

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und
Transplantationschirurgie der Medizinischen Fakultät der Otto-
von-Guericke-Universität Magdeburg

**Retrospektive Evaluation von CD8 als molekularer Marker
zur Abschätzung der Lokalisation eines Tumorrezidivs und
der Prognose beim Pankreaskarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-
Universität Magdeburg

vorgelegt von

Malte Suchan

aus Tübingen

Magdeburg 2023

Bibliographische Beschreibung

Suchan, Malte:

Retrospektive Evaluation von CD8 als molekularer Marker zur Abschätzung der Lokalisation eines Tumorrezidivs und der Prognose beim Pankreaskarzinom

2023 - 61 Seiten, 103 Literaturangaben, 33 Abbildungen, 8 Tabellen, 4 Anlagen

Kurzreferat:

Ziel der Arbeit war es den Einfluss von CD8⁺-zytotoxischen Lymphozyten auf die Lokalisation des ersten Tumorrezidivs und der Prognose zu überprüfen. Hierfür erfolgte eine immunhistochemische Färbung an Tumorpräparaten von 83 primär kurativ operierten Pankreaskarzinomen, anschließend wurde die Infiltration von CD8⁺-Zellen im Tumorrandbereich (*invasive margin*) ausgewertet.

Es zeigte sich, dass eine hohe CD8⁺-Infiltration im Tumorrandbereich bei Patienten mit einem Leberrezidiv mit einem besseren Überleben einhergeht. Dies galt auch für den intratumoralen Randbereich. Ein besseres Überleben ergab sich auch bei einer hohen CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio im intratumoralen Randbereich. Bei einem Lokalrezidiv ergab sich ein besseres Überleben bei einer niedrigen CD8⁺-Infiltration im Tumorrandbereich, hierbei v.a. peritumoral. Weiter ergab sich insgesamt eine signifikante peritumorale Akkumulation von CD8⁺-Zellen. Die Entwicklung eines Leberrezidivs ging zusätzlich mit einer erhöhten CD8⁺-Infiltration einher. Auch zeigten sich signifikant weniger Lymphknotenmetastasen bei hoher Infiltration durch CD8⁺-Zellen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Intensität der CD8⁺-Infiltration im Tumorrand im Zusammenhang mit der Prognose und dem Metastasierungsverhalten des PDAC steht.

1. Einleitung	1
1.1. Das Pankreaskarzinom	1
1.1.1. Definition und Epidemiologie	1
1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren	1
1.1.3. Pathologie.....	1
1.1.4. Klassifikation und Stadieneinteilung	2
1.1.6. Klinik.....	2
1.1.7. Therapie	2
1.1.8. Prognose	4
1.2. Personalisierte Therapie und Tumorimmunologie	5
1.2.1. Molekulare Biomarker in der Pankreasdiagnostik	5
1.2.2. Personalisierte Medizin	5
1.2.3. Immunoediting.....	6
1.2.4. Aufbau und Aktivierung des CD8-Rezeptors	8
1.2.5. Zytotoxische Mechanismen der CD8 ⁺ -T-Zelle.....	9
1.2.6. Invasive Tumorgrenze, Tumormikromillieu und Immunzellinfiltration	10
1.3. Zielsetzung	11
2. Patienten, Material und Methoden	13
2.1. Patienten und Material	13
2.1.1. Patientenkollektiv	13
2.1.2. Software.....	14
2.2. Methoden	14
2.2.1. Immunhistochemie (IHC).....	14
2.2.2. Geräte.....	16
2.2.3. Verwendete Chemikalien.....	16
2.2.4. Verwendete Antikörper	17
2.2.5. Durchführung der Immunhistochemie.....	17
2.2.6. Auswertung der Antikörperfärbung	20
2.2.7. Statistische Auswertung	21
3. Ergebnisse	23
3.1. Deskriptive Statistik der erhobenen Daten	23
3.1.1. Beschreibung des Patientenkollektivs	23
3.1.2. Beschreibung der tumorbezogenen Daten.....	26
3.1.3. Beschreibung der therapiebezogenen Daten.....	30
3.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit CD8	35
3.2.1 Verteilungsmuster der CD8 ⁺ -CTLs Zellen.....	37
3.2.2. Überlebensanalyse.....	37
3.2.3. Korrelationsanalyse.....	45
4. Diskussion	50
4.1. Einleitung	50
4.2. Tumorinfiltration durch CD8⁺-CTLs	51
4.3. Infiltration durch CD8⁺-CTLs und Überleben	52
4.4. Infiltration durch CD8⁺-CTLs und Rezidivlokalisierung	55
4.5. Infiltration durch CD8⁺-CTLs und TNM-Klassifikation	56
4.6. Methodenkritik	58
4.7. Schlussfolgerung und Therapieausblick	59
5. Zusammenfassung	61
6. Literaturverzeichnis	62
7. Anlagen	71
7.1. Stadien der TNM-Klassifikation	71

7.2. Stadien der UICC-Klassifikation	72
7.3. Auswertung CD8⁺-Zellen.....	72
7.4. Auswertung FoxP3⁺-Zellen	74
8. Danksagung	77
9. Ehrenerklärung	78
10. Lebenslauf.....	79

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AB	Antibody
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
BRCA2	breast cancer 2
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CAR	chimeric antigen receptor
CD8	cluster of differentiation 8
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CRM	circumferential resection margin
CRS	cytokin release syndrome
CT	Computertomographie
ctDNA	circulating tumor DNA
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DC	dendritische Zellen
DFS	disease free survival
DMFS	distant metastasis free survival
EGF	epidermal growth factor
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
FDG	Fluordesoxyglucose
FNP	Feinnadelpunktion
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
G	Grading
GIT	Gastrointestinaltrakt
HCC	hepatocellular carcinoma
HLA	human leukocyte antigen system
HPF	high power field
HRP	horseradish peroxidase
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IM	invasive margin
IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie

ITAMs	immunreceptor tyrosin-based activation motifs
KRK	kolorektales Karzinom
LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
LNR	lymph node ratio
LPFS	local progression free survival
LPS	Lipopolysaccharid
M1/M2	Makrophagen Typ 1/Makrophagen Typ 2
MDSC	myeloid-derived suppressor cell
MHC	major histocompatibility complex
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
MSLN	Mesothelin
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
OS	overall survival
PanIn	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PDAC	pancreatic ductal Adenocarcinoma
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFS	progression-free survival
PPPD	pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy
RKI	Robert-Koch-Institut
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SLN	Sentinel-Lymphknoten
TA	Tumorantigen
TAA	tumorassoziierte Antigene
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCR	T-cell-receptor
THBS2	Thrombospondin-2
TIL	tumor infiltrating lymphocyte
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containig-3
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TReg	regulatorische T-Zelle
TSA	tumorspezifische Antigene
UICC	Union internationale contre le cancer

VEGF	vascular endothelial growth factor
5-FU	5-Fluoruracil

1. Einleitung

1.1. Das Pankreaskarzinom

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom ist eine bösartige Neubildung, welche aus den exokrinen Zellen des Pankreas hervorgeht. Laut Robert-Koch-Institut erkrankten 2018 etwa 19.000 Patienten an einem Pankreaskarzinom. Gleichzeitig starben 2018 ca. 18.300 Patienten hieran, womit die Mortalität annähernd der Inzidenzrate entspricht. Dies dokumentiert die schlechte Prognose. Das Pankreaskarzinom belegte im selben Jahr den vierten Rang der Krebssterblichkeit bei beiden Geschlechtern. Trotz des medizinischen Fortschritts ist die Neuerkrankungs- bzw. Sterberate beim Pankreaskarzinom weiter steigend, vermutlich nicht zuletzt durch den besonders in der westlichen Welt zunehmenden Wandel des Lebensstils ¹.

