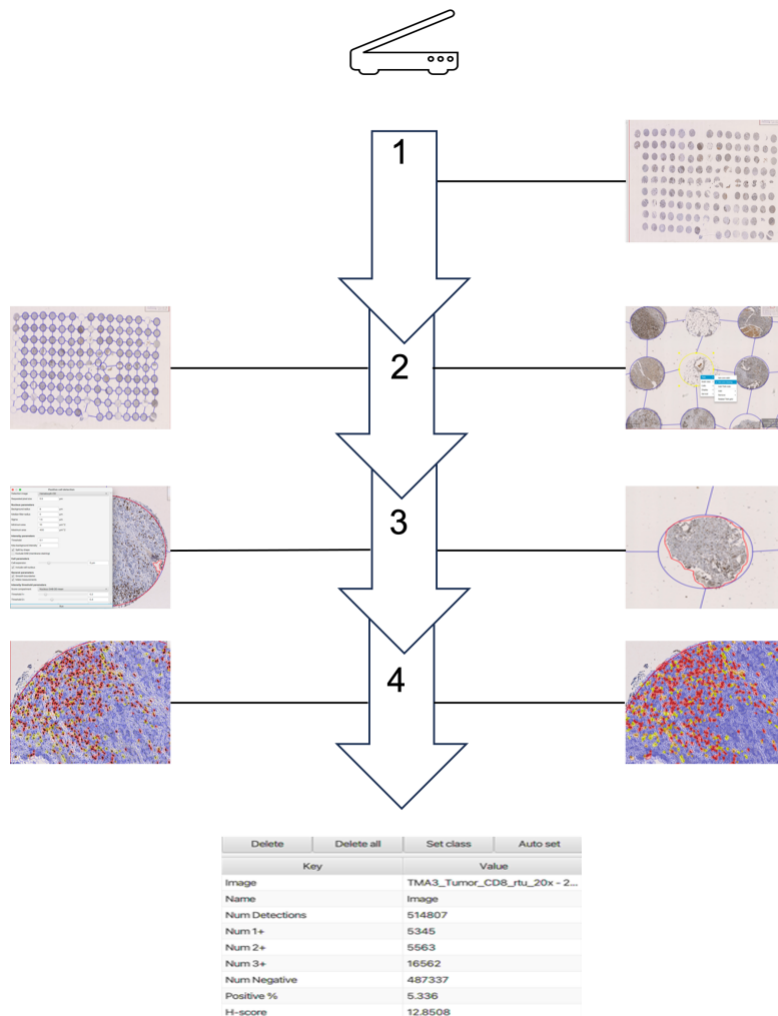


Abbildung 11: Workflow einer digitalen Bildanalyse mit QuPath.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen der vorliegenden Arbeit wurden mit der Software *GraphPad Prism 9* durchgeführt. Darüber hinaus konnte die statistische Beratung des Instituts für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universitätsmedizin Mainz in Anspruch genommen werden.

Die Ergebnisse wurden jeweils auf statistische Signifikanz auf einem Signifikanzniveau von 5 % geprüft.

Ein Problem des multiplen Testens kann die Zunahme der Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art sein. Ein Fehler 1. Art beschreibt die Situation, dass die Nullhypothese fälschlicherweise verworfen wird. Um dies beim multiplen Testen zu verhindern kann eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt werden. Hiermit werden die p -Werte entsprechend angepasst. Die Anwendung wird in der Literatur kontrovers diskutiert (159). In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Anwendung einer Bonferroni-Korrektur verzichtet. Es gilt für die Auswertung und Diskussion der Ergebnisse zu bedenken, dass es sich bei der Arbeit um eine rein explorative Darstellung handelt und für den statistischen Beleg von Zusammenhängen entsprechend größer angelegte Studien durchgeführt werden müssten.

In der automatisierten Bildauswertung durch *QuPath* wurde für CD3, CD4, CD8, CD68 und FOXP3 der Prozentwert positiver Zellen bezogen auf alle detektierten Zellen des jeweiligen Cores ermittelt. Aus den Werten von je drei Cores eines Patienten wurde dann der Mittelwert gebildet. So ging pro Tumor und Marker ein relevanter Wert in die Auswertung ein. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Expressionslevel der immunhistochemischen Marker CD3, CD4, CD8, CD68 und FOXP3 anschließend in

die Kategorien „low“ und „high“ unterteilt. Die Bestimmung des notwendigen Cut-off-Wertes erfolgte mit Hilfe des *Cut-off-Finders* von Budczies et al. (160). Die jeweiligen Cut-off-Werte zeigt Tabelle 14.

Bei den Färbungen von N-Cadherin, CD56 und ZEB konnte in der angefertigten Arbeit, anders als bei den oben beschriebenen Färbungen, keine zuverlässige Detektion positiver Färbungen im Tumor oder dem Stroma mittels digitaler Bildanalyse erreicht werden. Somit konnte auch die Anzahl positiver Zellen nicht automatisiert ausgezählt werden. Demnach erfolgte für diese Färbungen eine semiquantitative-manuelle Auswertung. Es wurde für das Expressionsniveau in den jeweiligen Cores eine Kategorie vergeben. „negative“ Cores enthielten keine positiv gefärbten Zellen. Cores der Kategorie „mild“ enthalten vereinzelte positive Zellen, Cores der Kategorie „moderate“ wenige und Cores der Kategorie „high“ viele positive Zellen. Anschließend wurde der Mittelwert aus drei Cores der semiquantitativen Auswertung ermittelt (siehe Tabelle 14 und 15).

Für die Erstellung der deskriptiven Statistik erfolgte die Charakterisierung des Kollektivs anhand von Variablen, die vor allem für die Prognose von Bedeutung sind. Dazu gehören das Geschlecht, das Alter, das TNM-Stadium, Grading und der Resektionsstatus. Hierzu wurden absolute und relative Häufigkeiten angegeben. Alle stetigen Variablen wurden beschrieben durch Mittelwert und Standardabweichung (SD). Zudem erfolgte die Anfertigung von Histogrammen zur Darstellung der Häufigkeitsverteilung und die Darstellung von Lagemaßen in Form von Boxplots für die Darstellung der Verteilung der Marker. Die Box erstreckt sich dabei von der 25 % bis zu 75 % Perzentile. Innerhalb der Box befinden sich also 50 % aller Werte. Der Interquartilsabstand ist durch die Länge der Box gegeben und zeigt die Streuung der Werte. Die beiden „Whisker“ zeigen Minimum und Maximum. Überschreiten diese Werte die 1,5-fache Länge der Box, so werden sie in Form von Punkten als sogenannte Ausreißer dargestellt. Als horizontaler Strich innerhalb der Box zeigt sich der Median (161).

Zur Berechnung der Überlebenszeitanalysen wurde das Ende des Beobachtungszeitraumes für jeden Patienten individuell festgelegt. Trat im Beobachtungszeitraum der Tod ein, so wurde das Todesdatum eingesetzt. Ansonsten wurde das Datum des letzten ermittelbaren Kontakts zum Patienten verwendet. Anfangsdatum war bei allen Patienten das OP-/Diagnosedatum. Für die verschiedenen Gruppen wurden vergleichende Überlebenszeitkurven nach der Kaplan-Meier Methode erstellt. Der Vergleich von Subgruppen erfolgte mittels des Log-Rank Tests.

4 Ergebnisse

4.1 Cut-off Werte und Kategorien der Markeranalysen

Tabelle 14: Cut-off-Werte der Immunzell-Marker

Marker	„low“ bezogen auf %-positive Zellen	„high“ bezogen auf %-positive Zellen
CD3	≤ 2.63 %	> 2.63 %
CD4	≤ 8.83 %	> 8.83 %
CD8	≤ 6.66 %	> 6.66 %
CD68	≤ 26.76 %	> 26.76 %
FOXP3	≤ 1.67 %	> 1.67 %

Tabelle 15: Kategorien der semiquantitativen Analyse von ZEB1, CD56 und N-Cadherin

Anzahl positive Zellen	Kategorie
keine	Negative (0)
vereinzelt	Mild (1)
wenige	Moderate (2)
viele	High (3)

4.2 Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs

Tabelle 16: Tabellarische Übersicht des Kollektivs

	Absolut	Relativ (%)
Gesamt	n = 126	
Geschlecht		
Männlich	72	57,14 %
Weiblich	54	42,86 %
Alter (Jahre)		
<50	8	6,35 %
50-59	24	19,05 %
60-69	35	27,78 %
70-79	54	42,86 %
>80	5	3,97 %
T-Stadium		
pT1	4	3,17 %
pT2	6	4,76 %
pT3	111	88,10 %
pT4	5	3,97 %
Nodalstatus *		
N0	38	30,20 %
N1	87	69,00 %
Nx	1	0,8 %
Metastasen		
Mx	39	30,95 %
M0	80	63,49 %
M1	7	5,56 %
Grading		
G1	4	3,17 %
G2	74	58,73 %
G3	48	38,10 %
Resektionsstatus		
R0	99	78,60 %
R1	26	20,60 %
Rx	1	0,80 %
UICC-Klassifikation		
IA	2	1,59 %
IB	2	1,59 %
IIA	28	22,22 %
IIB	83	65,87 %
III	2	1,59 %
IV	9	7,14 %

Das Kollektiv setzte sich zusammen aus 72 (57 %) Männern und 54 (43 %) Frauen. Das mittlere Alter der Patienten lag bei etwa 67 Jahren (Mittelwert 66,56; +/- 9,83 Jahre; Median 69 Jahre). Der jüngste Patient war zum Diagnosezeitpunkt 42 Jahre alt, der älteste Patient 85 Jahre alt. Abbildung 12 zeigt die Altersverteilung im Kollektiv. Zur besseren Darstellbarkeit wurden die Patienten in Altersgruppen unterteilt. Es wird deutlich, dass die meisten Patienten bei Diagnosestellung ein Alter von über 60 Jahren erreicht haben, die Streuung der Altersbereiche sich allerdings über einen breiten Bereich erstreckte.

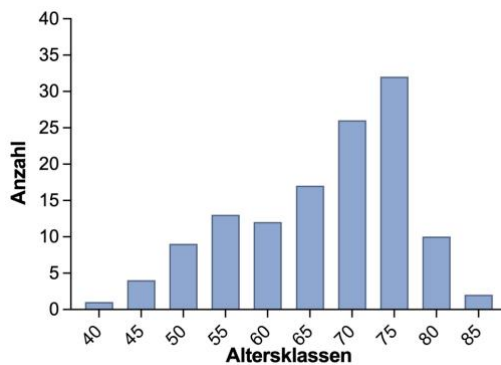


Abbildung 12: Histogramm der Altersverteilung.

Abbildung 13 stellt die Verteilung der Tumorlokalisation im Kollektiv dar. Bei 120 Patienten fanden sich im histopathologischen Befund Angaben zur Lokalisation. Mit einem Anteil von über 85 % (n = 103) befand sich die Mehrheit aller Adenokarzinome des Kollektivs im Bereich des Pankreaskopfes, gefolgt vom Pankreasschwanz mit etwa 6,7 % (n = 8). In etwa 4 % (n = 5) der Fälle war der Tumor im Pankreaskorpus lokalisiert. Bei einem geringen Anteil der Patienten (3,33 %, n = 4) verteilte sich der Tumor an mehreren Stellen des Organs.

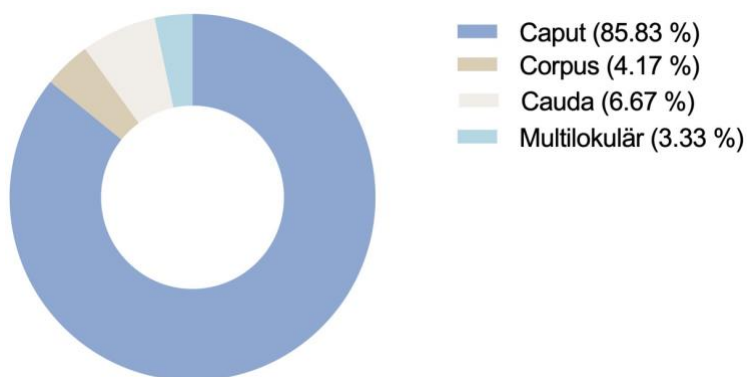


Abbildung 13: Prozentuale Verteilung der Tumorlokalisation.

Wie in Abbildung 14 gezeigt, konnten 4 Proben (3,17 %) einem T1-Stadium zugeordnet werden, 6 Proben (4,76 %) einem T2-Stadium, 111 Proben (88,10 %) einem T3-Stadium und 5 Proben (3,97 %) einem T4-Stadium. 38 Proben (30,2 %) wiesen keinen Befall der Lymphknoten (N0) auf. Bei 87 Patienten (69 %) war es bereits zum Befall regionaler Lymphknoten gekommen (N1). Bei einem Patienten (0,8%) lagen keine Angaben zum Nodalstatus vor. Anzumerken gilt an dieser Stelle die seit 2017 gültige Veränderung der TNM-Klassifikation für das Pankreaskarzinom. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde beim Nodalstatus in vorhandene oder nicht vorhandene

Lymphknotenmetastasen unterschieden. Seit 2017 wird zusätzlich zwischen einem N1 (1-3 befallene Lymphknoten) und einem N2-Status (> 4 befallene Lymphknoten) unterschieden. Die Datensets der Patienten stammen hauptsächlich aus den Jahren vor 2017 und sind der 7. Auflage entsprechend klassifiziert.

Eine Fernmetastasierung (M1) wurde bei 7 (5,56 %) Patienten nachgewiesen, 80 (63,49 %) Patienten hatten zum Diagnosezeitpunkt keine nachweisbaren Fernmetastasen. Bei 39 (30,95 %) Patienten konnte im histopathologischen Befund keine Aussage zur Metastasierung getroffen werden (Mx).

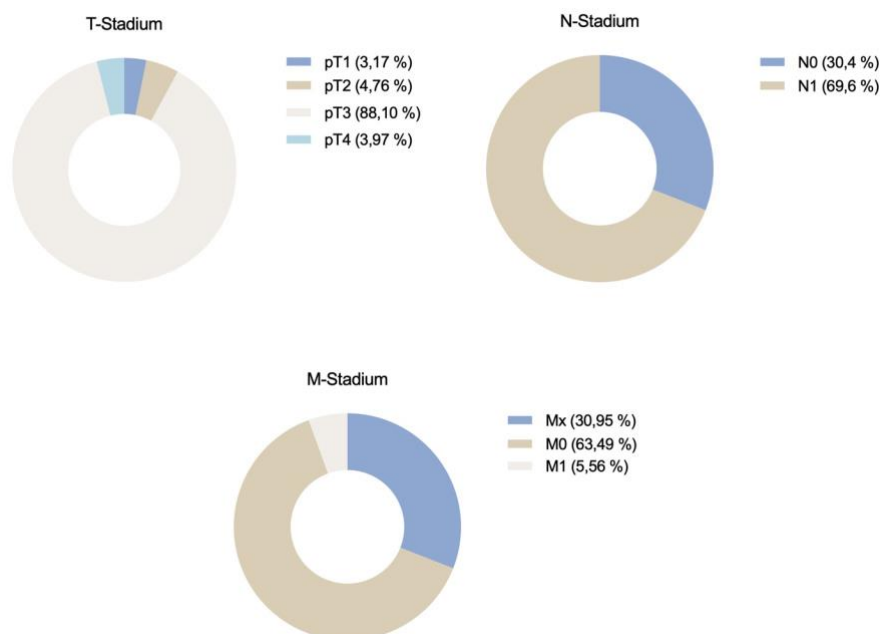


Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der TNM-Stadien.

Bei 4 Patienten (3,17 %) lag ein gut differenzierter Tumor (G1) vor. 74 Patienten (58,73 %) hatten einen mäßig differenzierten Tumor (G2) und 48 (38,10 %) Patienten präsentierten Tumoren mit schlecht differenzierten Zellen (G3).

In Bezug auf die Tumorfreiheit des Resektionsrandes lag bei 99 (78,6 %) Fällen ein R0-Status vor; es fanden sich also weder makro- noch mikroskopische Tumorresiduen am Resektionsrand. 26 Patienten (20,6 %) zeigten makroskopische Residuen am Resektionsrand (R1). In einem Fall (0,8 %) fehlte die Angabe zum Resektionsstatus.



Abbildung 15: Prozentuale Verteilung von Grading und Resektionsstatus.

Bei der Verteilung der UICC-Stadien (Abbildung 16) zeigte sich, dass die Minderheit der Patienten (n = 2; 1,59 %) den Stadien UICC IA und IB zuzuordnen waren, was bedeutet, dass die Tumoren ein T1- oder T2-Stadium aufwiesen und keine Lymphknoten- oder Fernmetastasierung vorlag. 28 Patienten befanden sich zum Diagnosezeitpunkt im Stadium IIA (22,22 %). Die größte Patientengruppe (83 Patienten; 65,87 %) befand sich in Stadium IIB. Hier war es bereits zur Lymphknotenmetastasierung gekommen. Zwei Patienten (1,59 %) konnte das Stadium III und somit eine T4-Klassifikation, sowie ein N0- oder N1-Stadium zugeordnet werden. Das UICC-Stadium IV, entsprechend einer stattgehabten Fernmetastasierung, lag bei 9 Patienten (7,14 %) vor.

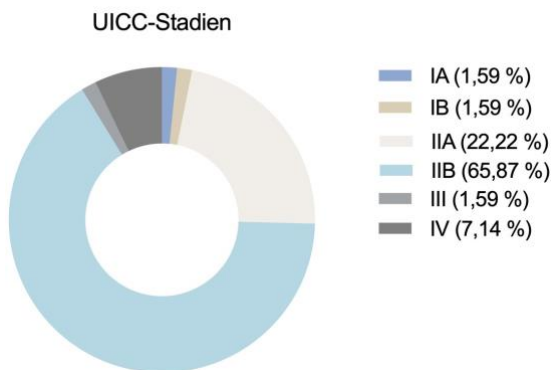


Abbildung 16: Verteilung der UICC-Stadien.

Von 126 Patienten standen Daten zum klinischen Verlauf nach der Operation zur Verfügung. In Abbildung 17 ist das Gesamtüberleben des Kollektivs dargestellt. Als Anfangspunkt galt der Punkt des Probeneingangs, respektive das Operationsdatum. Endpunkt war das Sterbedatum der Patienten oder das Datum des letzten Kontakts zum Patienten. Der Tod wurde als Ereignis gewertet, der letzte Kontakt zum Patienten als Zensierung. Während des Beobachtungszeitraums trat 99-mal das Ereignis Tod ein. Bei 27 Patienten kam es zur Zensierung. Die Dauer des Überlebens reichte von 0 Monaten bis 121 Monaten. Neun Patienten starben innerhalb der ersten 30 Tage nach Operation. 10 Personen lebten noch 5 Jahre nach Operation, eine Person überlebte 10 Jahre nach Operation. Das mediane Überleben der Kohorte lag bei 17 Monaten. Nach 5 Jahren lebten noch 16,1 % (absolute 5-Jahres-Überlebensrate) der Kohorte, nach 10 Jahren 14,1 % (absolute 10-Jahres-Überlebensrate).