1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Der einzige gesicherte Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms ist der aktive und passive Tabakkonsum ^{2,3}. Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas, Alkoholkonsum und geräucherte Fleischware scheinen ebenfalls zur Entstehung beizutragen ⁴⁻⁷. Malak et al. zeigte 2002 einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer chronischen Pankreatitis und der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms ⁸. Zusätzlich ist eine familiäre Häufung zu beobachten, die genetischer Natur sein kann oder möglicherweise auf einen ähnlichen Lebensstil zurückzuführen ist ⁹.

1.1.3. Pathologie

Grundsätzlich lässt sich das Pankreaskarzinom in solide und zystische Tumoren einteilen. Das duktales Adenokarzinom (*pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC*) stellt mit 80% die häufigste Form dar. Es bildet drüsige Strukturen und wächst invasiv in das Nachbargewebe ein. Die häufigste Lokalisation des Malignoms ist mit 65% im Pankreaskopfbereich. Körper und Schwanz sind seltener betroffen ¹⁰. Eine Invasion der umliegenden Venen oder Nerven ist häufig und begünstigt eine frühe Metastasierung. Bei Erstdiagnose liegt bereits oftmals eine Fernmetastasierung vor, wobei es sich hier vor allem um Metastasen in Leber, Peritoneum, Lunge oder Pleura handelt ¹¹. Der Differenzierungsgrad (Grading) wird in Grad 1-3 (1 = gut differenziert, 2 = mäßig differenziert, 3 = schlecht differenziert) unterteilt ¹². Zusätzlich zeigt das PDAC eine desmoplastische Stromareaktion, welche die Bildung kollagenreichen Bindegewebes durch immunologische Prozesse beschreibt ¹³⁻¹⁵.

1.1.4. Klassifikation und Stadieneinteilung

Die Klassifikation findet anhand des TNM-Systems statt, welches durch die Union internationale contre le cancer (UICC) erarbeitet wurde. In die Klassifikation fließen die Tumorgröße, die lokale Ausdehnung, der Lymphknotenstatus und mögliche Fernmetastasierungen ein. Sie dient der Therapieplanung und der Prognoseeinschätzung¹⁶.

Zusätzlich wird die Einteilung nach UICC-Stadien zur Beurteilung der entscheidenden Tumormerkmale zur Prognoseabschätzung und Evaluation der Therapiemöglichkeiten genutzt.

Die Stadieneinteilung der TNM- und UICC-Klassifikation sind im Kapitel 7.1. und 7.2. im Anhang aufgeführt.

1.1.6. Klinik

Die meisten Patienten zeigen keine spezifische Frühsymptomatik. Im Verlauf können ungewollter Gewichtsverlust, neu auftretenden Oberbauchschmerzen, in den Rücken strahlende Schmerzen, Glukosintoleranz, ein paraneoplastisches Syndrom und depressiven Episoden auftreten. Bei Karzinomen im Pankreaskopf ist ein Verschlussikterus möglich. Ein diagnostischer Hinweis auf Pankreaskarzinom ist das sog. „Courvosier-Zeichen“, welches das gleichzeitige Auftreten eines Ikterus und einer schmerzlos vergrößerten Gallenblase beschreibt.

1.1.7. Therapie

1.1.7.1 Operative Therapie

Die chirurgische Therapie stellt weiterhin die einzig potenziell kurative Therapie des Pankreskarzinoms dar^{12,17}. Maßgeblichen Einfluss auf das Gesamtüberleben (*overall survival, OS*) hat der R-Status¹⁸. Ziel einer chirurgischen Therapie ist folglich stets eine Resektion im Gesunden (R0-Situation). Eine R1- bzw. R2-Situation mit mikroskopisch, bzw. makroskopisch sichtbaren Residualtumor am Schnitttrand geht mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einher¹⁹.

Da der Überlebensvorteil einer R0-Resektion bei einem Resektionsabstand von <1mm verloren geht, wird zusätzlich die CRM-Klassifikation (engl. *circumferencial resection margin*) in der klinische Praxis angewandt^{20,21}. Sie beschreibt den Tumorabstand an den zirkulären anterioren, dorsalen und medialen Schnittändern²². Tab. 1.1. zeigt die unterschiedlichen Resektionsweiten.

CRM-Status	Abstand zum Resektionsrand	R-Status
CRM +	0 mm	R1
	≤ 1 mm	R0 narrow
CRM -	> 1 mm	R0 wide

Tab. 1.1.: CRM-Status und Resektionsrand

Eine Infiltration von Nachbarorganen oder der nahegelegenen Venen wie die V. porta, der V. mesenterica superior und/oder der V. lienalis stellen prinzipiell keine Kontraindikationen zur Operation dar ²³. Im Falle einer Infiltration des Truncus coeliacus oder der A. mesenterica superior wird meist von einer operativen Sanierung abgesehen. Sie stellt allerdings keine absolute Kontraindikation dar und unterliegt einer individuellen Abwägung ²⁴.

Bei einer Fernmetastasierung wurde bisher leitliniengerecht auf eine Resektion verzichtet. Aktuelle Studien zeigen jedoch, dass eine Resektion des Primarius und der Metastasen bei oligometastasierten Tumoren möglicherweise einen Vorteil bringen könnte ²⁵.

Das operative Vorgehen ist abhängig von der Lage des Tumors. Liegt das PDAC im Kopfbereich wird nach Möglichkeit eine pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie nach Traverso-Longmire (PPPD) durchgeführt. Ist zusätzlich der Bulbus duodeni infiltriert, wird auf eine partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch-Whipple zurückgegriffen. Bei sich im Korpus befindlichen Tumoren wird je nach Lokalisation eine subtotale Pankreaslinksresektion oder eine totale Pankreatikoduodenektomie mit Splenektomie angewandt. Eine Pankreaslinksresektion mit Splenektomie kommt bei Lage im Pankreasschwanz zur Anwendung ²⁶. Eine Pankreassegmentresektion ist für benigne oder niedrigmaligne Befunde vorgesehen ²⁷. Die 2021 veröffentlichte S3-Leitlinie zu exokrinen Pankreaskarzinomen empfiehlt eine Entfernung von mindestens 12 Lymphknoten. Wobei einige Forscher jedoch eine Mindestmenge von 15 Lymphknoten für die adäquate Evaluation eines T-Stadiums fordern ²⁸. Seit 2013 wird zusätzlich die Bestimmung des Verhältnisses von befallenen zu allen entnommenen Lymphknoten (Lymph node ratio, LNR) empfohlen.

1.1.7.2 Adjuvante Therapie

Patienten, die einer kurativen Operation unterzogen wurden, profitieren von einer adjuvanten Chemotherapie. Aktuell wird laut S3-Leitlinie nach einer R0-Resektion im UICC-Stadium I-III eine adjuvante Therapie empfohlen. Im Vordergrund stehen hierbei Protokolle mit dem Pyrimidin-Analogen Gemcitabin oder 5-Fluoruracil (5-FU), wobei 5-FU in der Praxis selten zur Anwendung kommt ²⁹⁻³². Eine Therapie sollte innerhalb von 12 Wochen postoperativ beginnen und nach 6 Monaten enden. Bei

Patienten mit einem ECOG von 0-1 wird in der S3-Leitlinie seit 2021 eine adjuvante Therapie mit Folinsäure, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX-Schema) in modifizierter Form (mFOLFIRINOX-Schema) empfohlen. Auch erfolgt aktuell die Evaluation weiterer Kombinationstherapien. Die 2017 veröffentlichte ESPAC-4 Studie zeigt einen Vorteil bei der Kombination aus Capecitabin und Gemcitabin im Vergleich zu Gemcitabin mono³³. Bei einem ECOG von > 1-2 wird daher seit 2021 eine adjuvante Therapie mit Gemcitabin mono oder in Kombination mit Capecitabin empfohlen. Bei einer R1-Resektion wird ebenfalls eine additive Therapie empfohlen^{31,34}. Eine Radiatio wird momentan zu keinem Zeitpunkt empfohlen.³⁵

Innovative Neuerungen stellen immuntherapeutische Ansätze dar. Über „Immun-Checkpoint-Inhibitoren“ werden immunsupprimierende Mechanismen des Malignoms gehemmt und so die Immunantwort gegen das Malignom gestärkt. Die Malignomzelle wird als körperfremd erkannt und zerstört. Erfolgsversprechende Ziele sind Rezeptoren bzw. Liganden die bereits aus der Therapie anderer Malignome, wie dem malignen Melanom und dem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom, bekannt sind. Hierzu zählen bspw. CTLA-4-, PD-1- und PD-L1-Immun-Checkpoint-Moleküle³⁶⁻³⁸. Bei den Präparaten handelt sich um monoklonale Antikörper die den jeweiligen Rezeptor blockieren und so den Tumor für das Immunsystem zugänglich machen. Die Entwicklung von Wirkstoffen zur immuntherapeutischen Behandlung eines Pankreaskarzinoms befindet sich jedoch noch in den Anfängen³⁹. Aktuell haben Therapien mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren keine Bedeutung in der kurativen Therapie des Pankreaskarzinoms.

1.1.8. Prognose

Die Prognose ist stark abhängig von der Resektabilität und der Metastasierung. In lediglich 10-20% der Fälle liegt eine primär resektabler Befund vor. Durch eine chirurgische Resektion gefolgt von einer adjuvanten Therapie lässt sich ein medianes Überleben von 20-28 Monaten je nach Therapieschema erreichen. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei alleinig chirurgisch therapierten Patienten bei unter 10%, im Vergleich zu 3% bei allen erkrankten Patienten und kann durch die Gabe einer adjuvanten Therapie auf über 20% gesteigert werden^{34,40}. Insgesamt konnte das OS jedoch in den letzten Jahren nur leicht verbessert werden. Weiter haben auch perioperative Umstände, wie z.B. perioperative Bluttransfusionen⁴¹, Einfluss auf die Prognose.

Häufig zeigt sich jedoch bereits ein metastasiertes Stadium, in dem das mediane Überleben im palliativen Setting bei lediglich 4,6 Monaten liegt. Lokal fortgeschrittene Befunde (30-40%) zeigen unter palliativer Therapie ein medianes Überleben von 6-11 Monaten, welches unter multimodaler Therapie auf 9-21 Monate steigt.

Als wichtigster pathologischer Prognosefaktor gilt das Tumorstadium (siehe 1.1.4 Klassifikation). Hierbei gilt je höher das Tumorstadium, desto schlechter das OS⁴². Aus pathologischer Sicht zeigt sich der

Lymphknotenstatus als entscheidender prognostischer Marker. Vergleicht man die 5-Jahresüberlebensraten von Patienten mit N0 mit denen mit N1/N2, so sieht man, dass das N-Stadium einen wesentlichen Einfluss auf das Langzeitüberleben hat (ca. 30 % vs. ca. 10 %) ^{42,43}. Zusätzlich hat die Lymphknoten-Ratio (*lymph node ratio*, LNR), also der Quotient aus positiven und den gesamten entnommenen Lymphknoten, prognostischen Wert ^{44,45}.

Als weitere Prognosefaktoren gelten der prä- und postoperative CA-19-9-Wert, das Vorhandensein einer Gefäß-, Perineuralscheiden- und/oder Lymphgefäßinfiltration und der Differenzierungsgrad des Tumors ^{19,46-49}. Neben diesen Faktoren ist die Qualität der chirurgischen Resektion in Form des R-Status von großer prognostischer Relevanz ^{21,49}. Aufgrund der unterschiedlichen Frühsymptomatik spielt ebenfalls die Lokalisation des Primarius eine Rolle ⁵⁰.

1.2. Personalisierte Therapie und Tumorimmunologie

1.2.1. Molekulare Biomarker in der Pankreasdiagnostik

Biomarker sind objektiv messbare biologische Eigenschaften, die Rückschlüsse auf die Prognose, den Gesundheitsstatus eines Patienten oder das Ansprechen einer Therapie zulassen ⁵¹. Meist handelt es sich dabei um Proteine oder Gene und deren Veränderungen. Biomarker in der Tumormedizin korrelieren oft mit der Krankheitsschwere, der Prognose des Patienten, dem Ansprechen einer Therapie oder zeigen eine Indikation zur Intervention an.

Mit der Entwicklung der „personalisierten Medizin“, findet auch die Suche nach molekularen Biomarkern immer mehr Einzug in die gegenwärtige Forschung. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Identifizierung neuer Marker auf molekularer Ebene in Bezug auf Aussagen über das Gesamtüberleben und das Metastasierungsmuster des PDAC. Es lassen sich diagnostische, prognostische, Risiko- und prädektive Biomarker unterscheiden. Mit einem prognostischen Biomarker kann eine Aussage über den voraussichtlich zu erwartenden Verlauf gemacht werden ^{52,53}. In dieser Arbeit soll auf CD8 als prognostischen Biomarker eingegangen werden. Ein bekanntes Beispiel ist das Prostata-spezifische Antigen (PSA) mit dem Vorhersagen über die Progression eines Prostatakarzinoms gemacht werden können ⁵⁴. In der Vergangenheit wurden bereits vielversprechende potenzielle prognostische Biomarker für das PDAC diskutiert. Hierzu zählen beispielsweise CA19-9 als etablierter Marker oder zirkulierende Tumor DNA (*circulating tumor DNA*, *ctDNA*)⁵⁵.