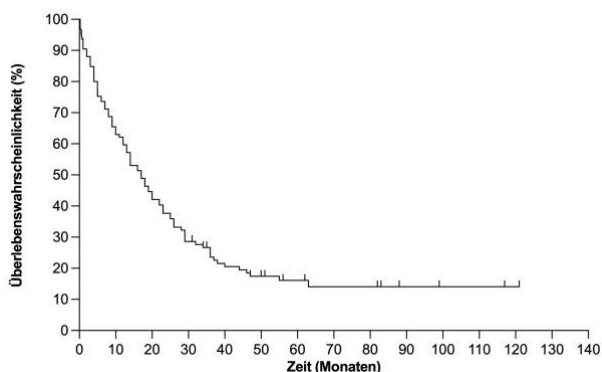


Abbildung 17: Gesamtüberleben der PDAC-Kohorte von 2007-2017.

4.3 Assoziation von klinisch-pathologischen Merkmalen und Gesamtüberleben

4.3.1 Assoziation von Geschlecht und Alter und Gesamtüberleben

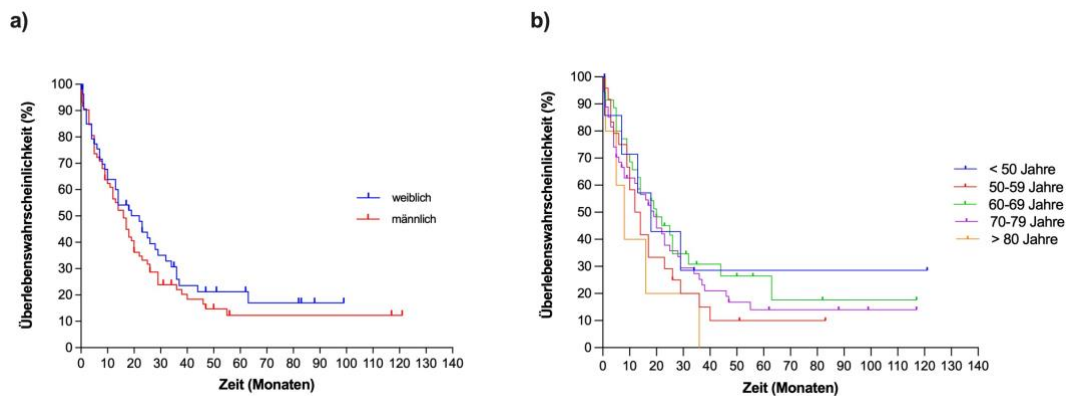


Abbildung 18: Gesamtüberleben nach Geschlecht und Altersgruppen.

Bei Frauen lag das mediane Gesamtüberleben bei 22 Monaten, bei Männern bei 16 Monaten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte sich im Log-Rank Test nicht ($p = 0.32$).

Hinsichtlich des Alters hatte die Gruppe der Patienten mit einem Alter von unter 50 Jahren ein medianes Überleben von 18 Monaten, die Gruppe von 50-59 Jahren überlebte im Median 13 Monate, bei den Personen von 60-69 Jahren waren es 20 Monate. Patienten im Alter von 70-79 Jahren hatten ein medianes Überleben von 19 Monaten und am kürzesten überlebten Patienten mit einem Alter von über 80 Jahren (8 Monate im Median (Abbildung 18 a)). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Log-Rank-Test zeigte sich nicht ($p = 0.42$). Grafisch wird dennoch deutlich, dass vor allem Patienten der jüngsten Gruppe einen Überlebensvorteil gegenüber solchen der ältesten Gruppe hatten (Abbildung 18 b)).

4.3.2 Assoziation von TNM-Stadium und Gesamtüberleben

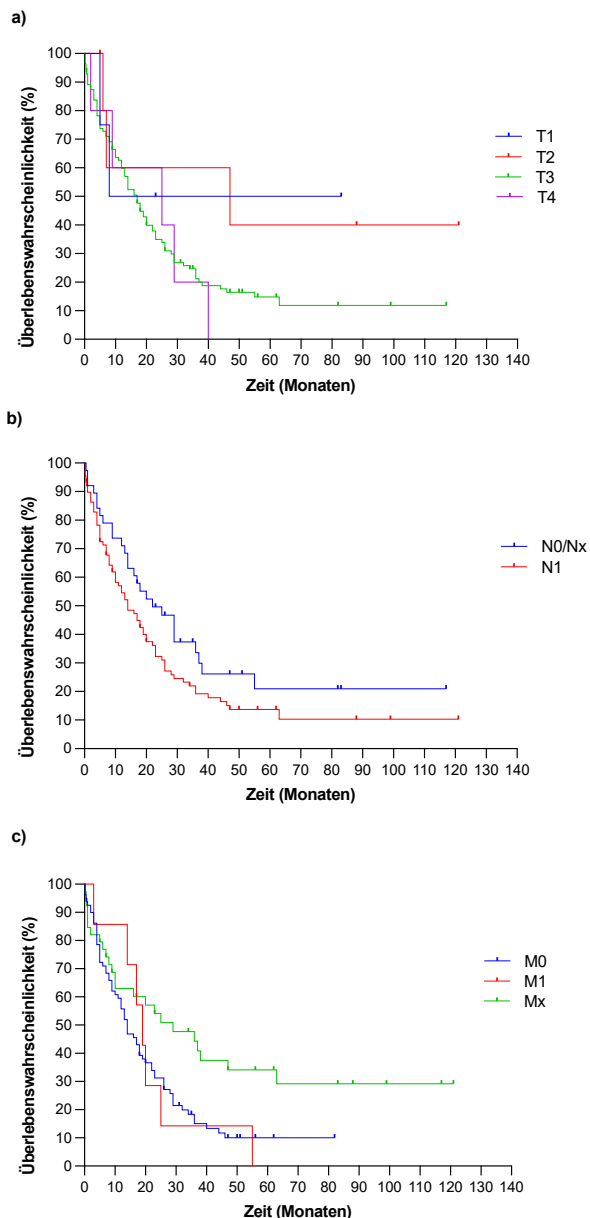


Abbildung 19: Gesamtüberleben nach TNM-Stadium.

Im Stadium T1 lag das mediane Überleben bei 45,5 Monaten, im Stadium T2 bei 47 Monaten. Im Stadium T3, in welchem sich die meisten Patienten der Kohorte befanden lag ein medianes Überleben von 17 Monaten vor: Im Stadium T4 war es bei 25 Monaten. Der Log-Rank-Test erbrachte keine Signifikanz ($p = 0.40$) hinsichtlich eines Überlebensvorteils zwischen den vier Gruppen. Es lässt sich dennoch grafisch ablesen, dass Patienten in den Stadien T1 und T2 länger lebten also solche in Stadium T3 und T4 (Abbildung 19 a)).

Patienten, deren Lymphknoten nicht befallen waren (N0), überlebten im Median 22 Monate ab Diagnosezeitpunkt. Patienten mit Lymphknotenmetastasen wiesen hingegen ein medianes Überleben von 14 Monaten auf. Dies deutet auf einen Überlebensvorteil bei fehlender Lymphknoteninfiltration hin (Abbildung 19 b)). Im Log-Rank-Test zeigte sich jedoch keine Signifikanz ($p = 0.08$).

Beim Vergleich der Überlebenszeitdaten im Hinblick auf eine Fernmetastasierung hatten Patienten, bei denen keine Aussage über eine Metastasierung getroffen wurde (Mx) ein medianes Überleben von 29 Monaten. Im Gegensatz dazu überlebten

Patienten mit fehlender Metastasierung (M0) im Median 14 Monate. Patienten mit stattgehabter Fernmetastasierung überlebten 19 Monate im Median. In der Gruppe mit Fernmetastasierung verstarben alle Patienten (n = 7) innerhalb des Beobachtungszeitraums. Mit einem p-Wert von 0.03 unterschieden sich die Subpopulationen signifikant im Überleben (Abbildung 19 c)).

4.3.3 Assoziation von Grading, Resektionsstatus und Gesamtüberleben

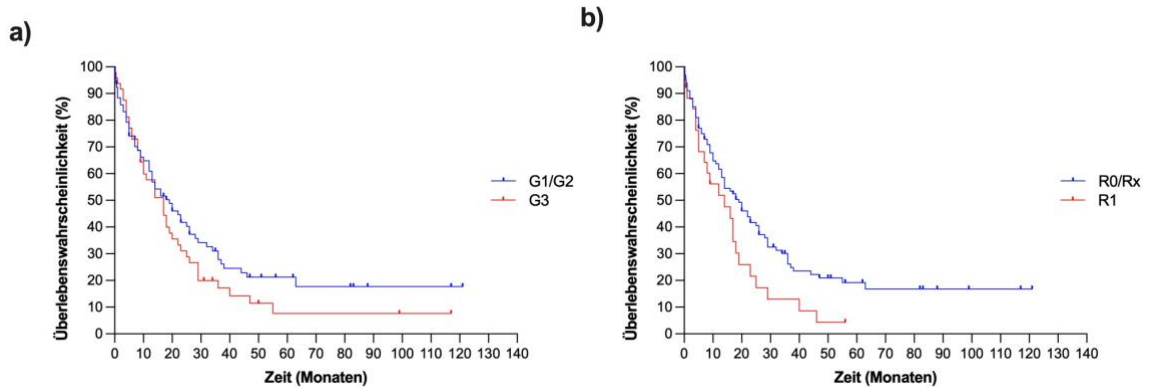


Abbildung 20: Gesamtüberleben nach Grading und Resektionsstatus.

Patienten mit Tumoren von guter und mäßiger Differenzierung (G1 und G2) lebten im Median 19 Monate. Solche mit schlecht differenzierten Tumoren hingegen 17 Monate. Der Log-Rank-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (p = 0.21). Optisch (Abbildung 20 a)) lässt sich aber erkennen, dass Patienten mit G1 und G2-Tumoren ein tendenziell längeres Überleben gegenüber solchen mit schlecht differenzierten (G3) Tumoren hatten.

Patienten, bei denen der Resektionsrand keine Tumorreste aufwies (R0 = 19 Monate im Median) hatten im Vergleich zu denen mit mikroskopischen Tumorresten (R1 = 14 Monate im Median) ein um 5 Monate längeres medianes Überleben (Abbildung 19 b)). Bei einem Patienten wurde keine Aussage zum Resektionsrand getroffen. Auch im Log-Rank-Test zeichnete sich mit einem p-Wert von 0.042 ein statistisch signifikanter Unterschied der beiden Gruppen ab.

4.3.4 Assoziation von UICC-Stadium und Gesamtüberleben

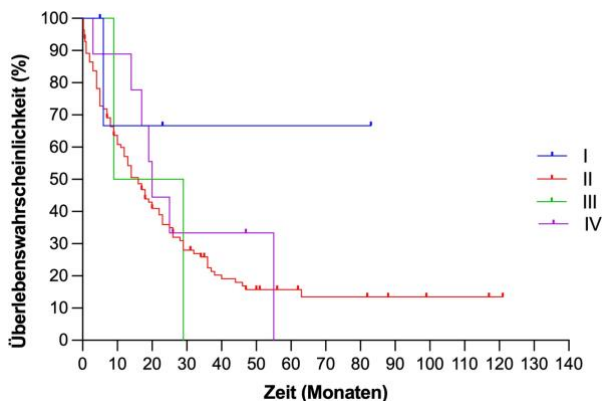


Abbildung 21: Gesamtüberleben nach UICC-Stadium.

Für das UICC-Stadium I konnte kein medianes Gesamtüberleben berechnet werden. (Abbildung 21). Lediglich vier Patienten erfüllten die Kriterien für das Stadium I. Drei dieser Patienten verstarben, ein Patient wurde zensiert. Es lagen in dieser Gruppe somit nicht ausreichend Daten vor, um eine verlässliche Überlebenswahrscheinlichkeit zu berechnen. Die Gruppe konnte ausschließlich grafisch bewertet werden. Im Stadium III befanden sich die meisten Patienten des Kollektivs. Hier lag das mediane Überleben bei 16 Monaten, im Stadium II bei 19 Monaten und im Stadium IV bei 20 Monaten. Statistisch ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen darstellen ($p = 0.49$).

4.4 Qualitative Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

4.4.1 Färbungen der tumorinfiltrierenden Immunzellen

4.4.1.1 CD3+ Zellen

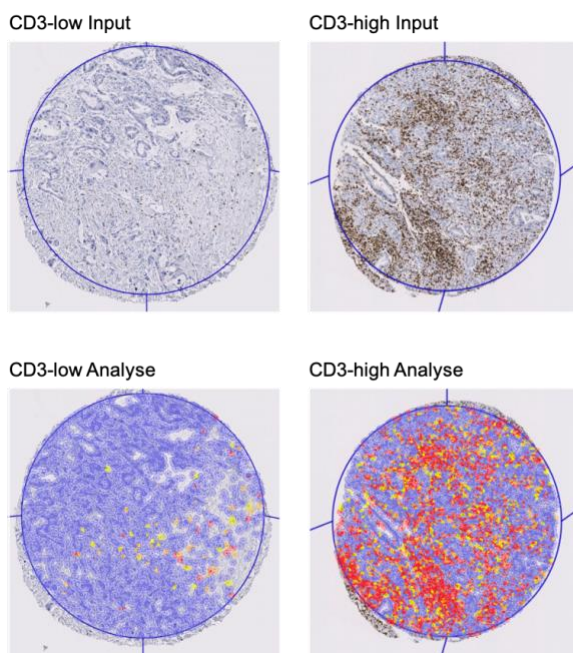


Abbildung 22: Exemplarische Darstellung der CD3-Färbung am PDAC.

Abbildung 22 zeigt exemplarisch die immunhistologische Färbung von CD3 am Pankreaskarzinom. Positiv gefärbte Zellen präsentierten sich auf den Schnitten durch einen braun gefärbten Zellkern. Anschließend wurde der Anteil CD3+ Zellen am gesamten Core (CD3- Zellen sind blau markiert) in Prozent ausgegeben. Es konnten 126 Färbungen hinsichtlich CD3-Positivität ausgewertet werden. Der Mittelwert lag bei 8,25 % (SD 6,14%) positiven Zellen in den Cores. Der Maximalwert lag bei 30,77 % positiven Zellen, der Minimalwert bei 0,06 % positiven Zellen (Abbildung 23).

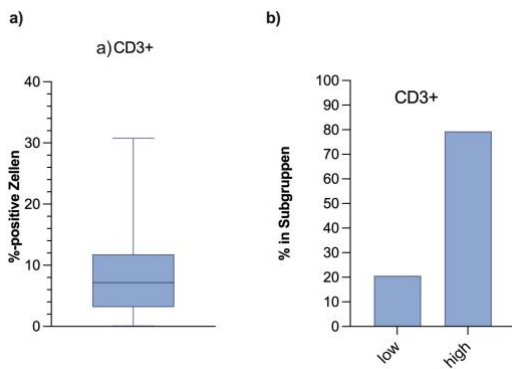


Abbildung 23: Verteilung CD3+ Zellen (a) und relative Verteilung der Subgruppen (b).

Abbildung 23 zeigt, dass sich die Mehrzahl der Proben im unteren %-Bereich positiver Zellen befand, es aber eine breite Streuung der Werte zwischen 0,1 % und 30,8 % um den Mittelwert gab. 79,37 % (n = 26) der Patienten wurden der Gruppe CD3-low und 20,63 % (n = 100) der Gruppe CD3-high zugeteilt.

4.4.1.2 CD4+ Zellen

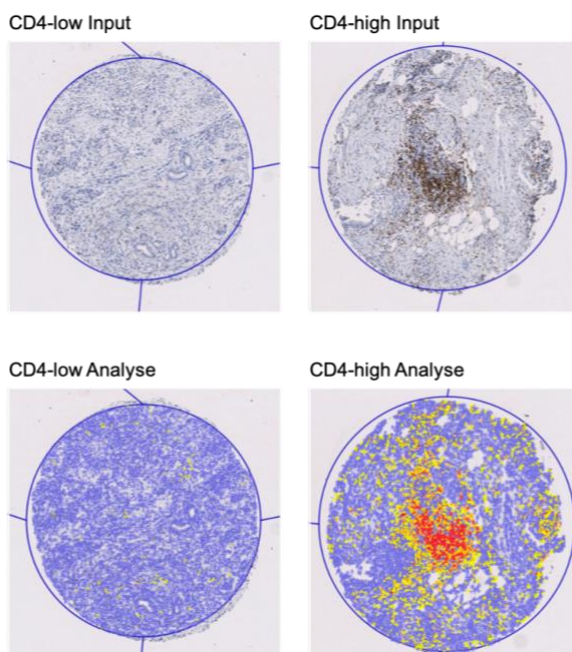


Abbildung 24: Exemplarische Darstellung der CD4 Färbung am PDAC.

Abbildung 24 zeigt Beispiele der CD4-Färbung am Pankreaskarzinom. CD4+ Zellen befanden sich hauptsächlich im Stroma rund um die Tumorzellnester. Der Mittelwert lag bei 5,60 % positiven Zellen (SD 6,63 %). Der Maximalwert lag bei 36,42 % positiven Zellen, der Minimalwert bei 0,02 %. Es zeigte sich ebenfalls eine breite Streuung der Anzahl positiver Zellen (Abbildung 25) um den Mittelwert.

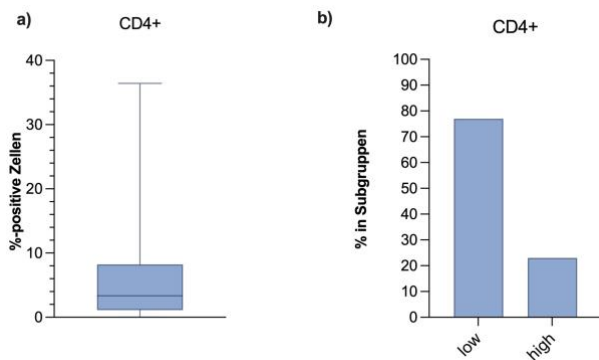


Abbildung 25: Verteilung CD4+ Zellen (a) und relative Verteilung der Subgruppen (b).

Bei 77 % der Proben konnte ein niedriger Anteil CD4+ und bei 23 % der Proben ein hoher Anteil CD4+ Zellen detektiert werden.

4.4.1.3 CD8+ Zellen

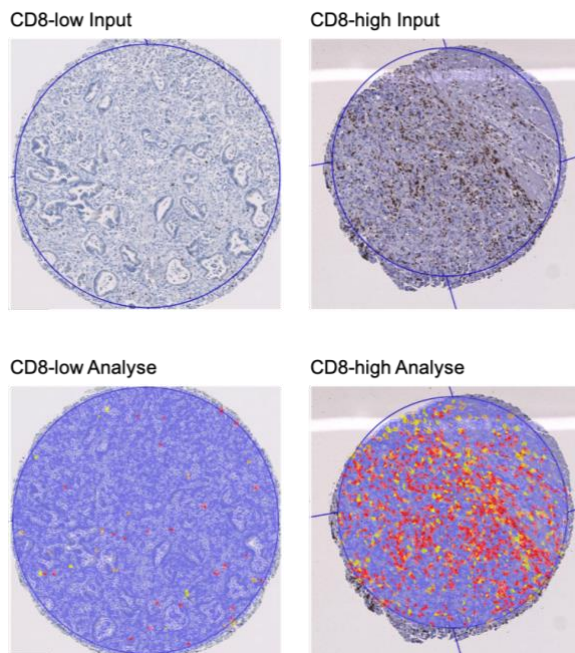


Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der CD8 Färbung am PDAC.