1.2.2. Personalisierte Medizin

Mit dem wachsenden Verständnis des menschlichen Genoms eröffnet sich zunehmend die Möglichkeit Erkrankungen zugeschnitten auf den Patienten zu behandeln. Hiermit vor allem die Unterteilung der

Patienten in Subgruppen mit unterschiedlichen Prognosen und die von speziellen Verfahren oder Therapien profitieren gemeint ⁵⁶. Die größten Fortschritte findet man hier auf dem Gebiet der Onkologie ⁵⁷. Inzwischen werden bei bestimmten genetischen Voraussetzungen antitumorale Therapien angewandt. Bestimmte tumorbiologische Voraussetzungen können hierbei eine zielgerichtete, personalisierte Therapie ermöglichen. Als bekanntes Beispiel gilt hier die Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab bei Her2/neu positiven Mammakarzinomen ⁵¹. Ein weiteres, bereits erwähntes, Beispiel aus der gynäkologischen Onkologie sind Patienten mit einer BRCA1/2-Mutation, die häufiger an einem Mammakarzinom erkranken und von einer prophylaktischen Mastektomie profitieren können ⁵⁸. Fortschritte gibt es hier ebenfalls im Bereich des PDACs. Bekannte, bereits etablierte Marker sind beispielsweise CA 19-9 und CEA. Innovationen bezüglich solcher molekularen Biomarker tragen zur Optimierung der onkologischen Therapie bei ⁵⁹. Zukünftig könnten auch an einem PDAC erkrankte Patienten von der Weiterentwicklung der personalisierten Medizin einen zunehmenden Nutzen haben.

1.2.3. Immunoediting

Zur Abwehr von malignen Zellen erkennt das Immunsystem Tumorzellen über die jeweiligen exprimierten tumorspezifischen Antigene (TSA) als körperfremd und zerstört diese. Hierbei handelt es sich auf Tumorzellen exprimierte Antigene. Diese werden vom Körper als unbekannt identifiziert und so eine Immunreaktion ausgelöst. Häufig werden auch sogenannte tumorassoziierte Antigene (TAA) exprimiert. TAA sind auf körpereigenen Zellen exprimierte Antigene, die jedoch auf maligne entarteten Zellen überexprimiert und so von immunaktiven Zellen erkannt werden. Beide Antigenarten zählen zu den Tumorantigenen (TA). Um im Wachstum fortzuschreiten, muss der Tumor dieser antitumoralen Immunsantwort entgehen. Dies geschieht durch den Mechanismus des Immunoeditings. Der Vorgang des Immunoeditings wird allgemein in drei unterschiedliche Phasen eingeteilt. Nach Dunn et al. spricht man hier von den drei „E’s“ des Immunoeditings. So unterscheidet man die Eliminierungsphase (engl. *elimination*, auch Immunüberwachung oder engl. *immunosurveillance*), die Gleichgewichtsphase (engl. *equilibrium*) und der Entkommensphase (engl. *escape*) ⁶⁰.

Während der Eliminierungsphase (siehe Abb. 1.1.) werden Tumorzellen durch das angeborene und das adaptive Immunsystem zerstört bevor der Tumor klinisch auffällig wird.

Durch die tumorbedingte Sekretion proinflammatorischer Signale werden natürliche Killerzellen (NK-Z), natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Z), Makrophagen und dendritische Zellen (DC) angelockt, die maligne entartete Zellen erkennen. Aus diesen Zellen des adaptiven Immunsystems werden das antiproliferativ, antiangiogenetisch und Apoptose-induzierende Interferon Gamma (IFN-Gamma) und IL-12 freigesetzt (Kotredes and Gamero, 2013). Durch IL-12 und IFN-Gamma kommt es mittels Perforinen, TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand), Fas-Liganden und reaktive Sauerstoffradikalen (ROS) zur Apoptose der Tumorzelle. DC phagozytieren die apoptotische Tumorzelle und wandern dann

in den naheliegenden Sentinel-Lymphknoten (SLN), wo über die Präsentation der exprimierten TA das Priming der naiven T-Zelle stattfindet. Reife CD4⁺-T-Zellen führen dann zur klonalen Expansion TA-spezifische CD8⁺-T-Zellen (zytotoxische T-Zellen (CTL)).

Im weiteren Verlauf kommt es zum Homing der TA-spezifischen CD8⁺-T-Zellen in den Tumor, was zur Fortsetzung der Tumorzellzerstörung durch CTLs führt.

Werden in der Eliminierungsphase nicht alle Tumorzellen ausgelöscht, folgt die zweite übergeordnete Phase, die Gleichgewichtsphase (*equilibrium*). Hier kommt es zur Fortsetzung der Tumorzelleliminierung. In dieser Phase wächst der Tumor zwar nicht, jedoch entstehen Mutationen, die zu einer geringeren Immunogenität der Tumorzelle führen. Diese mutierten Tumorzellen können so teilweise einer Immunantwort entgehen. Dies führt zu einer sog. „darwinistischen Selektion“, in der weniger immunogene Tumorzellen überleben und sich später ungehindert weiter teilen können. Diese Selektion erklärt das spätere Voranschreiten des Tumorwachstums bei immunkompetenten Individuen.

Die Entkommensphase (*escape*), ist die dritte und letzte Phase des Immunoeditings. Hier wachsen die in der Gleichgewichtsphase selektierten Tumorzellen weiter. Der Tumor wird klinisch apparent. Durch genetische Veränderungen, wie z.B. Punktmutationen oder DNA-Hypermethylierungen am MHC-Gen, können TA nicht mehr an aktivierte T-Zellen präsentiert werden und entgehen so dem Immunsystem. Zusätzlich können Tumorzellen Widerstandsmechanismen gegenüber der T-Zellantwort entwickeln. Beispielsweise kann durch eine deaktivierende Mutation im Fas-Rezeptor keine Apoptose mehr in der Zielzelle ausgelöst werden. Auch kann durch eine Überproduktion des Fas-Liganden einer Immunantwort entgangen werden, da die Tumorzelle die T-Zelle über den Fas-Liganden zur Apoptose bringt⁶⁰⁻⁶².

Aufgrund der Umgehung des Immunsystems durch den Tumor, ist keine adäquate Immunreaktion des Körpers gegen das Malignom möglich. Die Tumorzellen haben somit die Möglichkeit sich beinahe ungehemmt weiter zu teilen und das Tumorwachstum schreitet voran. Dieser Mechanismus beschreibt den Vorgang des Immunoeditings.