Abbildung 26 präsentiert exemplarisch die CD8-Färbung am Pankreaskarzinom. Die Einteilung erfolgte auch in diesem Fall anhand des prozentualen Anteils positiver Zellen in zwei Gruppen. Positive Zellen zeigten eine deutliche Braunfärbung des Zellkerns. Der Mittelwert lag bei 5,19 %, (SD 5,05 %). Der Maximalwert lag bei 32,66 % positiven Zellen, der Minimalwert bei 0,07 % positiven Zellen.

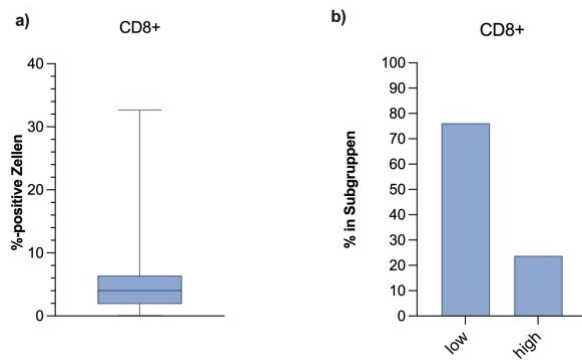


Abbildung 27: Verteilung CD8+ Zellen (a) und relative Verteilung der Subgruppen (b).

76 % der Patienten wiesen einen niedrigen Anteil, 24 % der Patienten einen hohen Anteil an Cores mit CD8+ Zellen auf.

4.4.1.4 FOXP3+ Zellen

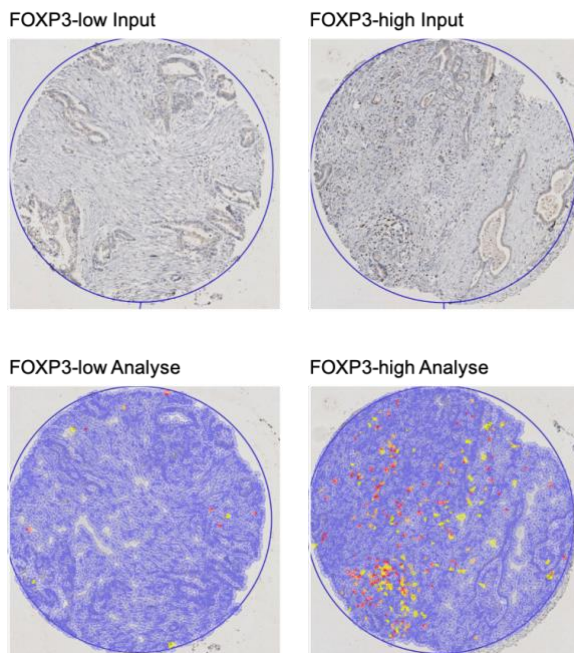


Abbildung 28: Exemplarische Darstellung der FOXP3 Färbung am PDAC.

Abbildung 28 präsentiert exemplarisch die FOXP3-Färbung am Pankreaskarzinom. Die Einteilung der Gruppen erfolgte auch in diesem Fall anhand des prozentualen Anteils positiver Zellen. Positive Zellen zeigten sich durch einen braun gefärbten Zellkern. Der Mittelwert lag bei 2,52 % positiven Zelle, (SD 1,98 %). Der Maximalwert betrug 10,59 % und der Minimalwert lag bei 0,27 % positiven Zellen.

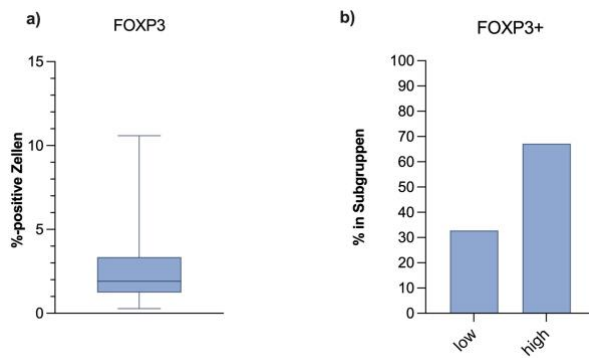


Abbildung 29: Verteilung FOXP3+ Zellen (a) und relative Verteilung der Subgruppen (b).

33 % der Patienten hatten einen geringen Anteil, 67 % einen hohen Anteil FOXP3+ Zellen.

4.4.1.5 CD68+ Zellen

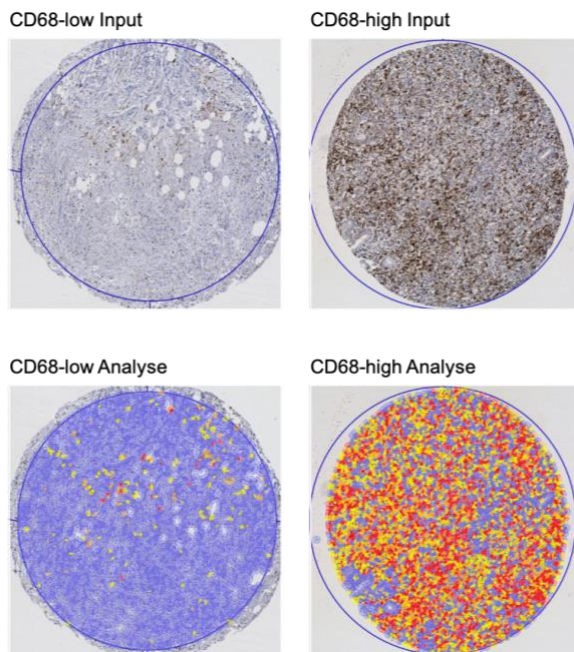


Abbildung 30: Exemplarische Darstellung der CD68 Färbung am PDAC.

Abbildung 30 zeigt exemplarisch die CD68-Färbung am Pankreaskarzinom. Positive Zellen zeigten eine deutliche Braunfärbung. Der Mittelwert lag bei 23,89 % positiven Zelle (SD 11,89 %). Der Maximalwert lag bei 58,60 % und der Minimalwert bei 5,04 % positiven Zellen. Auch hier zeigte sich eine deutliche Streuung der Werte um den Mittelwert.

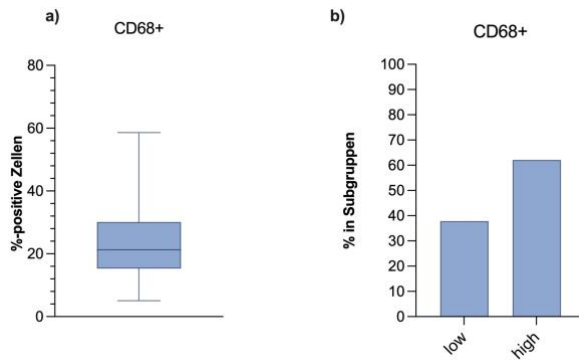


Abbildung 31: Verteilung CD68+ Zellen (a) und relative Verteilung der Subgruppen (b).

62 % der Proben wiesen eine niedrige Anzahl CD68+ Zellen, 38 % hingegen eine hohe Anzahl CD68+ Zellen auf.

4.4.1.6 CD56+ Zellen

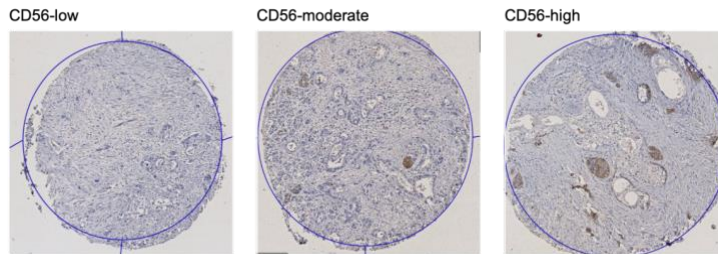


Abbildung 32: Exemplarische Darstellung der CD56-Färbung am PDAC.

Abbildung 32 bildet die Resultate der immunhistochemischen Färbung von CD56 beispielhaft ab. CD56+ Zellen zeigten eine deutlich Braunfärbung der Zellmembran. Zu erwähnen ist, dass CD56 auch Perineuralscheiden braun anfärbte, und somit angetroffene Nervenfasern ebenfalls dargestellt wurden. Die Analyse erfolgte aus diesem Grund semiquantitativ, manuell. Eine Auswertung der Färberegebnisse war bei 123 von 126 Tumoren möglich. 53,65 % zeigten keine CD56-Färbung. 39,02 % der Proben hatten einen geringen Anteil CD56+ gefärbter Zellen, 6,50 % eine moderaten und 0,81 % einen hohen Anteil CD56+ gefärbter Zellen.

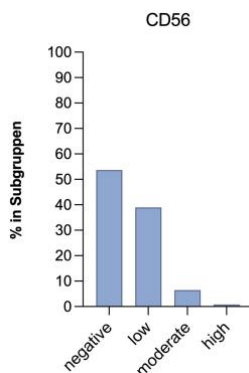


Abbildung 33: Relative Verteilung der Subgruppen CD56+ Zellen.

4.4.2 Färbungen der EMT-Marker

4.4.2.1 N-Cadherin (N-Cad)+ Zellen

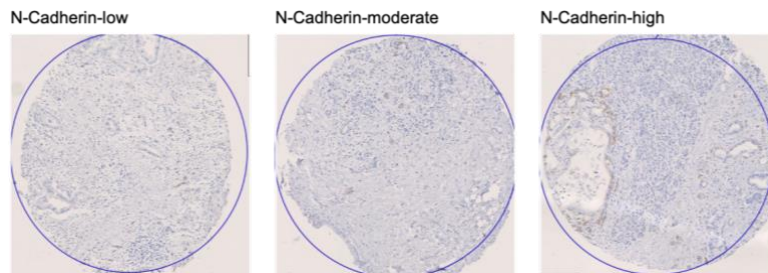


Abbildung 34: Exemplarische Darstellung der N-Cadherin Färbung am PDAC.

Abbildung 34 zeigt die Resultate der immunhistochemischen Färbung von N-Cadherin. N-Cadherin-positive Zellen zeigten eine braune Färbung der Zellmembran. Die Analyse erfolgte mittels semiquantitativer manueller Bewertung. Eine Auswertung der Färberegebnisse war bei 124 von 126 Tumoren möglich. 76,61 % der Tumoren zeigten keine N-Cadherin+ Zellen. 20,16 % der Tumoren fielen in die Kategorie *mild*, 1,61 % der Tumoren in die Kategorie *moderate* und weitere 1,61 % der Tumoren in die Kategorie *high*.

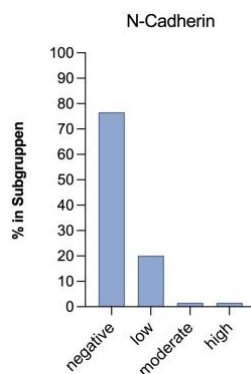


Abbildung 35: Relative Verteilung der Subgruppen N-Cadherin+ Zellen.

4.4.2.2 ZEB1+ Zellen



Abbildung 36: Exemplarische Darstellung der ZEB1 Färbung am PDAC.

Abbildung 36 zeigt beispielhaft die Färbung von ZEB1 an drei Cores des TMA. In der rechten Spalte (*high*) dargestellt, zeigt sich ein Beispiel einer sehr stark ausgeprägten ZEB1-Anfärbung in Form einer deutlich braunen Kernfärbung. In dieser Form färbten sich im gesamten Kollektiv nur wenige Cores an. Bei den übrigen Cores kam es häufig

zu einer starken Hintergrundfärbungen des Zytoplasmas, ohne deutliche Kernfärbung. Auch färbten sich vermehrt stromale Zellen an. Aus diesen Gründen erfolgte auch für ZEB1 eine semiquantitative, manuelle Auswertung. Von 126 Tumoren konnten 125 Tumoren ausgewertet werden. Insgesamt gilt es zu beachten, dass nur eine eingeschränkte Auswertbarkeit von ZEB1 aufgrund unzureichender Qualität der Färbeergebnisse, auch nach mehrmaligen Färbeversuchen, in dieser Arbeit gegeben ist. Die Aussagekraft der ZEB1-Färbungen und die damit einhergehender Analysen ist somit beschränkt. Von 125 Patienten, deren Daten zur Auswertung herangezogen werden konnten, zeigten 25,60 % keine, 60 % eine geringe, 14,40 % eine moderate und 0,00 % eine starke ZEB1-Färbung. In der exemplarischen Darstellung der ZEB1-Färbung ist ein Core mit der Färbeintensität *high* dargestellt. Hierbei handelte es sich um den einzigen Core der gesamten Auswertung, der eine solch ausgeprägte Anfärbung zeigte. Dem zugehörigen Patienten wurden noch zwei weitere Cores mit weniger deutlicher Färbung zugeordnet. Da bei jedem Fall der Mittelwert der Färbeergebnisse der drei Cores für die Analysen ermittelt wurde, ergibt sich der Wert von 0,00% für die starke ZEB1-Färbung.

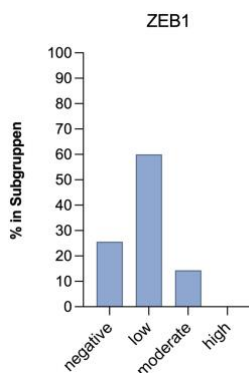


Abbildung 37: Relative Verteilung der Subgruppen ZEB1+ Zellen.

4.5 Univariate Ereigniszeitanalysen zur Assoziation der Expression immunohistochemischer Marker mit dem Gesamtüberleben

Als Zeitpunkt der Diagnose wurde das Datum der Operation festgelegt. Endpunkte wurden für den jeweiligen Patienten individuell definiert. Trat innerhalb des Beobachtungszeitraums der Tod ein, so wurde das Todesdatum verwendet und als Ereignis gewertet. Ansonsten diente das Datum des letzten Kontakts zum Patienten als Endpunkt und wurde als Zensur gewertet. Hierbei wurden Komorbiditäten, perioperative Komplikationen, Rezidive oder das Auftreten von Zweitumoren nicht erfasst und berücksichtigt. Ebenfalls floßen keine Informationen zu neoadjuvanter, adjuvanter oder palliativer Therapie in die Analysen ein. Für $n = 126$ Patienten konnten Überlebenszeitdaten ausgewertet werden. Auf der x-Achse ist jeweils das Gesamtüberleben in Monaten aufgetragen. Auf der y-Achse befindet sich die Überlebenschance in Bezug auf den jeweiligen Zeitpunkt. Das Ereignis Tod ist innerhalb der Kaplan-Meier Kurven als Stufe dargestellt. Zensierungen werden durch senkrechte Striche auf der Kurve gekennzeichnet. Teilweise kam es durch geringe Patientenzahlen in den einzelnen Subgruppen zu Überschneidungen der Kurven.

4.5.1 Assoziation von tumorinfiltrierenden Immunzellen und Gesamtüberleben

4.5.1.1 Assoziation von CD3+ Zellen und Gesamtüberleben

Der Grafik (Abbildung 38) ist zu entnehmen, dass Patienten mit hoher Anzahl CD3+ Zellen eine mediane Überlebenszeit von 19 Monaten hatten im Vergleich zu Patienten mit geringer Anzahl CD3+ Zellen, deren medianes Überleben bei 9,5 Monaten lag. Optisch legt dies nahe, dass Patienten mit hoher Anzahl CD3+ Zellen einen Überlebensvorteil gegenüber solchen mit niedriger Anzahl hatten. Im Log-Rank-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Überlebenschance zwischen den beiden Gruppen ($p = 0.1316$).

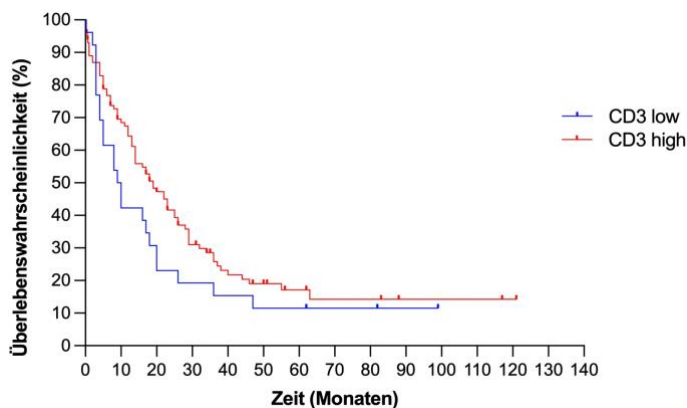


Abbildung 38: Assoziation von CD3+ und Gesamtüberleben.

4.5.1.2 Assoziation von CD4+ Zellen und Gesamtüberleben

Der Verlauf der Kurven zeigt, dass das mediane Überleben bei geringer Anzahl CD4+ Zellen in den Cores 19 Monate und bei hoher Anzahl 10 Monate betrug. Auch hier zeigte sich im Log-Rank-Test kein signifikanter Unterschied der Überlebenschance zwischen den Subgruppen ($p = 0.0709$).

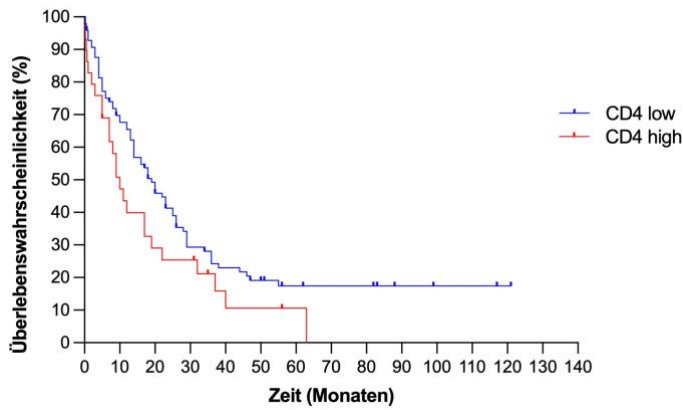


Abbildung 39: Assoziation von CD4+ und Gesamtüberleben.

4.5.1.3 Assoziation von CD8+ Zellen und Gesamtüberleben

Nachfolgend zeigt die Grafik (Abbildung 40) die Assoziation von CD8+ Zellen und dem Gesamtüberleben. Bei einer niedrigen Anzahl CD8+ Zelle betrug die mediane Überlebenszeit 18 Monate, bei einer hohen 16 Monate. Die Kurven verlaufen annähernd überlappend. Die beiden Gruppen unterschieden sich auch statistisch bezüglich des Gesamtüberlebens nicht ($p = 0.3486$).

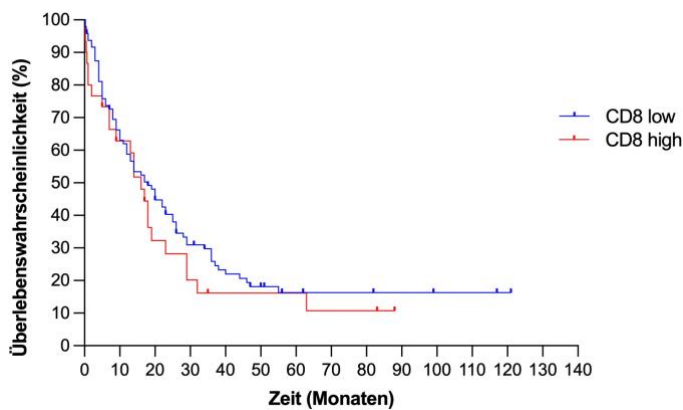


Abbildung 40: Assoziation von CD8+ und Gesamtüberleben.

4.5.1.4 Assoziation von CD68+ Zellen und Gesamtüberleben

Patienten mit geringer Anzahl CD68+ Zellen überlebten im Mittel 14 Monate, wohingegen Patienten mit hoher Anzahl CD68+ Zellen ein medianes Überleben von 32 Monaten aufwiesen. Die beiden Kurven kreuzen sich nicht. Im Log-Rank-Test ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens der beiden Subgruppen ($p = 0.0083$).

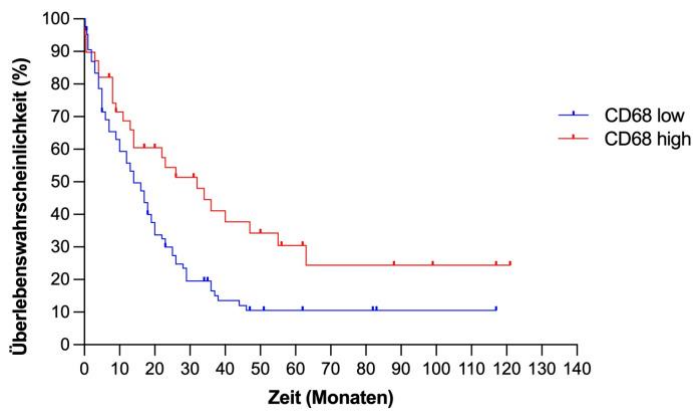


Abbildung 41: Assoziation von CD68+ und Gesamtüberleben.

4.5.1.5 Assoziation von FOXP3+ Zellen und Gesamtüberleben

Bei niedriger Anzahl FOXP3+ Zellen betrug das mediane Überleben 19 Monate, bei hoher Anzahl FOXP3+ Zellen lag es bei 16 Monaten. Auch im Log-Rank-Test zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Subgruppen ($p = 0.0255$).

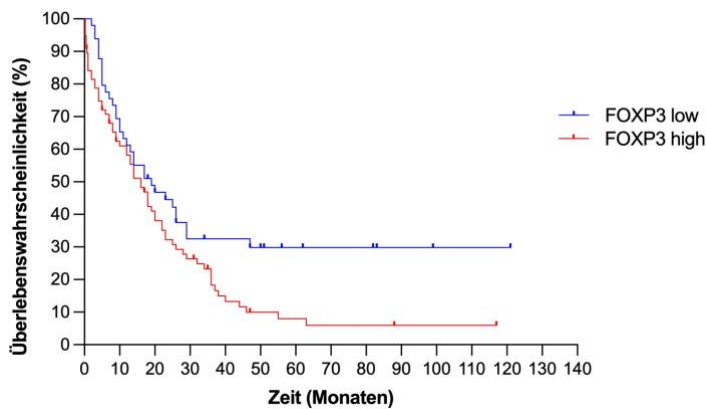


Abbildung 42: Assoziation von FOXP3+ und Gesamtüberleben.

4.5.1.6 Assoziation von CD56+ Zellen und Gesamtüberleben

Patienten die keine CD56+ Zellen aufwiesen hatten ein medianes Überleben von 13 Monaten, bei geringer Anzahl CD56+ Zellen lag es bei 25 Monaten, bei moderater Anzahl bei 18 Monaten und der Patient mit hoher Anzahl CD56+ Zellen lebte einen Monat. Anhand des Kurvenverlaufs lässt sich der Trend abschätzen, dass Patienten mit einer hohen und moderaten Anzahl CD56+ Zellen einen Nachteil hinsichtlich des Überlebens gegenüber solchen mit niedriger und fehlender Anzahl CD56+ Zellen hatten. Die Patienten mit fehlenden CD56+ Zellen wiesen allerdings keinen Vorteil hinsichtlich der Überlebenschance gegenüber denen mit geringer Anzahl. Auch der Log-Rank Test zeigt keinen signifikanten Unterschied des Überlebens unter den Subgruppen an ($p = 0.1565$).

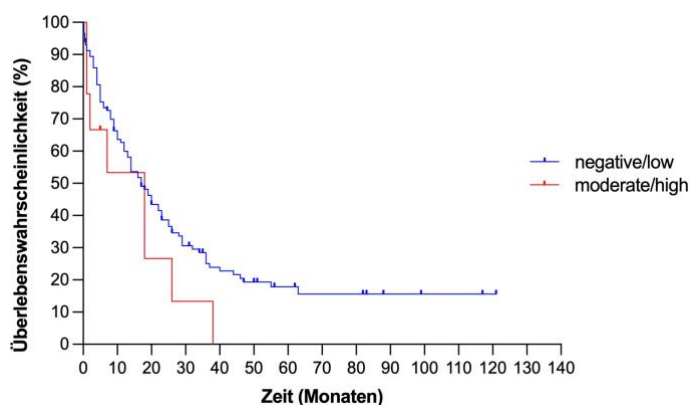


Abbildung 43: Assoziation von CD56+ und Gesamtüberleben.

Tabelle 17 stellt in Übersicht die Ergebnisse der Überlebenszeitanalysen der Immunzell-Marker dar. Bei CD68 ist eine hohe Anzahl positiver Zellen mit signifikant besserem Überleben vergesellschaftet. Bei FOXP3 haben Patienten mit geringer Anzahl FOXP3+ Zellen im Kollektiv einen signifikanten Überlebensvorteil.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Überlebenszeitanalysen der Immunzell-Marker

Marker	Medianes Überleben (Monate) low	Medianes Überleben (Monate) high	p-Wert
CD3+	9,5	19	0.1317
CD4+	19	10	0.0709
CD8+	18	16	0.3486
CD68+	14	32	0.0083
FOXP3+	19	16	0.0255
CD56+	17	18	0.1565

4.5.2 Assoziation von EMT-Markern und Gesamtüberleben im Pankreaskarzinom

4.5.2.1 Anzahl ZEB1+ Zellen und Gesamtüberleben

In der Gruppe mit keinen oder einer niedrigen Anzahl ZEB1+ Zellen betrug das mediane Überleben 17 Monate. In der Gruppe mit moderater oder hoher Anzahl ZEB1+ Zellen lag es bei 13,5 Monaten. Eine Signifikanz hinsichtlich eines Unterschieds in Bezug auf das Gesamtüberleben der Subpopulationen ließ sich im Log-Rxank-Test nicht zeigen ($p = 0.512$).

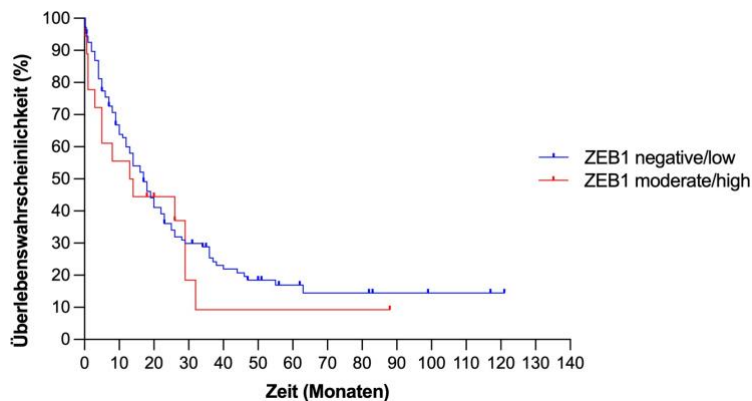


Abbildung 44: Assoziation von ZEB1+ und Gesamtüberleben.

4.5.2.2 N-Cadherin und Gesamtüberleben

Patienten mit fehlenden N-Cadherin+ Zellen hatten ein medianes Überleben von 19 Monaten, solche mit niedriger Anzahl überlebten im Mittel 13 Monate, mit moderater Anzahl 6,5 Monate und bei den beiden Patienten mit hoher Anzahl N-Cadherin+ Zellen verstarb ein Patient nach einem Monat. Der andere Patient wurde nach 121 Monaten zensiert. Rechnerisch lag das mediane Überleben in der Subpopulation *high* damit bei 60,6 Monaten. Optisch legen die Kurvenverläufe nahe, dass Patienten mit fehlenden N-Cadherin+ Zellen eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit haben als solche mit niedriger Anzahl und diese wiederum einen Vorteil gegenüber solchen mit moderater Anzahl. Der Log-Rank-Test zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens innerhalb der Subgruppen ($p = 0.7646$).

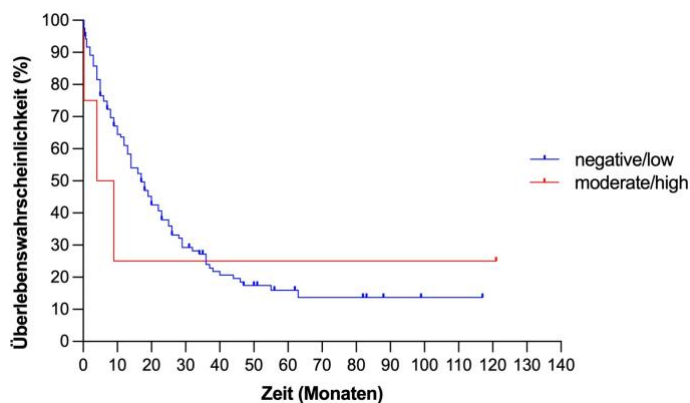


Abbildung 45: Assoziation von N-Cadherin+ und Gesamtüberleben.

Tabelle 18: Zusammenfassung der Überlebenszeitanalysen der EMT-Marker

Marker	Medianes Überleben (Monate) negative/low	Medianes Überleben (Monate) moderate/high	p-Wert
N-Cadherin+	17	6,5	0.7646
ZEB1+	17	13,5	0.5123

5 Diskussion

5.1 Datenanalyse und Patientenkollektiv

Bedingt durch die genannten Ein- und Ausschlusskriterien ergab sich ein selektiertes Kollektiv von $n = 126$ Patienten. Da ausschließlich Daten von an der Universitätsmedizin Mainz operativ versorgten Patienten verwendet wurden, bildete sich zudem eine geografisch begrenzte Patientengruppe, deren Eigenschaften nicht zwingend auf die Grundgesamtheit in Deutschland oder anderen Ländern übertragen werden können. Ebenso wurden Datensets von Patienten, zu denen Probenmaterial oder Überlebenszeitdaten fehlten, nicht abgebildet. Darüber hinaus war lediglich bekannt, dass die Patienten eine Resektion des Pankreas erhalten hatten. Über das genaue Operationsverfahren wurden keine Informationen eingeholt. Aspekte wie der Einsatz von Therapien (Chemo- oder Strahlentherapie), Vorerkrankungen oder weitere klinische Verlaufsp Parameter, wurden bei den Analysen nicht berücksichtigt. Somit kann das in dieser Arbeit dargestellte Kollektiv lediglich als Stichprobe der Grundgesamtheit gesehen werden und die daraus gewonnenen Informationen müssen unter den Gesichtspunkten der oben genannten Limitationen betrachtet werden. Die Ergebnisse sollten an größeren Stichproben verifiziert werden.

5.2 Klinisch-pathologische Parameter

5.2.1 Geschlecht, Altersverteilung und Tumorlokalisation

Das Kollektiv bestand zu 57 % aus Männern und zu 43 % aus Frauen. Betrachtet man den Bericht des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZFKRG) des Robert Koch Instituts (RKI), findet man sowohl bei den Inzidenzen als auch bei der Prävalenz eine ähnliche Verteilung der Geschlechter (6). Frauen überlebten im Kollektiv im Median 22 Monate und somit sechs Monate länger als Männer mit 16 Monaten im Median. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte sich im Log-Rank-Test nicht ($p = 0.32$). Die CONCORD-3 Studie gibt allerdings ebenfalls Hinweise darauf, dass Frauen mit Pankreaskarzinom länger überleben als Männer (162).

Auch die Altersverteilung in den Daten des ZFKRG entspricht in etwa derer des analysierten Kollektivs. Die Mehrzahl der Patienten des Kollektivs war zum Diagnosezeitpunkt über 60 Jahre alt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt im Bericht bei 72 Jahren im Median für Männer und 76 Jahren im Median für Frauen (6). Im Kollektiv waren die Patienten im Mittel 67 Jahre alt (Median 69 Jahre), wobei nicht zwischen Männern und Frauen unterschieden wurde. In einer Arbeit von Allen et al. zeigte sich eine ähnlich breite Streuung der Altersverteilung (30-93 Jahre) (163) wie im Kollektiv (42-85 Jahre). Hinsichtlich des Alters hatte die Gruppe unter 50 Jahren ein medianes Überleben von 18 Monaten, die Gruppe von 50-59 Jahren überlebte im Median 13 Monate, bei den Personen von 60-69 Jahren waren es 20 Monate. Patienten im Alter von 70-79 Jahren hatten ein medianes Überleben von 19 Monaten. Am kürzesten überlebten Patienten mit einem Alter von über 80 Jahren (8 Monate im Median). Ein signifikanter Unterschied ergab sich in dieser Arbeit nicht. Die Analyse eines größeren Patientenkollektivs zeigt, dass Patienten in höherem Alter ein höheres Risiko haben, schneller zu versterben (164).

Im Kollektiv befand sich die Mehrzahl der Tumoren im Pankreaskopf (> 85%). Dies entspricht der in der Literatur beschriebenen Verteilung von Adenokarzinomen des Pankreas (5, 10).

5.2.2 TNM-Klassifikation und UICC-Stadien

5.2.2.1 Tumorgröße und T-Stadium

Im Median hatten die Tumoren im Kollektiv eine Größe von 3,7 cm. In der Literatur finden sich Größenangaben von etwa 1-3 cm (5). Hinsichtlich der Aufteilung der T-Stadien befanden sich 4 Patienten (3,17 %) im Stadium T1, 6 Patienten (4,76 %) im Stadium T2, 111 Patienten (88,10 %) im Stadium T3 und 5 Patienten (3,97 %) im Stadium T4. Diese Werte decken sich mit Angaben aus Analysen größerer Kollektive (163). Im Stadium T1 lag das mediane Überleben im Kollektiv bei 45,5 Monaten, im Stadium T2 bei 47 Monaten, im Stadium T3 bei 17 Monaten und im Stadium T4 lag es bei 25 Monaten. Der Log-Rank Test zeigte keine Signifikanz ($p = 0.40$) hinsichtlich eines Überlebensvorteils zwischen den vier Gruppen. Einschränkend muss erwähnt werden, dass sich in den Gruppen T1, T2 und T4 jeweils nur wenige Patienten befanden. Fasst man die Stadien T1/T2 und T3/4 zusammen, ließ sich dennoch grafisch erkennen, dass Patienten mit geringerer Tumorgröße ein tendenziell längeres Überleben haben. Ein höheres T-Stadium war auch in der Übersichtsarbeit von Cong et al. zum Vergleich der siebten und achten TNM-Klassifikation mit kürzerem Gesamtüberleben assoziiert (45).

5.2.2.2 Lymphknotenmetastasen

Bei 38 (30,4 %) Patienten im Kollektiv lag kein Befall von Lymphknoten vor. 87 (69,6 %) Patienten wiesen einen Befall auf. Bei einem Patienten lagen keine Angaben zum Nodalstatus vor. Anzumerken ist, dass sich 2017 die TNM-Klassifikation für das Pankreaskarzinom verändert hat. Bis dato wurde beim Nodalstatus in vorhandene oder nicht vorhandene Lymphknotenmetastasen unterschieden. Seit 2017 wird zwischen einem N1- (1-3 befallene Lymphknoten) und einem N2-Status (>4 befallene Lymphknoten) unterschieden (45). Die Datensets der Patienten stammten überwiegend aus den Jahren vor 2017 und wurden entsprechend der siebten Auflage klassifiziert. Patienten deren Lymphknoten nicht befallen waren (N0) überlebten im Median 22 Monate ab Diagnosezeitpunkt. Wohingegen Patienten mit Lymphknotenmetastasen im Median 14 Monaten überlebten. Grafisch deutet dies auf einen Überlebensvorteil bei fehlender Lymphknoteninfiltration hin, obwohl sich im Log-Rank-Test keine Signifikanz hinsichtlich des Überlebens zwischen den zwei Gruppen abbildete. Cong et al. zeigten, dass befallene Lymphknoten mit einem verkürzten Überleben assoziiert sind (45).

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht gemäß 8. Auflage der UICC-Klassifikation zwischen N1 (1-3 Lymphknoten) und N2 (4 Lymphknoten) unterschieden. Eine Studie von van Roessel et al., die die prognostische Wertigkeit der beiden Auflagen der UICC-Klassifikation vergleicht, zeigte jedoch, dass sich das Outcome bei einem N2 Stadium deutlich verschlechterte und eine Aufgliederung in N1 und N2 zur besseren Verteilung der Patienten erstrebenswert ist (165). Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass sich in diesem Kollektiv kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Überlebens zwischen den beiden Gruppen bei der Lymphknotenmetastasierung gezeigt hat.

5.2.2.3 Fernmetastasen

Im Kollektiv befand sich eine geringe Anzahl an Patienten ($n = 7$; 5,56 %), bei denen eine Fernmetastasierung beschrieben wurde. Gemäß den Therapieempfehlungen der aktuellen Leitlinien gilt die operative Resektion des Tumors als einzig kurativer Ansatz beim Pankreaskarzinom. Diese wird allerdings bei Fernmetastasierung nicht zwingend empfohlen. Bei bekannter Fernmetastasierung, entsprechend einem UICC-Stadium IV, empfiehlt sich eine palliative Chemotherapie (3). Da in der vorliegenden Arbeit nur Patienten ins Kollektiv aufgenommen wurden, die sich einer chirurgischen Resektion des Tumors unterzogen hatten, gilt es zu diskutieren, warum sich dennoch einige Patienten mit Fernmetastasierung fanden. Es lagen zur Analyse des Kollektivs ausschließlich histopathologische Daten, sowie die Angaben zum Zeitpunkt des

Versterbens oder zum letzten Kontakt vor. Weitere Informationen zur Krankengeschichte, respektive zum klinischen Verlauf, wurden nicht eingeholt.