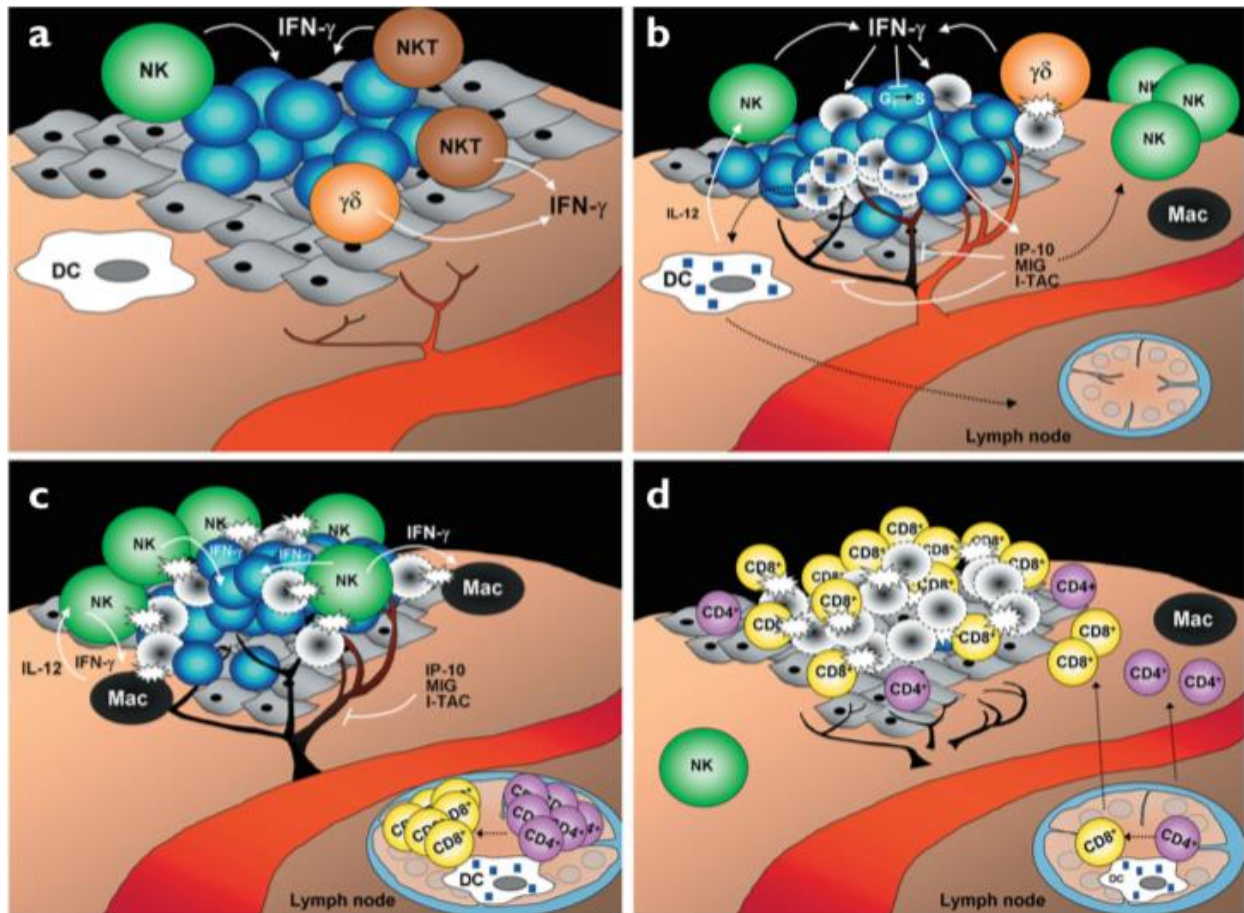


Abb. 1.1.: Mechanismus der *Immunosurveillance* (entnommen aus Dunn et al, 2002 ⁶³)

1.2.4. Aufbau und Aktivierung des CD8-Rezeptors

Die CD8⁺-T-Zelle ist von zentraler Bedeutung bei der Zerstörung maligne entarteter Zellen. Zum besseren Verständnis der Funktion ist das Wissen über den Aufbau und die Aktivierung des CD8-Rezeptors essenziell.

Beim CD8-Rezeptor handelt es sich um ein Transmembran-Glykoprotein. Die Abkürzung „CD“ steht hierbei für „Cluster of Differentiation“, die Zahl „8“ steht für die Nummer des Clusters. Er dient als Co-Rezeptor für den T-Zell-Rezeptors (TCR). Der CD8-Co-Rezeptor kommt entweder als Homodimer mit zwei alpha-Ketten oder als über eine Disulfid-Brücke verbundenes Heterodimer aus einer alpha- und einer beta-Kette vor. Hinzu kommen ein zytoplasmatischer Anteil und eine Immunglobulin-Domäne. Neben zytotoxischen T-Zellen wird das CD8-Oberflächenprotein teilweise ebenfalls von NK-Z, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, dendritischen Zellen und Thymozyten exprimiert. Erkannt wird der CD8-Co-Rezeptor vom Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I (MHC-Klasse-I-Komplex) ⁶⁴.

Der CD8-Oberflächenrezeptor wird über MHC-I-Komplex präsentierte Peptid-Antigene aktiviert. Der TCR bindet den MHC-I-Komplex. Der so entstandene Bindungskomplex wird über die zusätzliche Bindung an den CD8-Co-Rezeptoren stabilisiert. Intrazellulär kommt es nun zur Aktivierung der LCK-Kinase, die über die Phosphorylierung des am CD3-Rezeptor liegenden immunreceptor tyrosin-based

activation motifs (ITAMs) zur Initiierung des intrazellulären TCR-Signalwegs führt ⁶⁵. Dies wird in Abbildung 1.2. illustriert.

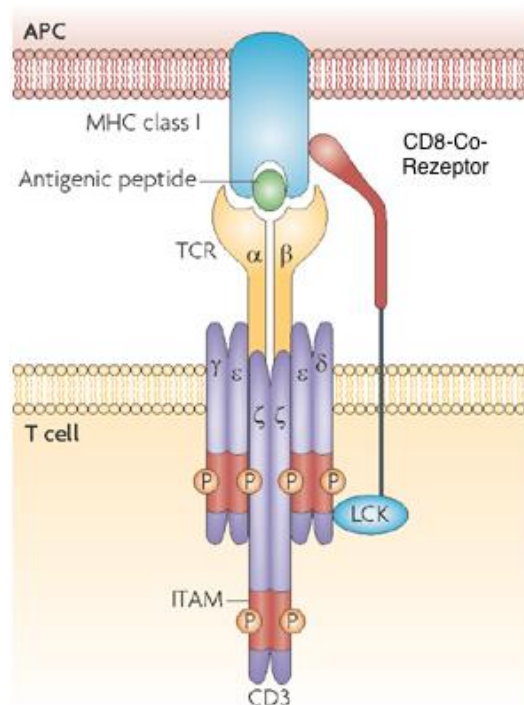


Abb. 1.2.: Aktivierung der T-Zelle über den TCR-Rezeptor und CD8-Co-Rezeptor (entnommen und modifiziert aus Gascoigne et al., 2008 ⁶⁵)

1.2.5. Zytotoxische Mechanismen der CD8⁺-T-Zelle

Der charakteristische Expressionsort für den CD8-Rezeptor ist die Zellmembran der zytotoxischen T-Zellen (CTL) und ihren direkten Vorläufern. CTLs stellen eine zentrale Rolle in der Abwehr von intrazellulären Pathogenen und maligne entarteten Zellen dar. Nach der Aktivierung der Zelle über den TCR und den CD8-Co-Rezeptor, kann es über drei verschiedene Wege zur Zerstörung der Zielzelle kommen (Abb. 1.3.). Ein Weg führt über die zusätzliche Bindung des CTL-ständigen Fas-Linganden (Fas-L) mit dem auf der Zielzelle befindlichen Fas-Rezeptor (Fas, CD95). Über diese Bindung wird die Caspasen-Kaskade induziert, welche zur Apoptose der Zielzelle führt ⁶⁶.

Eine andere Möglichkeit ist die Sekretion von Granzym B und Perforin nach Aktivierung der CTL. Hierbei verursacht Perforin ein Loch in die Zellmembran, wodurch das Eindringen von Granzym B in die Zielzelle ermöglicht wird. Granzym B ist eine Serinprotease, die zur Spaltung der intrazellulären Proteine und so zur Lyse führt. Diese beiden Enzyme sind folglich stark zytotoxisch.

Die dritte Variante wird über die Sekretion von Zytokinen vermittelt. Dabei handelt es sich speziell um TNF-alpha und IFN-gamma, welche antitumoral und antimikrobiell wirken. TNF-alpha löst durch die Bindung an den TNF-alpha-Rezeptor die Caspase-Kaskade aus und führt die Zelle so in die Apoptose.

IFN-gamma hingegen führt zur Aktivierung der endogenen Antigenpräsentation über den MHC-Klasse-I-Signalweg und des Fas-Rezeptors, was schließlich zur Fas-vermittelten Lyse der Zielzelle führt ⁶⁷.

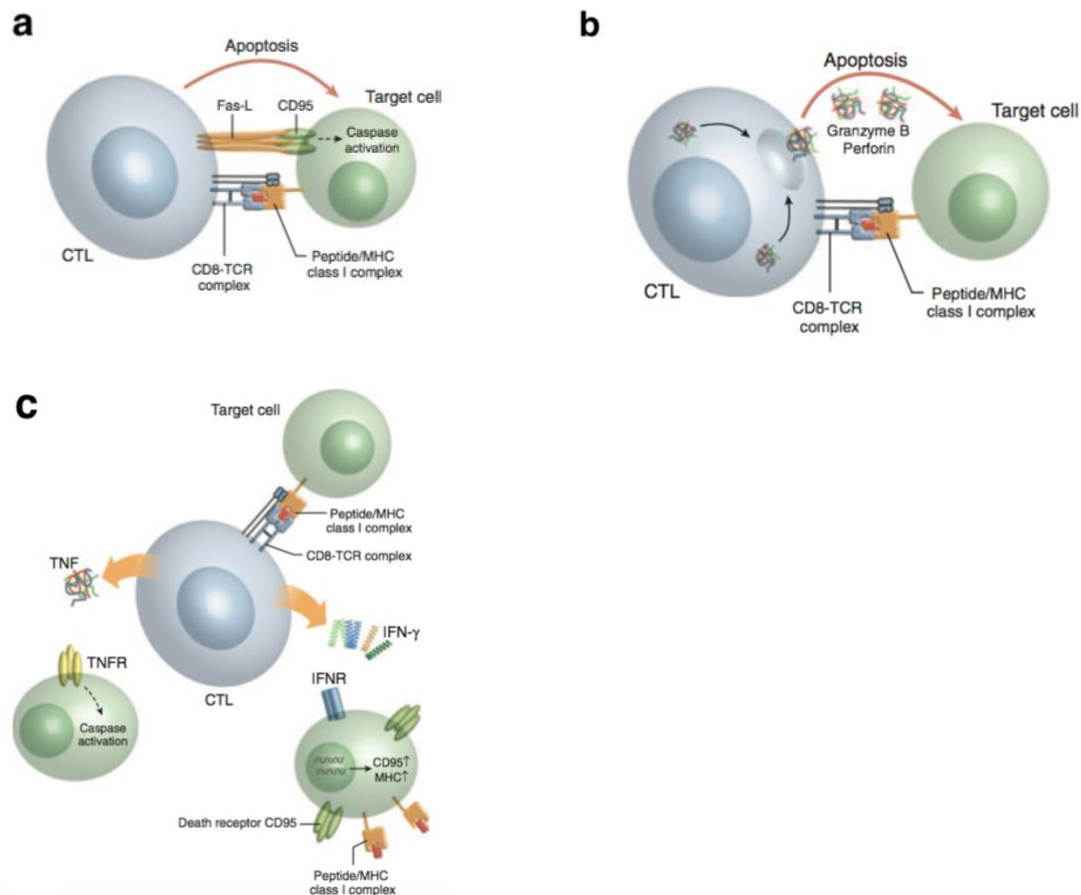


Abb. 1.3.: Zytotoxische Mechanismen der CD8⁺-T-Zelle (entnommen und modifiziert aus Andersen et al., 2006 ⁶⁷). (a) Induktion der Apoptose mittels Fas-L, b) zytotoxischer Mechanismus über Lyse der Zielzelle mittels Granzym B und Perforin, c) Zytokin-vermittelte Induktion der Apoptose durch Auslösen der Caspase-Kaskade)

1.2.6. Invasive Tumorgrenze, Tumormikromillieu und Immunzellinfiltration

Die invasive Tumorgrenze (engl. *invasive margin*, IM) beschreibt das Areal das den Tumor von physiologischen Gewebe trennt. Der IM stellt eine mechanische Barriere dar. In vorhergehenden Studien bezüglichlicher anderer Entitäten zeigte sich, dass hier eine erhöhte Dichte von immunaktiven Zellen zu finden ist ⁶⁸. Der IM wurde definiert als insgesamt 1 mm breiter Saum, der jeweils zur Hälfte Tumor und zur Hälfte tumorfreies Gewebe beinhaltet (Abb. 1.4.) ^{68,69}. Hier ist das immunologische Umfeld, das Tumormikromillieu, von entscheidender Bedeutung.

Das Tumormikromillieu beschreibt das unmittelbare zelluläre und nicht-zelluläre Umfeld des Malignoms. Übergeordnet kann man hier Zellen hämatopoetischen Ursprungs, mesenchymalen Ursprungs und eine nicht-zelluläre Komponente unterscheiden. Die Zellen hämatopoetischen Ursprungs bestehen einerseits aus T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen, die sich aus der lymphoiden Zelllinie entwickeln, und andererseits den Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und myeloiden Suppressorzellen (myeloid-derived suppressor cell, MDSC), die der myeloiden Zelllinie angehören. Die aus dem Mesenchym entspringenden Zellen bestehen aus Fibroblasten, Myofibroblasten, mesenchymalen Stammzellen, Adipozyten und Endothelzellen. Den nicht-zellulären Bestandteil bildet vor allem die extrazelluläre Matrix. Das Gerüst hierfür bilden hauptsächlich Proteine, Glykoproteine und Proteoglykane.

Die unterschiedlichen Komponenten der Tumormikroumgebung haben verschiedenen Einfluss auf den Verlauf der malignen Erkrankung^{70,71}. In dieser Arbeit soll der Fokus jedoch primär auf den Einfluss von CD8⁺-Zellen auf das Tumorverhalten gelegt werden.