Mögliche Erklärung für den Zusammenhang könnte daher eine Operation mit palliativer Zielsetzung gewesen sein. Zudem ist es denkbar, dass sich Metastasen erst intra- oder postoperativ dargestellt haben. Einige Arbeiten legen zudem nahe, dass Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom dennoch von einer Resektion profitieren können (166-168). Die betroffenen sieben Patienten waren alle männlich und im Alter zwischen 54 und 76 Jahren. Die Tumoren befanden sich alle im T3-Stadium und zeigten eine mäßige (G2) bis schlechte (G3) Differenzierung. Die Metastasen befanden sich in Leber und Peritoneum. Dies unterstützt die oben getroffene Annahme, dass es erst intraoperativ zum Auffinden der Herde gekommen sein könnte. Eine gleichzeitige Resektion von Lebermetastasen und dem Primärtumor kann bei einigen Patienten zum verbesserten Outcome führen (168).

Patienten mit fehlender Fernmetastasierung (n = 80; 63,48 %) überlebten im Median 14 Monate. Im Gegensatz dazu überlebten Patienten mit Fernmetastasierung (n = 7; 5,56 %) im Median 19 Monate im Kollektiv. Am Ende des Beobachtungszeitraums waren alle Patienten dieser Gruppe verstorben. Bei der Gruppe, in der keine Aussage zur Metastasierung getroffen wurde (n = 39; 30,95 %) überlebten die Patienten mit 29 Monaten im Median am längsten. In der Auswertung der Kaplan-Meier-Kurven unterschieden sich die Subpopulationen signifikant (p = 0.027). Dies legt den Schluss nahe, dass bei den meisten Patienten der Gruppe Mx wahrscheinlich keine Metastasen vorlagen. Dass die kleine Gruppe mit Fernmetastasierung dennoch ein so langes Überleben aufwies, könnte damit erklärt werden, dass es individuell spezielle Gründe für eine Operation bei bekannter Fernmetastasierung gegeben hat. So ist es denkbar, dass die Resektion, trotz Metastasierung, zum langsameren Progress und somit zum längeren Überleben beigetragen haben könnte. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre ein guter präoperativer ECOG Performance Status der Patienten und eine damit verbundene bessere Prognose.

Abschließend gilt es hervorzuheben, dass in nachfolgenden Analysen größere Kohorten untersucht und Informationen zu klinischen Hintergründen einbezogen werden sollten, um diese Zusammenhänge sinnvoll zu klären.

5.2.2.4 UICC-Stadien

Im Kollektiv befanden sich 3,18 % der Patienten in Stadium I (IA und IB). 22,22 % wiesen ein Stadium IIA auf. Die Mehrheit, 65,87 %, befand sich in Stadium IIB. Dies entspricht etwa den Verteilungen in der von van Roessel et al. veröffentlichten multizentrischen Studie an über 1500 Patienten (165). In dieser wurde die Auswertung der Patientendaten allerdings nach der 7. und 8. Auflage der UICC-Klassifikation durchgeführt. Die in diesem Kollektiv beobachteten Verteilungen entsprachen etwa denen von van Roessel et al., klassifiziert nach der 7. Auflage. Bei Anwendung der 8. Auflage ergab sich in der Studie eine Umverteilung. 12 % der Patienten wurden einem niedrigeren Stadium und 38,8 % einem höheren Stadium zugewiesen (165). Die von der American Joint Committee on Cancer (AJCC) veröffentlichte 8. Auflage der TNM-Klassifikation enthält einige klinisch relevante Neuerungen. Diese betreffen vor allem die Stadieneinteilung. Die Bestimmung des T-Stadiums erfolgt nunmehr durch die Größe, definiert durch den maximalen Durchmesser des Tumors, bestimmt. Es erfolgt eine Einteilung in Tumoren <2 cm (T1), Tumoren von 2-4 cm (T2), >4 cm (T3) und Tumoren, die den Truncus coeliacus oder die A.mesenterica superior infiltrieren (T4). In der alten Version wurden alle Tumoren, die über das Pankreas hinausragten, unabhängig von der Größe, als T3-Stadium klassifiziert. Es erfolgte die Unterscheidung zwischen Lymphknotenbefall und keinem Lymphknotenbefall. Die genaue Anzahl befallener Lymphknoten wird in der 8. Auflage berücksichtigt (N1 und N2) (165). Diese Änderungen haben zur Folge, dass Patienten mit mehr als 4 befallenen Lymphknoten (N2) und einem T3-Stadium in ein UICC-Stadium III fallen, was zuvor erst bei Tumoren im T4-Stadium der Fall war. Ob die neue Zuteilung zu einem anderen T- oder N-Stadium Auswirkungen auf die Einteilung in prognostische Gruppen hat, wird unterschiedlich diskutiert (45, 165).

Bei der Analyse dieses Kollektivs wurden die Daten zur TNM-Klassifikation aus den histopathologischen Befunden entnommen und daraus das UICC-Stadium gemäß den Vorgaben der 7. Auflage bestimmt. Es erfolgte keine zusätzliche Bestimmung nach den Vorgaben der 8. Auflage, da die Patientendaten aus den Jahren 2007-2017 stammten, die neue Klassifikation zu diesem Zeitpunkt noch keine Anwendung gefunden hat und die Patienten somit wahrscheinlich den Therapiepfaden nach alter Klassifikation zugewiesen wurden.

Betrachtet man die Stadienverteilung aus den Daten des ZFKRG des RKI aus den Jahren 2019/2020 in Deutschland, zeigt sich ein anderes Bild als im Kollektiv. Einem Stadium I werden in der Aufstellung des RKI 12 %/9 % (Frau/Mann), einem Stadium II 18 %/18 % (Frau/Mann), einem Stadium III 16 % und einem Stadium IV werden 54 %/57 % (Frau/Mann) zugeordnet (6). Dies bedingt sich am ehesten dadurch, dass in der Erfassung des RKI nicht nur die Stadien der Patienten beschrieben werden, die sich einer Operation unterzogen haben, sondern die aller an Pankreaskarzinom erkrankten Patienten in Deutschland.

5.2.3 Grading

Mit dem Grading wird der Grad der Differenzierung beschrieben. Die meisten Tumoren der Kohorte sind mäßig differenziert G2 (58,73 %), gefolgt von schlecht differenzierten Tumoren G3 (38,10 %). Nur ein geringer Teil (3,17 %) hat einen gut differenzierten Tumor G1. Diese Verteilung zeigte sich auch in größeren Kohorten (165).

Bei der Überlebenszeitanalyse erfolgte eine Dichotomisierung der Variable in G1/G2 Tumoren, sowie G3 Tumoren. Dabei überlebten Patienten mit gut/mäßig differenzierten Tumoren im Median 2 Monate länger (19 Monate) als solche mit schlecht differenzierten (17 Monate). Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich in dieser Arbeit nicht. Erklärbar wäre dies mit dem Umstand, dass die Follow-up-Daten der hier untersuchten Kohorte Lücken enthielten, da Informationen über Patienten, von denen kein Sterbedatum oder das Datum des letzten Kontakts bekannt war, fehlten. Auch fehlte die Information darüber, wie lange Patienten nach dem letzten Kontakt noch leben.

Der Grad der Differenzierung kann gemäß den Angaben der Literatur allerdings als starker prognostischer Indikator gewertet werden. Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren haben eine deutlich schlechtere Prognose als solche mit gut differenzierten Tumoren (169, 170).

5.2.4 Resektionsstatus

Makroskopisch und mikroskopisch freie Tumorabsetzungsränder (R0) wurden im Kollektiv bei 79,2 % der Patienten beschrieben. 20,8 % der Patienten hatten einen R1-Status, Resektionsränder mit mikroskopischen Tumorresten. Bei keinem Patienten wurde ein makroskopisch befallener Tumorrand (R2) beschrieben. Diese Verteilung ist kongruent mit Daten von Allen et al. an einer Kohorte von über 3000 Patienten (163). Hinsichtlich des Überlebens hatte die Gruppe der R0-resezierten Patienten (19 Monate im Median) einen statistisch signifikanten Vorteil gegenüber Patienten mit R1-Resektion (14 Monate im Median). Dies deckt sich mit den Angaben der Literatur. Auch hier ist der Resektionsstatus als unabhängiger prognostischer Marker beschrieben und eine R1-Resektion mit einem schlechteren Überleben assoziiert (171). Allerdings sollte bei befallenem Resektionsrand zusätzlich der genaue Abstand zum gesunden Gewebe betrachtet werden, da sich auch hier Gruppen unterschiedlicher prognostischer Wertigkeit einteilen lassen und entsprechend zielgenaueren Therapieoptionen zugewiesen werden können (172, 173). Diese Information wurde in den Analysen der vorliegenden Arbeit nicht erhoben. Einen weiteren Einfluss auf die Tumorfreiheit des Resektionsrandes und die Prognose hat die neoadjuvante Chemotherapie (174). Informationen, ob Patienten des Kollektivs eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten, wurden nicht eingeholt. Die Aussagekraft der oben beschriebenen statistisch signifikanten Analyse gilt es mit dieser Einschränkung zu betrachten.

5.3 Allgemeine Überlebenszeitanalyse

Das mediane Überleben im Kollektiv lag bei 17 Monaten. Die in der Literatur beschriebenen medianen Überlebenszeiten liegen bei 23 Monaten im Allgemeinen (163), sowie zwischen 17 und 28 Monate nach R0-Resektion (175). Die Überlebensraten von Patienten nach R1- oder R2-Resektion werden mit einer Spanne von 8 bis 22 Monaten beschrieben (175). Die absolute 5-Jahres-Überlebensrate des Kollektivs lag bei 16,1 %, was in etwa den Angaben aus größeren Kohorten entspricht (163). Die absolute 10 Jahres Überlebensrate lag im Kollektiv bei 14.1 %. Diese lag in Deutschland deutlich niedriger, bei 6-7% für 2019/2020 (6). Erklärbar ist die höhere Überlebensrate damit, dass in den Daten des RKI alle Patienten mit Pankreaskarzinom in die Analyse einfließen und im vorliegenden Kollektiv nur Patienten nach Resektion einbezogen wurden. In Deutschland lag die 5-Jahres-Überlebensrate 2019/2020 bei 9-10 % (6). In den USA zeigten sich ähnliche Werte mit etwa 12 % (176). Weltweit ist eine 5-Jahres Überlebensrate von unter 5 % beschrieben (7). Die in dieser Arbeit beschriebene Kohorte wurde als Grundgesamtheit betrachtet. Es wurde nicht unterschieden zwischen Gruppen, die vor oder nach Operation eine Chemotherapie, eine Radiotherapie erhalten hatten.

5.4 Färbung und Analyse der Immuzell- und EMT-Marker

5.4.1 Methodik und Limitationen der Auswertung mittels digitaler und semiquantitativer Bildanalyse

Das Pankreaskarzinom ist bekannt als heterogene Krebsentität (177). Die Eigenschaften der Entität, insbesondere auf histologischer und molekularer Ebene lassen sich nicht durch die Betrachtung einzelner spezifischer Marker charakterisieren. Daher ging es in der vorliegenden Arbeit darum, durch die Färbung und Analyse einer größeren Anzahl von Immuzell- und EMT-Markern und deren Korrelation zum Gesamtüberleben der Patienten, ein möglichst breit gefächertes Bild dieses Tumors darzustellen. Für die Färbungen und Analysen wurden aus dem Patientenkollektiv repräsentative Präparate ausgewählt und aus diesen Ausschnitte für den TMA gestanzt, in denen sich sowohl ausreichend Tumorzellen, als auch Immuzellinfiltrat befanden. Da es sich bei der Tumorart um eine heterogene Art handelt, ist davon auszugehen, dass der ausgewählte Ausschnitt diese Heterogenität gegebenenfalls nicht hinreichend widerspiegelt. Dies könnte bei weiteren Untersuchungen durch die Analyse von *Whole Slides* umgangen werden. Die Färbungen des Kollektivs wurden mittels digitaler Bildanalyse analysiert. Dieses Verfahren stellt durch seine Objektivität und Reproduzierbarkeit eine effektive Analysemethode für große Kollektive dar. Dennoch geht hierbei eine Vielzahl von Informationen verloren, da eine exakte Erkennung der Tumor- beziehungsweise Immuzellen durch das Programm nicht immer gegeben war und in dem Zusammenhang manuelle Anpassungen im Analysealgorithmus erfolgen mussten. Was ebenfalls nicht hinreichend gelungen ist, ist die Differenzierung zwischen Zellen im Tumorzentrum und der Tumorumgebung. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in den Cores hauptsächlich Tumorgewebe und kaum Stroma abgebildet wurde. Ursprünglich war eine separate Analyse der Zellen im Tumorzentrum, der Invasionsfront und im Tumorstroma geplant. Die Färbeergebnisse unterschieden sich in den verschiedenen Bereichen aus den oben genannten Gründen allerdings nicht hinreichend, sodass separate Analysen keinen Informationsgewinn erbracht hätten.

Ebenfalls beachtet werden sollte, dass die Verwendung unterschiedlicher Antikörper oder Färbeprotokolle zu anderen Studienergebnissen führen kann. Für die Färbungen, bei denen eine Analyse in *QuPath* möglich war, wurde die prozentuale Anzahl positiver Zellen im jeweiligen Core ermittelt. Pro Patient wurden drei Cores analysiert und der Mittelwert der Anzahl positiver Zellen aus diesen Cores ermittelt. Mittels des im Methodenteil beschriebenen *Cut-off-Finders* wurden demnach Werte bestimmt, um die Cores in die Gruppen mit hoher Anzahl und niedriger Anzahl positiver Zellen der

entsprechenden Färbung zu unterteilen. Bei Färbungen, bei denen sich die Analyse durch *QuPath* nur unzureichend anwenden ließ, erfolgte eine semiquantitative, manuelle Auswertung. Diese Methode wird der intratumoralen Heterogenität gerechter, allerdings auf Kosten von Objektivität und Reproduzierbarkeit. Zudem ist es wichtig zu erwähnen, dass es bisher für die betrachteten Marker im Pankreaskarzinom noch keine allgemein validierten Cut-off-Werte oder Scoring-Systeme gibt.

5.4.2 Analyse der Immunzell-Marker

In heterogenen Tumorarten wie dem Pankreaskarzinom hat die Umgebung des Tumors und deren Tumorbioogie großen Einfluss auf das Tumorwachstum und den Progress (178). Daher ist es von Bedeutung, die Tumorumgebung zu charakterisieren und prognostische Biomarker zu identifizieren. Was bereits in zahlreichen Arbeiten zuvor gezeigt werden konnte, ist die Tatsache, dass das Immunzellinfiltrat sich nicht nur nach Tumorentität unterscheidet, sondern auch unter den einzelnen Patienten. Hierbei verteilen sich die einzelnen Immunzellpopulationen wie T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen oder NK-Zellen je nach Tumor unterschiedlich. Sie befinden sich beispielsweise eher im Tumor selbst, an der Invasionsfront oder im umgebenden Stroma (179). In der vorliegenden Kohorte wurde eine solche räumliche Differenzierung bei den Analysen nicht vorgenommen und sollte bei weiteren Untersuchungen an Pankreaskollektiven einbezogen werden.

5.4.2.1 CD3+ Zellen im Pankreaskarzinom

CD3 ist ein Marker, der sich auf T-Lymphozyten befindet (152). Im Kollektiv zeichnete sich ab, dass Patienten mit hoher Anzahl CD3+ Zellen ein besseres Überleben (im Median 19 Monate) haben, als solche mit geringer Zelldichte (im Median 9,5 Monate). Die Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant. Auch in einer Vielzahl von Studien wurde deutlich, dass eine hohe Anzahl CD3+ Zellen in unterschiedlichen Tumoren mit besserem Überleben einhergeht (123). Zu beachten ist, dass ein Teil dieser Studien die Analysen nicht an TMA's, sondern an *Whole Slides* durchgeführt hat und, dass nicht einzig das Gesamtüberleben, sondern auch das progressionsfreie Überleben betrachtet wurde (123). Diese Unterscheidung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen. Delayre et al. zeigten in einer Studie zum Pankreaskarzinom, dass eine hohe Anzahl CD3+ Lymphozyten mit besseren histopathologischen Merkmalen einhergeht. Die Patienten mit hoher Anzahl CD3+ Zellen hatten beispielsweise kleinere Tumoren und damit ein niedrigeres T-Stadium (128). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen CD3-Zellzahl und Gesamtüberleben oder progressionsfreiem Überleben konnte nicht belegt werden (128). An einem groß angelegten Array konnten Mahajan et al. 2018 darstellen, dass die Anzahl CD3+-Zellen der stärkste unabhängige Prädiktor für ein längeres progressionsfreies Überleben bei Patienten mit Pankreaskarzinom war. Auch ein groß angelegter Review von Fridman et al. bestätigte den positiven Effekt von CD3+ Zellen auf das Outcome (179). Hier wurde eine Vielzahl von Arbeiten betrachtet und der Effekt von Immunzellen auf das Outcome in unterschiedlichen Entitäten, darunter Melanome, Mammakarzinome, Ovarialkarzinome, Prostata- und kolorektale Karzinome, beschrieben (179). Einschränkend zu erwähnen ist, dass es sich bei CD3 um einen Marker handelt, der sich auf nahezu allen T-Zell-Populationen befindet. T-Zellen können allerdings in viele unterschiedliche Subpopulationen mit diversen Funktionen unterteilt werden (152).

5.4.2.2 CD4+ Zellen im Pankreaskarzinom

CD4+ Zellen, sogenannte T-Helferzellen, werden in zwei Subtypen unterteilt. Th1-Zellen, sind beteiligt bei der Aktivierung von CD8+ Zellen, NK-Zellen und Makrophagen. Dies geschieht über die Ausschüttung von IL-2 und IFN- γ . Th2-Zellen spielen hingegen eine Rolle bei der Aktivierung der humoralen Immunantwort, vermittelt durch B-Zellen (179). In dieser Arbeit hatten Patienten mit hoher Anzahl CD4+ Zellen ein kürzeres Überleben als solche mit niedriger Anzahl. Delayre et al.

konnten ebenfalls zeigen, dass eine hohe CD4/CD3-Ratio mit einem schlechteren Überleben verbunden war (128). Hwang et al. hingegen beobachteten ein längeres progressionsfreies Überleben bei hoher Anzahl CD4+ Zellen (180). Nejati et al. zeigten an Patienten mit vorausgegangener neoadjuvanter Chemotherapie, dass eine hohe Anzahl CD4+ Zellen mit gleichzeitig hoher Anzahl CD8+ Zellen mit einer besseren Differenzierung des Tumors und geringeren Rückfallraten assoziiert waren (125). Eine hohe Anzahl CD4+ Zellen stellte sich als unabhängiger prognostische Faktor für längeres Überleben heraus. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich bei der Betrachtung des Einflusses der CD4+ Zellen hinsichtlich des Outcomes in Pankreaskarzinomen kein klares Bild zeichnen lässt und die isolierte Betrachtung der CD4+ Zellen wahrscheinlich keinen Nutzen erbringt und weitere Parameter in die Beurteilung einfließen müssen. Diese Beobachtung unterstreicht auch Fridman et. al in seinem Review (179).