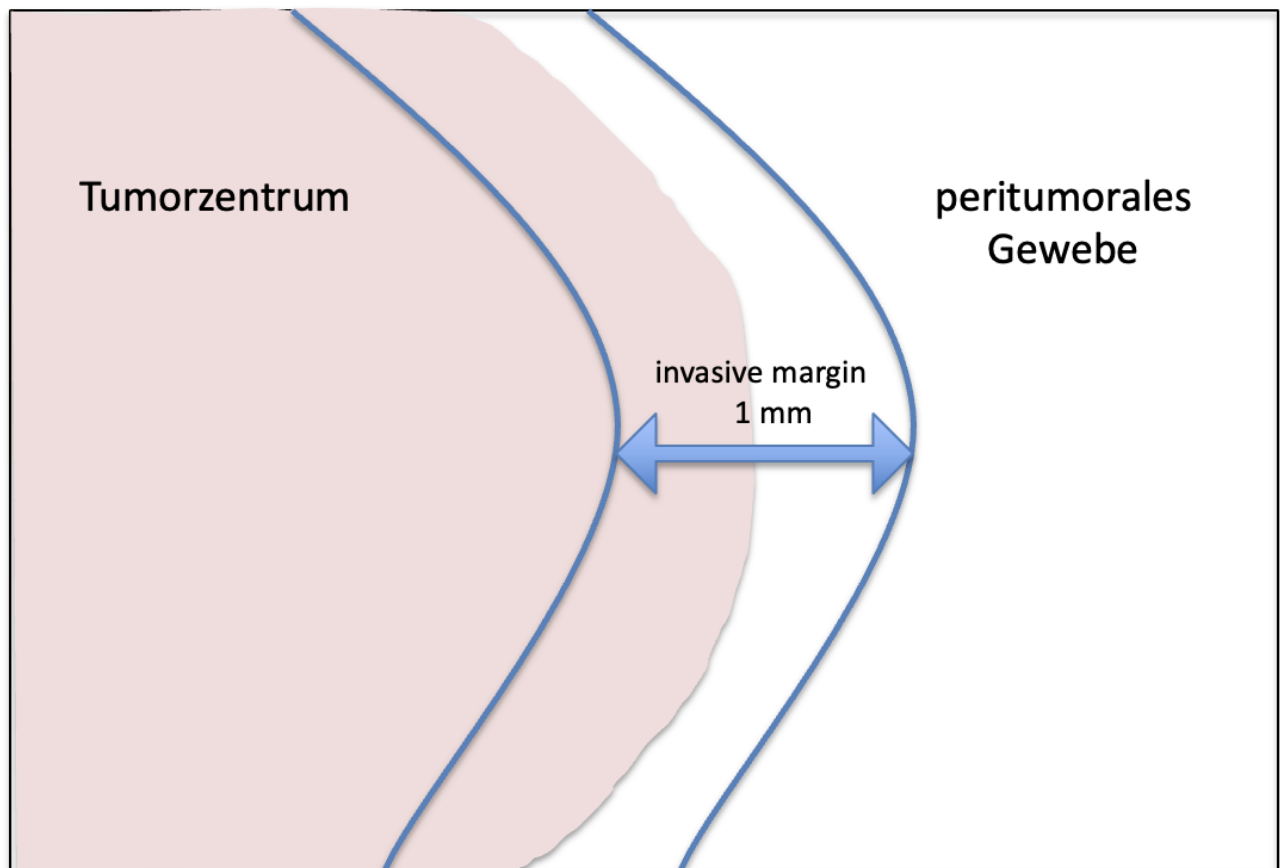


Abb. 1.4.: Schematische Darstellung des invasiven Tumorrands (*invasive margin*, IM)

1.3. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die CD8⁺-Infiltration der invasiven Tumorgrenze (*invasive margin*, IM) in Bezug zum Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) und der Lokalisation eines Rezidivs zu bringen. In

einigen Studien gab es bereits Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Infiltration mit CD8⁺-CTLs und dem Überleben⁷²⁻⁷⁴. Der Ansatz die Infiltration durch CD8⁺-CTLs mit der Lokalisation eines Rezidivs in Zusammenhang zu bringen, ist hingegen bisher nicht untersucht worden.

Es soll die Frage beantwortet werden, ob CD8 ein adäquater prognostische Biomarker für das PDAC ist.

Es wurden folgende Fragestellungen formuliert:

- Hat die Infiltration durch CD8⁺-CTLs im IM Einfluss auf das Metastasierungsmuster des PDAC? D.h. hängt die Infiltrationsdichte der CD8⁺-CTLs im IM mit der Lokalisation des 1. Rezidivs zusammen?
- Hat die Tumordinfiltration durch CD8⁺-CTLs Einfluss auf das Gesamtüberleben bzw. rezidivfreie Überleben?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen histopathologischen Eigenschaften und der Tumordinfiltration durch CD8⁺-CTLs?
- In welchem Bereich des IM findet sich die höchste Akkumulation an CD8⁺-CTLs (intratumoral vs. peritumoral)?

Als Nachweismethode wurde die Immunhistochemie gewählt, da sie eine gut etablierte diagnostische Nachweismethode darstellt. Die immunhistochemische Färbung mit monoklonalen CD8-Antikörpern ist bereits ein vielfach angewandtes Verfahren und ist durch eine hohe Standardisierung gut reproduzierbar. So war es möglich, die gewonnenen Ergebnisse in die bisherigen Erkenntnisse einzuordnen und zu diskutieren.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten und Material

2.1.1. Patientenkollektiv

Das Patientekollektiv bestand aus 83 Patienten bei denen zwischen den Jahren 2008 – 2014 ein PDAC mittels pathologischer Aufarbeitung nachgewiesen wurde und eine partielle oder totale Resektion des Pankreas durchgeführt wurde. Es handelte sich um potenziell kurativ resektabel oder fortgeschrittene, operable Befunde (Borderline resectable). Patienten die an einer intraepithelialen muzinösen Neoplasie (IPMN) oder einer intraepithelialen Neoplasie (PanIN) litten wurden nicht berücksichtigt. Die Durchführung der Operation und die Gewinnung des Tumormaterials fanden in der Klinik für Allgemein-Viszeral- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Magdeburg statt. Die Aufarbeitung des Tumormaterials wurde anschließend durch einen Facharzt für Pathologie im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg durchgeführt. Die Patientendaten wurden durch Einsicht in die Patientenakte aus dem Datenarchiv erhoben. Die zugehörigen HE-Schnitte wurden zur Auswertung hinzugezogen.

Die retrospektiv erhobenen klinischen und pathologischen Daten wurden in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tab. 2.1: Übersicht über erhobene klinische und pathologische Daten

Patientendaten	Name, Geburtsdatum, Aufnahmedatum, Anschrift, Geschlecht
Diagnostik	Diagnose, Diagnosedatum, CA19-9, CEA, Diagnosesicherung, Biopsie, Lokalisation, Staging, präoperative Vorstellung in der Tumorkonferenz
Präoperative Therapie	Galleableitung, Neoadjuvante Therapie, Neoadjuvante Radiochemotherapie
Operation	OP-Datum, Entnahmezeitpunkt Präparat, intraoperative Resektabilität, OP-Verfahren, regionäre Lymphknotendissektion, multiviszerele Resektion, Rekonstruktion Pfortader, arterielle Gefäßrekonstruktion, Rekonstruktion Pankreas, Fußpunktanastomosen (Anzahl), Tage auf Intensivstation
Histologie	TNM, CRM-Klassifikation, Lymphknoten positiv

	(Anzahl), Lymphknoten gesamt (Anzahl), R-Kategorie, Tumor-Grading, Perineuralscheideninfiltration, Lymphgefäßinvasion, Blutgefäßinvasion
Geplante adjuvante Therapie	Postoperative Vorstellung in der Tumorkonferenz, geplante adjuvante Chemotherapie
Komplikationen	Komplikationen (ja/nein), Anzahl der Revisionen, Art der Komplikationen
Abgangsart/Entlassung	Entlassungsdatum, Entlassung

Die Aufarbeitung im Institut für Pathologie erfolgte wie in der „S-3-Leitlinie zum Exokrines Pankreaskarzinom“ festgelegt. Hiermit ist u.a. die Beurteilung der Resektionsränder (vor allem des medialen, dorsalen und ventralen Resektionsrandes), des TNM-Stadiums und des Gratings (G1 = gut differenziert; G2 = mäßig differenziert; G3 = schlecht differenziert) gemeint. Weiterhin wurde hierbei auch die Beteiligung von Lymphgefäßen (L-Status), der Perineuralscheide (Pn-Status) und von Blutgefäßen (V-Status) berücksichtigt. Die Tumorpräparate lagen in Paraffin eingebettet vor. Diese wurden im Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg gelagert. Hieraus konnten die Schnitte für diese Arbeit gewonnen und die immunhistochemische Färbung durchgeführt werden.