5.4.2.3 CD8+ Zellen im Pankreaskarzinom

In dieser Arbeit zeigte sich hinsichtlich des Überlebens in Bezug auf die Anzahl CD8+ Zellen kein signifikanter Unterschied. Die beiden Gruppen hatten ein etwa gleich langes Überleben (16 Monate mit hoher Anzahl und 18 Monate mit geringer Anzahl CD8+ Zellen im Median). In der Literatur wird in der Mehrzahl der Arbeiten von einem eindeutigen Überlebensvorteil bei hoher Anzahl CD8+ Zellen berichtet (123). So ist eine hohe CD8/FOXP3-Ratio mit besserem medianen Gesamtüberleben (125), sowie niedrige Level von CD8+ Zellen, in Kombination mit hoher Anzahl CD68+ Zellen mit einem schlechteren Outcome verbunden (124). Ansatz für eine Erklärung der Verbindung von hoher Anzahl CD8+ Zellen und schlechter Prognose ist das Konzept der T-Zell-Erschöpfung (*T cell exhaustion*). Da T-Zellen in Tumoren ständig gegen die vom Tumor präsentierten Antigene und Signale ankämpfen müssen, kann es mit der Zeit zum Funktionsverlust oder zur Funktionsverschlechterung kommen (181). Eine hohe Anzahl CD8+ Zellen muss daher nicht zwingend mit besserer Prognose einhergehen. Bei hoher Anzahl CD8+ Zellen könnte ein großer Anteil erschöpfter Zellen vorliegen und zu schlechterer Prognose führen. Dieser Zusammenhang konnte unter anderem im T-Zell-Lymphom (182), im kolorektalen Karzinom (183) und bei Mammakarzinomen (184) beobachtet werden. Auch im Pankreaskarzinom spielt T-Zell-Erschöpfung eine Rolle (185).

5.4.2.4 CD68+ Zellen im Pankreaskarzinom

In den an diesem Kollektiv erfolgten Analysen hatten Patienten mit hoher Anzahl CD68+ Zellen ein signifikant längeres Überleben als solche mit niedriger Anzahl CD68+ Zellen (14 versus 32 Monate im Median). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Mahajan et al. die darstellten, dass eine hohe Anzahl CD68+ Zellen mit einem verbesserten progressionsfreien Überleben verknüpft ist (124). Andere Arbeiten konnten im Gegenzug keinen Zusammenhang zwischen Outcome und Anzahl CD68+ Zellen nachweisen (186). Erklärung hierzu könnte folgender Mechanismus sein. CD68+ Monozyten und Makrophagen haben die Eigenschaft, sich je nach Umgebungssituation in Typ M1- und Typ M2-Makrophagen, die beiden wichtigsten Subtypen der Makrophagen, zu polarisieren. M1-Makrophagen haben proinflammatorische Wirkung und tragen durch Sekretion von IL-1, IL-6 und TNF α zur Tumorzellerstörung via T-Helferzellen bei. M2- Makrophagen hingegen wirken eher antiinflammatorisch, stoppen Entzündungsprozesse und sind an der Reparatur von Geweben, sowie an der T2-Zell-Antwort beteiligt. M2 Makrophagen unterstützen eine Ausbreitung von Tumorzellen und Angiogenese (179, 187). Die Beiden Subpopulationen können anhand verschiedener Oberflächenmarker voneinander unterschieden werden. Tumorzellen induzieren die Polarisierung zu M2-Makrophagen, den sogenannten tumorassoziierten Makrophagen, was dazu führt, dass der Tumor durch das Immunsystem schlechter angreifbar wird (188). Eine immunhistochemische Differenzierung der Makrophagen in die Subpopulationen M1- und M2-Makrophagen hat in dieser Arbeit nicht stattgefunden. Die Ergebnisse sind unter diesem Aspekt

einschränkend zu betrachten. Um ein vielschichtigeres Bild zu erhalten, müssten Expressionsanalysen der Subpopulationen angefertigt werden und in Bezug auf Outcome-relevante Parameter ausgewertet werden.

5.4.2.5 FOXP3+ Zellen im Pankreaskarzinom

FOXP3 ist ein Oberflächenmarker, der von regulatorischen T-Zellen (Treg) exprimiert wird. Diese Zellen regulieren die Reaktion von T-Effektorzellen (189). Im untersuchten Kollektiv überlebten Patienten mit niedriger Anzahl FOXP3+ Zellen signifikant länger als Patienten mit hoher Anzahl FOXP3+ Zellen (19 Monate Median versus 16 Monate im Median). Es handelt sich hierbei um keine langen Zeiträume. Vor dem Hintergrund, dass das Gesamtüberleben beim Pankreaskarzinom jedoch insgesamt sehr kurz ist, können solche Unterschiede dennoch zu signifikanten Ergebnissen führen. Allerdings handelte es sich in der vorliegenden Arbeit um die Ergebnisse einer kleinen, nicht repräsentativen Stichprobe, und die Daten müssten zur allgemeinen Übertragbarkeit an größeren Kohorten validiert werden. Auch Ratios der verschiedenen Immunzellmarker wurden nicht in die Analyse einbezogen. Wie bereits im Abschnitt zu CD4+ Zellen beschrieben, ist auch die Datenlage bezüglich des Outcomes und der Assoziation zur Dichte regulatorischer T-Zellen heterogen. Im Array von Delayre et al. an Pankreaskarzinomen war eine hohe FOXP3/CD8 Ratio mit schlecht differenzierten Tumoren, die in der Regel eine schlechte Prognose aufweisen, assoziiert. Die isolierte Betrachtung der Parameter FOXP3+ Zellen oder CD8+ Zellen erbrachte keine signifikanten Ergebnisse (128). Auch bei Hiraoka et al. war eine hohe Dichte von Tregs mit schlechterem Überleben im Pankreaskarzinom assoziiert (190). Im Endometriumkarzinom war eine hohe CD8/FOXP3 Ratio ein unabhängiger prognostischer Faktor für längeres Überleben (191). In einer Metaanalyse von Gooden et al. wird erneut deutlich, dass es wichtig ist Ratios der Immunzellmarker hinsichtlich ihrer Assoziation zu Outcome-Parametern zu untersuchen, statt einzelne Parameter auszuwerten. So können die komplexen Zusammenhänge und Interaktionen unter den Zellreihen im Immunzellinfiltrat sinnvoller abgebildet werden (123). Auch im Mammakarzinom (192, 193), sowie im hepatozellulären Karzinom (194) scheint eine hohe Anzahl FOXP3+ Zellen prognostisch ungünstig zu sein. Andere Autoren konnten in ihren Arbeiten keinen Zusammenhang zwischen Tregs und dem Outcome der Patienten nachweisen (179, 195, 196). Im kolorektalen Karzinom divergiert die Studienlage bezüglich des Einflusses von regulatorischen T-Zellen auf das Überleben deutlich. So konnten einige Autoren eine positive Assoziation zwischen hoher Dichte FOXP3+ Zellen und längerem Überleben nachweisen (197, 198). Der Review von Zhuo et al. liefert mögliche Erklärungen. Regulatorische T-Zellen lassen sich ihrerseits in Subgruppen einteilen, die unterschiedliche Funktionen erfüllen (199). Zudem spielt es eine Rolle, ob die Dichte FOXP3+ Zellen im Tumorgewebe oder im gesunden Gewebe betrachtet wird (200).

5.4.2.6 CD56+ Zellen (NK-Zellen) im Pankreaskarzinom

CD56 fungiert nicht nur als Marker der natürlichen Killerzellen (201), sondern färbt auch Schwann-Zellen an (202). Die Auswertung dieses Markers erfolgte daher manuell, semiquantitativ und nicht mittels automatischer Bildanalyse. Im Kollektiv konnten bei den Überlebenszeitanalysen der CD56+ Zellen keine signifikanten Korrelationen zum Outcome hergestellt werden. Patienten ohne CD56+ Zellen oder geringer Dichte CD56+ Zellen lebten etwas länger (13 und 25 Monate im Median), als solche mit moderater und hoher Dichte CD56+ Zellen (18 Monate und 1 Monat im Median). Die Rolle der NK-Zellen bei Patienten mit Pankreaskarzinom, aber auch in anderen Entitäten bleibt konträr. In einer Arbeit, in der die Anzahl von CD56+ Zellen im Blut mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde, zeigte, dass eine hohe Anzahl im Blut zirkulierender NK-Zellen mit einem verlängerten rezidivfreien Überleben einherging (203). Gegenteiliges fanden Yang et al. heraus. Hier war eine hohe Anzahl von NK-Zellen im Pankreaskarzinom mit einem signifikant schlechteren Überleben assoziiert. Dies könnte durch eine antiinflammatorische Antwort der Tumorzellen

bedingt sein (204). Naito et al. beschrieben in diesem Zusammenhang, dass CD56 in Pankreaskarzinomen ausschließlich im entzündlichen Gewebe der Tumorumgebung, nicht aber im Tumorgewebe selbst exprimiert wurde (205).

Im kolorektalen Karzinom (206), beim Magenkarzinom (207), sowie bei Nieren- (208) und Leberkarzinomen (166) war eine hohe Dichte von NK-Zellen mit einer guten Prognose assoziiert. Bei Untersuchungen am Mammakarzinom konnte keine Assoziation zwischen C56-Expression und Outcome beobachtet werden (209). Diese heterogenen Ergebnisse können damit erklärt werden, dass sich die Eigenschaften der NK-Zellen im Verlauf der Erkrankung, also mit fortschreitendem Tumorwachstum verändern. So ist es möglich, dass durch den Tumor sezernierter TGF- β NK-Zellen in einen anergen Zustand versetzt und deren antitumoröse Eigenschaften ausschaltet (210, 211).

Eine KRAS-induzierte Expression von NCAM kann zudem dazu führen, dass es zur Herabregulation von E-Cadherin und somit zur vermehrten Ausbreitung von Tumorzellen im Pankreaskarzinom kommt (212).

5.4.3 EMT-Marker im Pankreaskarzinom

5.4.3.1 ZEB1 im Pankreaskarzinom

Im vorliegenden Kollektiv konnten keine zuverlässig, reproduzierbaren Färbeargebnisse für ZEB1 erzielt werden. In vielen Cores kam es entweder zu keiner Anfärbung durch ZEB1, oder zur unspezifischen Anfärbung des gesamten Cores. An den wenigen, auswertbaren Cores färbte ZEB1 eher das Tumorstroma als das Tumorgewebe selbst. Lediglich ein Core zeigte ein stark ausgeprägtes, nukleäres Färbemuster im Tumorgewebe. Die Auswertung der Färbung erfolgte aufgrund der beschriebenen Problematik semiquantitativ, manuell. Dies gilt es bei der nachfolgenden Interpretation der Ergebnisse zu beachten. Patienten mit fehlender oder geringer Dichte ZEB1+ Zellen überlebten im Median 17 Monate. In der Gruppe mit moderater oder hoher Dichte ZEB1+ Zellen überlebten die Patienten über einen kürzeren Zeitraum (im Median 13,5 Monate). Im Log-Rank-Test zeigte sich keine Signifikanz.

In einigen Arbeiten ist die Rolle von ZEB1 im Pankreaskarzinom, vor allem im Hinblick auf die Prognose bereits gut beschrieben. In einem Array von Bronsert et al. an 117 Patienten war eine hohe Dichte ZEB1+Zellen mit einer schlechten Prognose assoziiert (213). Dort konnte die Expression von ZEB1 als unabhängiger prognostischer Marker nach Tumorresektion identifiziert werden (213). In einer Metaanalyse von Chen et al. wurde der prognostische Einfluss von ZEB1 in Tumoren des Verdauungstraktes anhand der Auswertung von 24 Studien zusammengefasst (214). Bemerkenswert ist, dass sich lediglich zwei der genannten Arbeiten mit Pankreaskarzinomen auseinandersetzen, was die weitere Notwendigkeit der Erforschung von ZEB1 im Pankreaskarzinom unterstreicht (214). Eine hohe Dichte ZEB1+ Zellen war hier mit einem kürzerem Gesamtüberleben assoziiert (214). In einer aktuellen Arbeit von Zawati et al. aus dem Jahr 2022 wurde ZEB1 als unabhängiger prognostischer Marker im Mammakarzinom identifiziert (215). In Bezug auf andere solide Tumoren wurde in einer Metaanalyse von Imani et al. der Einfluss EMT-induzierender Faktoren auf die Prognose beschrieben. Patienten mit hohen Levels EMT-induzierender Faktoren hatten eine schlechtere Prognose. Allerdings wies ZEB1 unter den untersuchten Markern die geringste Assoziation zu Outcome-Parametern auf. Marker wie Snail, Slug oder Twist erzielten signifikantere Ergebnisse (216).

Für weiterführende Analysen prognostischer Marker im Pankreaskarzinom, insbesondere im Hinblick auf EMT sollten in künftigen Arbeiten die Analysen mehrerer EMT-assoziiierter Marker und deren Korrelation untereinander in die Auswertung einfließen.

5.4.3.2 N-Cadherin

Bei der Epithelial-mesenchymalen-Transition nehmen Zellen mit epitheliale Charakter Züge von mesenchymalen Zellen an. Ein wesentlicher Aspekt dieser Transition ist der sogenannte *Cadherin-Switch*. Bei Cadherinen handelt es sich um Zell-Adhäsionsmoleküle. Der Verlust von E-Cadherin sorgt, dafür, dass Zellen den epithelialen Verbund verlassen und sich verteilen. E-Cadherin wird daher auch als potenter Tumorsuppressor beschrieben (155). Mit dem Verlust von E-Cadherin in den Tumorzellen geht die vermehrte Expression von N-Cadherin einher. Diese führt zum Wachstum und zur Migration von Tumorzellen. Zudem fördert N-Cadherin in Endothelzellen die tumorassoziierte Angiogenese (217). Zu erwarten wäre ein schlechterer Outcome für Patienten mit hoher Expression von N-Cadherin. Im hier untersuchten Kollektiv spiegelt sich diese Annahme wider. Bei fehlender oder geringer Anzahl N-Cadherin+ Zellen überlebten die Patienten im Median 19 und 13 Monate. Im Gegensatz dazu überlebten solche mit moderater Anzahl N-Cadherin+ Zellen 6,5 Monate im Median. Bei zwei Patienten wurde eine hohe Anzahl N-Cadherin+ Zellen detektiert. Ein Patient überlebte einen Monat, ein weiterer wurde nach 121 Monaten zensuriert. Zu diesen Patienten wären zur weiteren Beurteilbarkeit zusätzliche klinische Verlaufsdaten erforderlich. Ein signifikanter Unterschied der oben genannten Gruppen

konnte im Log-Rank-Test nicht nachgewiesen werden. Die Beobachtung, dass eine erhöhte Dichte N-Cadherin+ Zellen zu kürzerem Gesamtüberleben führt, wird in der Literatur auch für andere Entitäten beschrieben. Beim Gallenblasenkarzinom konnte beispielsweise eine Assoziation von hoher Expression von N-Cadherin mit fortgeschrittenem TNM-Stadium, lymphogener Metastasierung und schlechterem Gesamtüberleben beobachtet werden (218).

Eine Metaanalyse zur Rolle von E-Cadherin im kolorektalen Karzinom zeigte, dass eine niedrige Expression von E-Cadherin mit schlechter Prognose verbunden war (219). Ebenso konnte im Pankreaskarzinom eine verminderte Expression von E-Cadherin als unabhängiger prognostischer Marker für kürzeres Gesamtüberleben identifiziert werden (220). Am Mausmodell wurde der neue Wirkstoff ADH-1 (Exherin), ein Peptid, welches an N-Cadherin bindet und dieses blockiert, beim Pankreaskarzinom untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es hierdurch zur Induktion von Apoptose und zum verringerten Tumorwachstum und verminderter Lungenmetastasierung kommt (221). Eine weitere bedeutende Beobachtung zur Cadherin-Expression bei Tumoren des pankreatobiliären Systems findet sich in der Arbeit von Gerber et al. In den Untersuchungen wurde gezeigt, dass intrahepatische Cholangiokarzinome eine hohe Expression von N-Cadherin vorwiesen, wohingegen N-Cadherin im Pankreaskarzinom kaum, bis gar nicht exprimiert wurde (222). Diese Erkenntnis sollte auch in die Beurteilung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse einfließen. Es wurde bei der Auswahl der Schnitte nicht explizit auf die Lokalisation des gewonnenen Materials geachtet, sodass nicht gänzlich auszuschließen ist, dass auch ampulläre Anteile, und somit gegebenenfalls Gewebe, welches dem biliären System zuzuordnen wäre, analysiert wurde.

Auf eine zusätzliche Färbung von E-Cadherin wurde in dieser Arbeit verzichtet. Die Ergebnisse einer solchen Auswertung wären allerdings für die differenzierte Betrachtung des Cadherin-Switchs im Pankreaskarzinom interessant.

5.5 Möglichkeiten weitergehender Analysen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im Hinblick auf die Analyse der Immunzell-Marker sinnvoll ist, nicht nur einzelne Marker zu betrachten, sondern Ratios auszuwerten. Diese Herangehensweise bildet die komplexen Zusammenhänge im Immunzellinfiltrat und der Invasionsfront des Tumors adäquater ab. Zur Weiterführung der Analysen am Kollektiv ist zudem eine Betrachtung von Korrelationsanalysen der einzelnen Marker untereinander sinnvoll. Zusätzlich sollte analysiert werden, in welchem Zusammenhang die Anzahl der positiven Zellen einzelner Marker und klinisch-pathologische Daten wie TNM-Stadium, Grading oder Resektionsstatus zueinander stehen. Um bessere Aussagen über mögliche Zusammenhänge treffen zu können, ist es ebenfalls sinnvoll, weitere klinische Angaben, wie Informationen zu vorangegangenen Therapien, dem Operationsverfahren und der sich anschließenden Versorgung, miteinzubeziehen.

6 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom gehört nach wie vor zu den Tumoren mit der geringsten 5-Jahres-Überlebensrate. Die Kombination aus fehlenden spezifischen Frühsymptomen und Screeningverfahren stellen die Behandler vor eine große Herausforderung. Bei anderen Entitäten solider Tumoren, wie Kolonkarzinomen oder dem malignen Melanom, ließen sich in den vergangenen Jahren durch Immuntherapien Fortschritte hinsichtlich der Verbesserung von Prognose und Lebensqualität erzielen. Dies ist beim Pankreaskarzinom trotz großer Bemühungen bis dato nicht hinreichend gut gelungen. Daher ist es von Bedeutung weitere Erkenntnisse zur Tumorbilogie zu gewinnen. Durch eine Zuordnung der Tumoren in Subgruppen anhand histologischer und molekularer Merkmale könnten individuellere Therapieansätze etabliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden histologische Proben von 126 Patienten mit PDAC der Universitätsmedizin Mainz über einen Beobachtungszeitraum von etwa 10 Jahren analysiert.

Limitierend für die vorliegende Arbeit ist die retrospektive Erhebung der Daten, sowie das Fehlen wichtiger klinischer Angaben zu Therapie, Operationsverfahren und Outcome. Es erfolgte eine deskriptive Auswertung der histopathologischen Daten, die das in der Literatur zum PDAC befindliche Bild in Deutschland widerspiegeln. Die Tumormproben dieser Patienten wurden im Hinblick auf Immunzell- und EMT-Marker untersucht, um Korrelationen der Marker zu Überlebenszeitdaten herzustellen. Wie bereits erwähnt sind solche Untersuchungen unerlässlich, um künftig die Tumorumgebung besser charakterisieren zu können und grundlegende Daten für die Etablierung von Scoring-Systemen zu generieren. Selbstverständlich müssen diese Untersuchungen an größeren Kohorten, die die Grundgesamtheit besser abbilden, wiederholt werden. In dieser Studie ließen sich Unterschiede hinsichtlich des Überlebens zwischen verschiedenen Gruppen darstellen, die allerdings meist keine statistische Signifikanz aufwiesen.

Analyseverfahren, wie in-vitro-Analysen, Array-Verfahren zur Analyse der Vorgänge auf genetischer Ebene und Versuchsreihen an Zellkulturen können für weitergehende Analysen eine sinnvolle Ergänzung zur Erklärung der komplexen Vorgänge sein. Zudem wurden in dieser Arbeit Immunzell- und EMT-Marker isoliert betrachtet, was der Dynamik und den Wechselwirkungen in der Tumorumgebung nicht gänzlich gerecht wird.

Die Auswertung wurde unterstützt durch die digitale Bildanalyse. Dies ist ein nützliches Tool, um Auswertungen an großen Fallzahlen automatisiert und objektiviert durchzuführen. Allerdings lagen für die anschließende Auswertung im PDAC im Gegensatz zu anderen Tumoren keine etablierten, Cut-off-Werte vor, um Patienten in entsprechende Subgruppen zu unterteilen.

Signifikante Ergebnisse fanden sich in der Arbeit bei den Markern CD68 und FOXP3. CD68, als Marker von Monozyten und Makrophagen, war bei hoher Anzahl positiver Zellen mit signifikant längerem Überleben assoziiert. Die Literatur liefert hierzu unterschiedliche Angaben, was wiederum nahelegt, dass weitere Analysen zur Erklärung der Vorgänge notwendig sind.

Ein ebenfalls signifikantes Ergebnis lieferte die Analyse von FOXP3, Marker von regulatorischen T-Zellen. Patienten mit geringer Anzahl FOXP3+ Zellen lebten im Kollektiv signifikant länger. Dieses Ergebnis ist vor dem Hintergrund, dass regulatorische T-Zellen die antitumorale Immunantwort bremsen, erwartbar. In der Literatur finden sich allerdings auch hier unterschiedliche Antworten. Wichtig zu erwähnen bleibt an dieser Stelle, dass in den meisten Arrays mit Quotienten von Immunzellen gearbeitet wurde. Diese Herangehensweise sollte für weitere Untersuchungen an diesem Kollektiv ebenfalls Anwendung finden.

Die Stärke der vorliegenden Arbeit ergibt sich aus einer umfangreichen Stichprobengröße von mehr als 100 Patienten, sowie einem ausgedehnten Beobachtungszeitraum, welcher eine fundierte Analyse ermöglicht. Darüber hinaus wurde bei den Analysen eine Vielzahl unterschiedlicher Marker berücksichtigt, die das

komplexe Zusammenspiel bei der Tumorentstehung und Metastasierung im Pankreaskarzinom zumindest ansatzweise abzubilden vermögen. Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit die bedeutende Rolle von Markern der Epithelial-mesenchymalen Transition, sowie des Immunzellinfiltrats im Kontext des Pankreaskarzinoms unterstreichen. Um eine differenziertere Zuordnung von Patienten zu prognostischen und therapeutischen Subgruppen zu ermöglichen, sind weiterführende Untersuchungen des komplexen Zusammenspiels dieser Prozesse in Bezug auf das klinische Outcome bei Pankreaskarzinomen erforderlich.

7 Literaturverzeichnis

1. Klimstra D, Klöppel G. Tumors of the Exocrine Pancreas. In: C. F, editor. Diagnostic Histopathology of Tumors. 4th ed. p. 531-49.
2. Grant TJ, Hua K, Singh A. Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. Prognostic Molecular Biological Translational Science. 2016;144:241-75.
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. 2024;Langversion 3.1.
4. Pflüger MJ, Brosens LAA, Hruban RH. Precursor lesions in familial and hereditary pancreatic cancer. Fam Cancer. 2024;23(3):267-78.
5. Klöppel G. Histologische Klassifikation der Pankreastumoren. In: Lehnert H, Märker-Hermann E, Marx N, Meyhöfer SM, editors. DGIM Innere Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020. p. 1-5.
6. Krebs in Deutschland für 2019/2020 [Internet]. Robert Koch-Institut. 2023 [cited 20.10.2024]. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html.
7. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. World Journal of Gastroenterology. 2016;22(44):9694-705.
8. Lippi G, Mattiuzzi C. The global burden of pancreatic cancer. Arch Med Sci. 2020;16(4):820-4.
9. Halbrook CJ, Lyssiotis CA, Pasca di Magliano M, Maitra A. Pancreatic cancer: Advances and challenges. Cell. 2023;186(8):1729-54.
10. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. Onkopedia Leitlinie Pankreaskarzinom 2018 [Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/pankreaskarzinom/@@guideline/html/index.html>].
11. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. Cancer Research. 2014;74(11):2913-21.
12. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS, et al. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. World Journal of Gastroenterology. 2018;24(43):4846-61.
13. Kunzmann V, Siveke JT, Algül H, Goekkurt E, Siegler G, Martens U, et al. Nab-paclitaxel plus gemcitabine versus nab-paclitaxel plus gemcitabine followed by FOLFIRINOX induction chemotherapy in locally advanced pancreatic cancer (NEOLAP-AIO-PAK-0113): a multicentre, randomised, phase 2 trial. Lancet Gastroenterology and Hepatology. 2021;6(2):128-38.
14. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, Petersen G, Bracci PM, Ji BT, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). Ann Oncol. 2012;23(7):1880-8.
15. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. Langenbecks Archives of Surgery. 2008;393(4):535-45.
16. Yuan C, Morales-Oyarvide V, Babic A, Clish CB, Kraft P, Bao Y, et al. Cigarette Smoking and Pancreatic Cancer Survival. Journal of Clinical Oncology. 2017;35(16):1822-8.
17. Wang X, Wang Z, Wang X. Passive smoking and risk of pancreatic cancer: an updated systematic review and meta-analysis. PeerJ. 2024;12:e18017.
18. Lee PN, Thornton AJ, Hamling JS. Epidemiological evidence on environmental tobacco smoke and cancers other than lung or breast. Regul Toxicol Pharmacol. 2016;80:134-63.
19. Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, Bergkvist L, Bernstein L, van den Brandt PA, et al. Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of

- fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2009;18(3):765-76.
20. Wang YT, Gou YW, Jin WW, Xiao M, Fang HY. Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer*. 2016;16:212.
21. WCRF WCRF. Pancreatic Cancer Report <https://www.wcrf.org/wp-content/uploads/2021/02/pancreatic-cancer-report.pdf> [Available from: <https://www.wcrf.org/wp-content/uploads/2021/02/pancreatic-cancer-report.pdf>].
22. Stevens RJ, Roddam AW, Beral V. Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 2007;96(3):507-9.
23. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *British Journal of Cancer*. 2005;92(11):2076-83.
24. Andersen DK, Korc M, Petersen GM, Eibl G, Li D, Rickels MR, et al. Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer. *Diabetes*. 2017;66(5):1103-10.
25. Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice Research Clinical Gastroenterology*. 2010;24(3):349-58.
26. Machicado JD, Rebours V, Yadav D. Epidemiology of chronic pancreatitis. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*. 2016.
27. Wolpin BM, Chan AT, Hartge P, Chanock SJ, Kraft P, Hunter DJ, et al. ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(6):424-31.
28. Memba R, Duggan SN, Ni Chonchubhair HM, Griffin OM, Bashir Y, O'Connor DB, et al. The potential role of gut microbiota in pancreatic disease: A systematic review. *Pancreatology*. 2017;17(6):867-74.
29. Orphanet. Familial pancreatic carcinoma Internet [Available from: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/1333#:~:text=The%20main%20symptoms%20are%20non,advanced%20stages%20of%20the%20disease>].
30. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Herold; 2018.
31. Lee ES, Lee JM. Imaging diagnosis of pancreatic cancer: a state-of-the-art review. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(24):7864-77.
32. Motosugi U, Ichikawa T, Morisaka H, Sou H, Muhi A, Kimura K, et al. Detection of pancreatic carcinoma and liver metastases with gadoteric acid-enhanced MR imaging: comparison with contrast-enhanced multi-detector row CT. *Radiology*. 2011;260(2):446-53.
33. Niederau C, Grendell JH. Diagnosis of pancreatic carcinoma. Imaging techniques and tumor markers. *Pancreas*. 1992;7(1):66-86.
34. Vozzo CF, Sanaka MR. Endoscopic Management of Pancreaticobiliary Disease. *Surgical Clinics of North America*. 2020;100(6):1151-68.
35. Adamek HE, Albert J, Breer H, Weitz M, Schilling D, Riemann JF. Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study. *The Lancet*. 2000;356(9225):190-3.
36. Zhao B, Zhao B, Chen F. Diagnostic value of serum carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2022;34(9):891-904.
37. Nazli O, Bozdogan AD, Tansug T, Kir R, Kaymak E. The diagnostic importance of CEA and CA 19-9 for the early diagnosis of pancreatic carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2000;47(36):1750-2.
38. Lanki M, Seppänen H, Mustonen H, Salmiheimo A, Stenman UH, Salmi M, et al. Pancreatic cancer survival prediction via inflammatory serum markers. *Cancer Immunol Immunother*. 2022;71(9):2287-92.
39. Bergquist JR, Puig CA, Shubert CR, Groeschl RT, Habermann EB, Kendrick ML, et al. Carbohydrate Antigen 19-9 Elevation in Anatomically Resectable, Early

Stage Pancreatic Cancer Is Independently Associated with Decreased Overall Survival and an Indication for Neoadjuvant Therapy: A National Cancer Database Study. *J Am Coll Surg.* 2016;223(1):52-65.

40. Ritts RE, Pitt HA. CA 19-9 in pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 1998;7(1):93-101.
41. Distler M, Pilarsky E, Kersting S, Grützmann R. Preoperative CEA and CA 19-9 are prognostic markers for survival after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas - a retrospective tumor marker prognostic study. *International Journal of Surgery.* 2013;11(10):1067-72.
42. De Rosa A, Cameron IC, Gomez D. Indications for staging laparoscopy in pancreatic cancer. *HPB (Oxford).* 2016;18(1):13-20.
43. Owens DK, Davidson KW, Krist AH, Barry MJ, Cabana M, Caughey AB, et al. Screening for Pancreatic Cancer: US Preventive Services Task Force Reaffirmation Recommendation Statement. *Jama.* 2019;322(5):438-44.
44. Gesundheit Bf. ICD-Code, C25: Bösartige Neubildung des Pankreas gesund.bund.de: Bundesministerium für Gesundheit; 2024 [Available from: <https://gesund.bund.de/icd-code-suche/c25>].
45. Cong L, Liu Q, Zhang R, Cui M, Zhang X, Gao X, et al. Tumor size classification of the 8(th) edition of TNM staging system is superior to that of the 7(th) edition in predicting the survival outcome of pancreatic cancer patients after radical resection and adjuvant chemotherapy. *Sci Rep.* 2018;8(1):10383.
46. Strobel O, Büchler MW. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A New TNM Staging System Is Needed! *Ann Surg.* 2017;266(6):e109-e110.
47. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology.* 2020;76(2):182-8.
48. Wasif N, Ko CY, Farrell J, Wainberg Z, Hines OJ, Reber H, et al. Impact of tumor grade on prognosis in pancreatic cancer: should we include grade in AJCC staging? *Ann Surg Oncol.* 2010;17(9):2312-20.
49. Ormanns S, Esposito I, Siveke J, Kirchner T, Neumann J. Pathologie und Molekularpathologie des Pankreaskarzinoms. *Trillium Krebsmedizin.* 2014;23(3).
50. Wittekind C. TNM Klassifikation Maligner Tumoren : Korrigierter Nachdruck 2020 Mit Allen Ergänzungen der UICC Aus Den Jahren 2017 Bis 2019. Newark, GERMANY: John Wiley & Sons, Incorporated; 2020.
51. Chang DK, Johns AL, Merrett ND, Gill AJ, Colvin EK, Scarlett CJ, et al. Margin clearance and outcome in resected pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(17):2855-62.
52. Verbeke CS. Resection margins and R1 rates in pancreatic cancer--are we there yet? *Histopathology.* 2008;52(7):787-96.
53. Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. *Jama.* 2021;326(9):851-62.
54. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2011;378(9791):607-20.
55. Schuhbaur J, Surovtsova I, Seufferlein T, Kokh D, Szotyori-Artz G, Winzler C, et al. Prognostic value of the CRM-status in pancreatic ductal adenocarcinoma - data from a regional cancer registry. *BMC Cancer.* 2024;24(1):1280.
56. Isaji S, Mizuno S, Windsor JA, Bassi C, Fernández-Del Castillo C, Hackert T, et al. International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatology.* 2018;18(1):2-11.
57. Karanicolas PJ, Davies E, Kunz R, Briel M, Koka HP, Payne DM, et al. The pylorus: take it or leave it? Systematic review and meta-analysis of pylorus-preserving versus standard whipple pancreaticoduodenectomy for pancreatic or periampullary cancer. *Annals of Surgical Oncology.* 2007;14(6):1825-34.
58. Diener MK, Knaebel HP, Heukaufer C, Antes G, Büchler MW, Seiler CM. A systematic review and meta-analysis of pylorus-preserving versus classical pancreaticoduodenectomy for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. *Ann Surg.* 2007;245(2):187-200.

59. Excellence NifHaC. Pancreatic cancer in adults: diagnosis and management NICE

Guideline National Institute for Health and Care Excellence2018 [Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng85>].

60. Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Büschenfelde C, Friess H, Kleeff J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med.* 2010;7(4):e1000267.

61. Assifi MM, Lu X, Eibl G, Reber HA, Li G, Hines OJ. Neoadjuvant therapy in pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of phase II trials. *Surgery.* 2011;150(3):466-73.

62. Ueno H, Kosuge T, Matsuyama Y, Yamamoto J, Nakao A, Egawa S, et al. A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Br J Cancer.* 2009;101(6):908-15.

63. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, et al. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(25):2395-406.

64. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *Jama.* 2013;310(14):1473-81.

65. Stocken DD, Büchler MW, Dervenis C, Bassi C, Jeekel H, Klinkenbijn JH, et al. Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2005;92(8):1372-81.

66. Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, et al. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2001;358(9293):1576-85.

67. Yip D, Karapetis C, Strickland A, Steer CB, Goldstein D. Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(3):Cd002093.

68. Tonini V, Zanni M. Pancreatic cancer in 2021: What you need to know to win. *World Journal of Gastroenterol.* 2021;27(35):5851-89.

69. Cameron JL, Riall TS, Coleman J, Belcher KA. One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies. *Annals of Surgery.* 2006;244(1):10-5.

70. Kalsner MH, Barkin J, MacIntyre JM. Pancreatic cancer. Assessment of prognosis by clinical presentation. *Cancer.* 1985;56(2):397-402.

71. Kamarajah SK, Burns WR, Frankel TL, Cho CS, Nathan H. Validation of the American Joint Commission on Cancer (AJCC) 8th Edition Staging System for Patients with Pancreatic Adenocarcinoma: A Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Analysis. *Annals of Surgical Oncology.* 2017;24(7):2023-30.

72. Pishvaian MJ, Blais EM, Brody JR, Lyons E, DeArbeloa P, Hendifar A, et al. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(4):508-18.

73. Belyaev O. UW. Pankreaskarzinom - Pathologie, Ätiologie und diagnostisches Vorgehen. *Allgemein- und Viszeralchirurgie up2date.* 2019;6/2019.

74. Hruban RH, Gaida MM, Thompson E, Hong SM, Noë M, Brosens LA, et al. Why is pancreatic cancer so deadly? The pathologist's view. *Journal of Pathology.* 2019;248(2):131-41.

75. Takahashi T, Ishikura H, Motohara T, Okushiba S, Dohke M, Katoh H. Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas. *J Surg Oncol.* 1997;65(3):164-70.

76. Mayer P, Gaida MM. [The microarchitecture of pancreatic cancer from the point of view of the pathologist and the radiologist]. *Pathologe.* 2021;42(5):524-9.

77. Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(16):4266-76.
78. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2014;371(22):2140-1.
79. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-32.
80. Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, et al. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*. 2012;142(4):730-3.e9.
81. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(10):731-7.
82. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol*. 2003;16(9):902-12.
83. Eischen CM. Genome Stability Requires p53. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(6).
84. R. L-R. Taschenlehrbuch Histologie. 5. vollständig überarbeitete Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2015.
85. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *Journal of Cell Biology*. 1982;95(1):333-9.
86. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(6):1420-8.
87. Beuran M, Negoii I, Paun S, Ion AD, Bleotu C, Negoii RI, et al. The epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer: A systematic review. *Pancreatology*. 2015;15(3):217-25.
88. Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev*. 2003;120(11):1351-83.
89. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1417-9.
90. Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*. 2008;27(55):6958-69.
91. Martin AC, Kaschube M, Wieschaus EF. Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature*. 2009;457(7228):495-9.
92. Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(12):2153-60.
93. Gavert N, Ben-Ze'ev A. beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem*. 2007;102(4):820-8.
94. Aiello N, Brabletz T, Kang Y, Nieto MA, Weinberg RA, Stanger BZ, et al. Upholding a role for EMT in pancreatic cancer metastasis. *Nature*. 2017;547(7661):E7-E8.
95. Brabletz T, Jung A, Hermann K, Günther K, Hohenberger W, Kirchner T. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract*. 1998;194(10):701-4.
96. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10356-61.
97. Brierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nature Review Cancer*. 2006;6(7):506-20.
98. Grosse-Steffen T, Giese T, Giese N, Longerich T, Schirmacher P, Hänsch GM, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma and pancreatic tumor cell lines: the role of neutrophils and neutrophil-derived elastase. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:720768.

99. Gaijanigo N, Melisi D, Carbone C. EMT and Treatment Resistance in Pancreatic Cancer. *Cancers*. 2017;9(9).
100. Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Research*. 2009;69(14):5820-8.
101. Wellner U, Brabletz T, Keck T. ZEB1 in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2010;2(3):1617-28.
102. Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, et al. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene*. 2007;26(49):6979-88.
103. Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, Higashi Y, Dean DC. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development*. 2008;135(3):579-88.
104. Krebs AM, Mitschke J, Lasierra Losada M, Schmalhofer O, Boerries M, Busch H, et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nature Cell Biology*. 2017;19(5):518-29.
105. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*. 2015;527(7579):525-30.
106. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
107. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
108. Vandewalle C, Van Roy F, Berx G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(5):773-87.
109. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol*. 2009;11(12):1487-95.
110. Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Reports*. 2010;11(9):670-7.
111. Brabletz T. MiR-34 and SNAIL: another double-negative feedback loop controlling cellular plasticity/EMT governed by p53. *Cell Cycle*. 2012;11(2):215-6.
112. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep*. 2008;9(6):582-9.
113. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*. 2015;527(7579):472-6.
114. Aiello NM, Brabletz T, Kang Y, Nieto MA, Weinberg RA, Stanger BZ, et al. Upholding a role for EMT in pancreatic cancer metastasis. *Nature*. 2017;547(7661):E7-E8.
115. Brabletz S, Brabletz T, Stemmler MP. Road to perdition: Zeb1-dependent and -independent ways to metastasis. *Cell Cycle*. 2017;16(19):1729-30.
116. Bronsert P, Enderle-Ammour K, Bader M, Timme S, Kuehs M, Csanadi A, et al. Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface. *Journal of Pathology*. 2014;234(3):410-22.
117. Kohler I, Bronsert P, Timme S, Werner M, Brabletz T, Hopt UT, et al. Detailed analysis of epithelial-mesenchymal transition and tumor budding identifies predictors of long-term survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2015;30:78-84.
118. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today*. 1997;18(6):267-8.
119. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Laboratory Investigation*. 2006;86(3):231-45.
120. Wang J, Gong R, Zhao C, Lei K, Sun X, Ren H. Human FOXP3 and tumour microenvironment. *Immunology*. 2023;168(2):248-55.

121. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
122. Orhan A, Vogelsang RP, Andersen MB, Madsen MT, Hölmich ER, Raskov H, et al. The prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2020;132:71-84.
123. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 2011;105(1):93-103.
124. Mahajan UM, Langhoff E, Goni E, Costello E, Greenhalf W, Halloran C, et al. Immune Cell and Stromal Signature Associated With Progression-Free Survival of Patients With Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2018;155(5):1625-39.e2.
125. Nejati R, Goldstein JB, Halperin DM, Wang H, Hejazi N, Rashid A, et al. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Treated With Neoadjuvant Chemotherapy. *Pancreas*. 2017;46(9):1180-7.
126. Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2004;28(1):e26-31.
127. Hu L, Zhu M, Shen Y, Zhong Z, Wu B. The prognostic value of intratumoral and peritumoral tumor-infiltrating FoxP3+Treg cells in of pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology*. 2021;19(1):300.
128. Delayre T, Guilbaud T, Resseguier N, Mamessier E, Rubis M, Moutardier V, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating lymphocytes and cancer-associated fibroblasts in patients with pancreatic adenocarcinoma of the body and tail undergoing resection. *British Journal of Surgery*. 2020;107(6):720-33.
129. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y, et al. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *British Journal of Surgery*. 2013;108(4):914-23.
130. Karakhanova S, Ryschich E, Mosl B, Harig S, Jäger D, Schmidt J, et al. Prognostic and predictive value of immunological parameters for chemoradioimmunotherapy in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2015;112(6):1027-36.
131. Dallavalasa S, Beeraka NM, Basavaraju CG, Tulimilli SV, Sadhu SP, Rajesh K, et al. The Role of Tumor Associated Macrophages (TAMs) in Cancer Progression, Chemoresistance, Angiogenesis and Metastasis - Current Status. *Curr Med Chem*. 2021;28(39):8203-36.
132. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*. 2017;97(1):4-13.
133. Jakovic LR, Mihaljevic BS, Perunicic Jovanovic MD, Bogdanovic AD, Andjelic BM, Bumbasirevic VZ. The prognostic relevance of tumor associated macrophages in advanced stage classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*. 2011;52(10):1913-9.
134. Li S, Xu F, Zhang J, Wang L, Zheng Y, Wu X, et al. Tumor-associated macrophages remodeling EMT and predicting survival in colorectal carcinoma. *Oncoimmunology*. 2018;7(2):e1380765.
135. Koelzer VH, Canonica K, Dawson H, Sokol L, Karamitopoulou-Diamantis E, Lugli A, et al. Phenotyping of tumor-associated macrophages in colorectal cancer: Impact on single cell invasion (tumor budding) and clinicopathological outcome. *Oncoimmunology*. 2016;5(4):e1106677.
136. Boström MM, Irjala H, Mirtti T, Taimen P, Kauko T, Ålgars A, et al. Tumor-Associated Macrophages Provide Significant Prognostic Information in Urothelial Bladder Cancer. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133552.

137. Zhou W, Ke SQ, Huang Z, Flavahan W, Fang X, Paul J, et al. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol.* 2015;17(2):170-82.
138. Molina-Cerrillo J, Alonso-Gordoa T, Garrido P. Tumor-associated macrophages: "Good cop-bad cop". *Cancer.* 2019;125(11):1941-2.
139. Vogel DY, Glim JE, Stavenuiter AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology.* 2014;219(9):695-703.
140. Ouled Dhaou M, Kossai M, Morel AP, Devouassoux-Shisheboran M, Puisieux A, Penault-Llorca F, et al. Zeb1 expression by tumor or stromal cells is associated with spatial distribution patterns of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes: a hypothesis-generating study on 113 triple negative breast cancers. *American Journal of Cancer Research.* 2020;10(10):3370-81.
141. Yang S, Liu Y, Li MY, Ng CSH, Yang SL, Wang S, et al. FOXP3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer.* 2017;16(1):124.
142. Jiang Y, Du Z, Yang F, Di Y, Li J, Zhou Z, et al. FOXP3+ lymphocyte density in pancreatic cancer correlates with lymph node metastasis. *PLoS One.* 2014;9(9):e106741.
143. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol.* 2001;195(1):72-9.
144. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998;4(7):844-7.
145. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *International Journal of Cancer.* 2001;94(1):1-5.
146. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine.* 1998;4(7):844-7.
147. Welcher R. Automatisierung in der Immunhistochemie. In: Boenisch T, editor. *Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden.* 3rd ed. Carpinteria, Hamburg: Dako North America, Inc.; 2006. p. 53-5.
148. Boenisch T. Antikörper. In: Boenisch T, editor. *Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden.* 3rd ed. Carpinteria, Hamburg: Dako North America, Inc.; 2006. p. 5-14.
149. Boenisch T. Grundlagen der Immunchemie. In: Boenisch T, editor. *Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden.* 3rd ed. Carpinteria, Hamburg: Dako North America, Inc.; 2006. p. 14-8.
150. Boenisch T. Färbemethoden-Detektionssysteme. In: Boenisch T, editor. *Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden.* 3rd ed. Carpinteria, Hamburg: Dako North America, Inc.; 2006. p. 34-43.
151. Actor JK. Chapter 1 - A Functional Overview of the Immune System and Immune Components,. In: Actor JK, editor. *Introductory Immunology.* Academic Press: Academic Press; 2014. p. 1-15.
152. S. A. Immunsystem. In: Löffler G. PPE, Heinrich P.C., editor. *Biochemie und Pathobiochemie.* Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2007.
153. Scott CL, Omilusik KD. ZEBs: Novel Players in Immune Cell Development and Function. *Trends Immunol.* 2019;40(5):431-46.
154. Gul IS, Hulpiau P, Saeys Y, van Roy F. Evolution and diversity of cadherins and catenins. *Exp Cell Res.* 2017;358(1):3-9.
155. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells.* 2019;8(10).
156. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front Immunol.* 2017;8:892.

157. Kumar N, Gupta R, Gupta S. Whole Slide Imaging (WSI) in Pathology: Current Perspectives and Future Directions. *J Digit Imaging*. 2020;33(4):1034-40.
158. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):16878.
159. Armstrong RA. When to use the Bonferroni correction. *Ophthalmic and Physiological Optics*. 2014;34(5):502-8.
160. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Györfy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, et al. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One*. 2012;7(12):e51862.
161. Buttarazzi D, Pandolfo G, Porzio GC. A boxplot for circular data. *Biometrics*. 2018;74(4):1492-501.
162. Nikšić M, Minicozzi P, Weir HK, Zimmerman H, Schymura MJ, Rees JR, et al. Pancreatic cancer survival trends in the US from 2001 to 2014: a CONCORD-3 study. *Cancer Commun (Lond)*. 2023;43(1):87-99.
163. Allen P, Kuk D, Castillo CF, Basturk O, Wolfgang CL, Cameron JL, et al. Multi-institutional Validation Study of the American Joint Commission on Cancer (8th Edition) Changes for T and N Staging in Patients With Pancreatic Adenocarcinoma. *Annals of Surgery*. 2017;265(1):185-91.
164. Li X, Liu Z, Ye Z, Gou S, Wang C. Impact of age on survival of patients with pancreatic cancer after surgery: Analysis of SEER data. *Pancreatology*. 2018;18(1):133-8.
165. van Roessel S, Kasumova GG, Verheij J, Najarian RM, Maggino L, de Pastena M, et al. International Validation of the Eighth Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging System in Patients With Resected Pancreatic Cancer. *JAMA Surgery*. 2018;153(12):e183617.
166. Zhu LY, Zhou J, Liu YZ, Pan WD. Prognostic significance of natural killer cell infiltration in hepatocellular carcinoma. *Ai Zheng = Chinese Journal of Cancer*. 2009;28(11):1198-202.
167. Gu J, Xu Z, Ma Y, Chen H, Wang D, Deng X, et al. Surgical resection of metastatic pancreatic cancer: is it worth it?-a 15-year experience at a single Chinese center. *J Gastrointest Oncol*. 2020;11(2):319-28.
168. Bellon E, Gebauer F, Tachezy M, Izbicki JR, Bockhorn M. Pancreatic cancer and liver metastases: state of the art. *Updates Surg*. 2016;68(3):247-51.
169. Hlavsa J, Cecka F, Zaruba P, Zajak J, Gurlich R, Strnad R, et al. Tumor grade as significant prognostic factor in pancreatic cancer: validation of a novel TNMG staging system. *Neoplasma*. 2018;65(4):637-43.
170. Rochefort MM, Ankeny JS, Kadera BE, Donald GW, Isacoff W, Wainberg ZA, et al. Impact of tumor grade on pancreatic cancer prognosis: validation of a novel TNMG staging system. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(13):4322-9.
171. Kaltenmeier C, Nassour I, Hoehn RS, Khan S, Althans A, Geller DA, et al. Impact of Resection Margin Status in Patients with Pancreatic Cancer: a National Cohort Study. *J Gastrointest Surg*. 2021;25(9):2307-16.
172. Kim KS, Kwon J, Kim K, Chie EK. Impact of Resection Margin Distance on Survival of Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Res Treat*. 2017;49(3):824-33.
173. Leonhardt CS, Hank T, Pils D, Gustorff C, Sahara K, Schindl M, et al. Prognostic impact of resection margin status on survival after neoadjuvant treatment for pancreatic cancer: systematic review and meta-analysis. *Int J Surg*. 2024;110(1):453-63.
174. Ren X, Wei X, Ding Y, Qi F, Zhang Y, Hu X, et al. Comparison of neoadjuvant therapy and upfront surgery in resectable pancreatic cancer: a meta-analysis and systematic review. *Onco Targets Ther*. 2019;12:733-44.
175. Beger HGR, Bettina; Gansauge, Frank; Leder, Gerd; Schwarz, Michael; Poch, Bertram. Bauchspeicheldrüsenkrebs – Heilungschancen minimal. *Deutsches Ärzteblatt*. 2008;105(14):255-62.

176. Society AC. Pancreatic Cancer: American Cancer Society; 2023 [updated March 2023; cited 2023 05.111.2023]. Survival Rates for pancreatic cancer]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.
177. Sherman MH, Beatty GL. Tumor Microenvironment in Pancreatic Cancer Pathogenesis and Therapeutic Resistance. *Annu Rev Pathol.* 2023;18:123-48.
178. Çorbacı K, Gurleyik MG, Gonultas A, Aker F, Gul MO, Tilki M. Evaluation of prognostic significance of histopathological characteristics and tumor-infiltrating lymphocytes for pancreatic cancer survival. *Sci Rep.* 2024;14(1):27392.
179. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer.* 2012;12(4):298-306.
180. Hwang HK, Kim HI, Kim SH, Choi J, Kang CM, Kim KS, et al. Prognostic impact of the tumor-infiltrating regulatory T-cell (Foxp3(+))/activated cytotoxic T lymphocyte (granzyme B(+)) ratio on resected left-sided pancreatic cancer. *Oncol Lett.* 2016;12(6):4477-84.
181. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):486-99.
182. Zhu Q, Yang Y, Deng X, Chao N, Chen Z, Ye Y, et al. High CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes indicate severe exhaustion and poor prognosis in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Front Immunol.* 2023;14:1228004.
183. Rong D, Sun G, Zheng Z, Liu L, Chen X, Wu F, et al. MGP promotes CD8(+) T cell exhaustion by activating the NF-κB pathway leading to liver metastasis of colorectal cancer. *Int J Biol Sci.* 2022;18(6):2345-61.
184. Feng D, Pu D, Ren J, Liu M, Zhang Z, Liu Z, et al. CD8(+) T-cell exhaustion: Impediment to triple-negative breast cancer (TNBC) immunotherapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2024;1879(6):189193.
185. Saka D, Gökalp M, Piyade B, Cevik NC, Arik Sever E, Unutmaz D, et al. Mechanisms of T-Cell Exhaustion in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(8).
186. Diana A, Wang LM, D'Costa Z, Azad A, Silva MA, Soonawalla Z, et al. Prognostic role and correlation of CA9, CD31, CD68 and CD20 with the desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(45):72819-32.
187. Barros MH, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One.* 2013;8(11):e80908.
188. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol.* 2020;11:583084.
189. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057-61.
190. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 2006;12(18):5423-34.
191. de Jong RA, Leffers N, Boezen HM, ten Hoor KA, van der Zee AG, Hollema H, et al. Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2009;114(1):105-10.
192. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006;24(34):5373-80.
193. Qian F, Qingping Y, Linqun W, Xiaojin H, Rongshou W, Shanshan R, et al. High tumor-infiltrating FoxP3(+) T cells predict poor survival in estrogen receptor-positive breast cancer: A meta-analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2017;43(7):1258-64.
194. Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology.* 2007;132(7):2328-39.

195. Grabenbauer GG, Lahmer G, Distel L, Niedobitek G. Tumor-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(11 Pt 1):3355-60.
196. Loddenkemper C, Schernus M, Noutsias M, Stein H, Thiel E, Nagorsen D. In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. *J Transl Med.* 2006;4:52.
197. Lee WS, Park S, Lee WY, Yun SH, Chun HK. Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes for survival in stage II colon cancer. *Cancer.* 2010;116(22):5188-99.
198. Noshok K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol.* 2010;222(4):350-66.
199. Zhuo C, Xu Y, Ying M, Li Q, Huang L, Li D, et al. FOXP3+ Tregs: heterogeneous phenotypes and conflicting impacts on survival outcomes in patients with colorectal cancer. *Immunol Res.* 2015;61(3):338-47.
200. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(2):186-92.
201. Martinez AL, Shannon MJ, Sloan T, Mace EM. CD56/NCAM mediates cell migration of human NK cells by promoting integrin-mediated adhesion turnover. *Mol Biol Cell.* 2024;35(5):ar64.
202. Liu Z, Jin YQ, Chen L, Wang Y, Yang X, Cheng J, et al. Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123278.
203. Fincham REA, Delvecchio FR, Goulart MR, Yeong JPS, Kocher HM. Natural killer cells in pancreatic cancer stroma. *World J Gastroenterol.* 2021;27(24):3483-501.
204. Yang C, Cheng H, Zhang Y, Fan K, Luo G, Fan Z, et al. Anergic natural killer cells educated by tumor cells are associated with a poor prognosis in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(12):1815-23.
205. Naito Y, Kinoshita H, Okabe Y, Kawahara R, Sakai T, Suga H, et al. CD56 (NCAM) expression in pancreatic carcinoma and the surrounding pancreatic tissue. *Kurume Med J.* 2006;53(3-4):59-62.
206. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer.* 1997;79(12):2320-8.
207. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer.* 2000;88(3):577-83.
208. Donskov F, von der Maase H. Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(13):1997-2005.
209. Niknam K, Safaei A, Ghaderi A. Evaluation of the Prognostic Value of CD56 (140 kDa Isoform) Expression in Breast Cancer Tissues: an Eight-Year Retrospective Study. *Iran Biomed J.* 2022;26(3):175-82.
210. Mamessier E, Sylvain A, Thibault ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest.* 2011;121(9):3609-22.
211. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* 2011;71(16):5412-22.
212. Schreiber SC, Giehl K, Kastilan C, Hasel C, Mühlhoff M, Adler G, et al. Polysialylated NCAM represses E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic tumor cells. *Gastroenterology.* 2008;134(5):1555-66.
213. Bronsert P, Kohler I, Timme S, Kiefer S, Werner M, Schilling O, et al. Prognostic significance of Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) expression

- in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer. *Surgery*. 2014;156(1):97-108.
214. Chen H, Lu W, Huang C, Ding K, Xia D, Wu Y, et al. Prognostic significance of ZEB1 and ZEB2 in digestive cancers: a cohort-based analysis and secondary analysis. *Oncotarget*. 2017;8(19):31435-48.
215. Zawati I, Jlassi A, Adouni O, Nouira M, Manai M, Rahal K, et al. Association of ZEB1 and Vimentin with poor prognosis in metaplastic breast cancer. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2022;59:151954.
216. Imani S, Hosseinifard H, Cheng J, Wei C, Fu J. Prognostic Value of EMT-inducing Transcription Factors (EMT-TFs) in Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep*. 2016;6:28587.
217. Mariotti A, Perotti A, Sessa C, Rüegg C. N-cadherin as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16(4):451-65.
218. Yi S, Yang ZL, Miao X, Zou Q, Li J, Liang L, et al. N-cadherin and P-cadherin are biomarkers for invasion, metastasis, and poor prognosis of gallbladder carcinomas. *Pathol Res Pract*. 2014;210(6):363-8.
219. Chang K, Jiang L, Sun Y, Li H. Effect of E-cadherin on Prognosis of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis Update. *Mol Diagn Ther*. 2022;26(4):397-409.
220. Wang W, Dong L, Zhao B, Lu J, Zhao Y. E-cadherin is downregulated by microenvironmental changes in pancreatic cancer and induces EMT. *Oncol Rep*. 2018;40(3):1641-9.
221. Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, Wheelock MJ, et al. ADH-1 suppresses N-cadherin-dependent pancreatic cancer progression. *Int J Cancer*. 2008;122(1):71-7.
222. Gerber TS, Goepfert B, Hausen A, Witzel HR, Bartsch F, Schindeldecker M, et al. N-Cadherin Distinguishes Intrahepatic Cholangiocarcinoma from Liver Metastases of Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas. *Cancers (Basel)*. 2022;14(13).

8 Danksagung

Hiermit möchte ich mich recht herzlich bei allen Personen, die zum Gelingen dieser Promotion beigetragen haben, bedanken.

9 Lebenslauf