2.1.2. Software

Für die Textverarbeitung dieser Arbeit wurde das Programm „Word“ (Microsoft) verwendet. Für die Erhebung der Daten wurden eigens Dokumentationsformulare angefertigt und mit Hilfe der Software „Adobe Reader 11“ (Adobe) ausgefüllt. Die darauffolgende Archivierung und Verwaltung der Daten wurde mit „Excel“ (Microsoft) bewältigt. Zur statistischen Aufarbeitung kam die Software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) zum Einsatz. Eine Literaturdatenbank wurde mit Hilfe von „Zotero“ (Roy Rosenzweig Center for History and New Media der George Mason University) erstellt. Die immunhistologischen Bilder der jeweiligen Präparate wurden mit Hilfe der Software AxioVision (Zeiss) angefertigt.

2.2. Methoden

2.2.1. Immunhistochemie (IHC)

Die Immunhistochemie (IHC) stellt eine der zentralen Methoden in der heutigen histopathologischen Diagnostik dar. Durch ihre verhältnismäßig einfache und kostengünstige Durchführung ist sie weit

verbreitet. Sie ist in der Lage bestimmte Oberflächenmerkmale durch eine gezielte Antikörperbindung zu erkennen und sichtbar zu machen. Durch diesen Mechanismus können verschiedene Expressionsmuster der Zielzelle in einem histologischen Präparat nachgewiesen werden. Die IHC hat also die Sichtbarmachung und Lokalisierung bestimmter antigener Strukturen, sogenannte Epitope (z.B. Proteine, Polysaccharide), in einem zu untersuchenden Material (z.B. Gewebepräparat) zum Ziel. Hierbei beruht die Funktionsweise auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Dem zu untersuchenden Gewebeschnitt werden spezifische Antikörper hinzugesetzt, die an das gesuchte Epitop binden. Durch die Hinzugabe von ggf. sekundären Antikörpern und einer chromogenen Substanz, kommt es durch eine enzymatische Reaktion, zur Sichtbarmachung der sich im Gewebe befindlichen Antikörper-Antigen-Bindung. Allgemein kommen am häufigsten die direkte und die indirekte Methode zum Einsatz.

In dieser Arbeit wurde die indirekte Methode verwendet. Diese Methode setzt sich aus zwei Schritten zusammen. Zunächst wird auf das zu untersuchende Material ein Primärantikörper aufgebracht, der an das gesuchte Epitop bindet. Im nächsten Schritt wird dann ein an ein Enzym gekoppelter Sekundärantikörper hinzugegeben. Dieser wiederum richtet sich gegen den Primärantikörper. Hier wird dann eine Enzym-Substrat-Reaktion induziert, die eine Färbung zur Folge hat und das gesuchte Antigen sichtbar macht. Als Substrat dient hier beispielsweise Peroxidase aus Meerrettich (engl. *horseradish peroxidase, HRP*).

Bei der Immunhistochemie werden polyklonale und monoklonale Antikörper (häufig aus Mäusen gewonnen) verwendet. Polyklonale Antikörper richten sich gegen verschiedene antigene Determinanten eines Antigens und können diese binden. Dies ist von Vorteil, wenn keine Demaskierung in der Vorbereitung stattgefunden hat. In diesem Fall kann das Antigen dennoch über verschiedene Epitope gebunden werden. Nachteilig ist allerdings, dass es durch die vermehrten Bindungsmöglichkeiten zu Kreuzreaktionen mit Epitopen anderer Antigene kommen kann, was ein unspezifisches Ergebnis zur Folge haben kann. Zur Herstellung polyklonaler Antikörper werden am häufigsten Kaninchen verwendet (eine Produktion beispielsweise aus Ziegen oder Pferden ist ebenfalls möglich.). Monoklonale Antikörper hingegen, richten sich nur gegen ein einzelnes Epitop, was zu einer höheren Spezifität führt. Hierbei ist der Nachteil, dass zur adäquaten Verwendung eine Demaskierung des Antigens notwendig ist. Monoklonale Antikörper finden ihren Ursprung in lediglich einem B-Lymphozyten, sind damit identisch und werden mit der Hybridom-Technik hergestellt. Meist wird dabei eine Maus mit dem Antigen infiziert, was zu einer Bildung von B-Lymphozyten und somit einer Antikörperbildung führt. Anschließend werden die B-Lymphozyten isoliert und mit Plasmazellen eines Plasmazytoms fusioniert. Hierbei entsteht eine sogenannte Hybridomzelle, die unbegrenzt viele der spezifischen Antikörper produzieren kann.

Die Fixierung des zu untersuchenden Gewebeschnittes findet meist in Formalin statt. Diese Behandlung führt zu kovalenten Bindungen zwischen Aldehyd und den im Gewebe vorhandenen Aminogruppen. So wird das Protein denaturiert und Antigenität sinkt. Dies kann zur Maskierung oder Zerstörung antigener

Strukturen führen. Zusätzlich hängt das Ergebnis der IHC maßgeblich von der Fixierung (Wahl und Konzentration des Fixierungsmittels, Dauer der Fixierung, Temperatur) ab.

2.2.2. Geräte

Tab. 2.2: Auflistung der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
BenchMark ULTRA (IHC/ISH Staining Module)	Ventana, Tucson, USA
Axio Imager.A2 incl. AxioCam	ZEISS, Oberkochen, Deutschland
RM 2145 Microtome	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland

2.2.3. Verwendete Chemikalien

Entparaffinierung

Ventana EZ Prep Concentrate (10x)

Verwendetes Gerät: Ventana BenchMark ULTRA

Antigen Demaskierung

Ventana ULTRA Cell Conditioning (ULTRA CC1)

Verwendetes Gerät: Ventana BenchMark ULTRA

Antikörper

Dako Anti-CD8 Antikörper

Verwendetes Gerät: Ventana BenchMark ULTRA

Antikörper-Antigen Bindungsnachweis

Ventana ultraView Universal DAB Detektionssystem

- HRP Multimer (<50 µg/ml Ziegen-Anti-Maus-IgG, Ziegen-Anti-Maus-IgM, Ziegen-Anti-Kaninchen in Proteinpuffer
- Peroxidase Inhibitor: 3 % H₂O₂
- H₂O₂ 0,04 % in Phosphatpufferlösung
- DAB Chromogen 0,2 %
- Copper 5 g/L CuSO₄

Verwendetes Gerät: Ventana BenchMark ULTRA

Gegenfärbung

Hämalaun Nach Mayer (1000 ml)

- 800 ml destilliertes H₂O
- 1g Hämatoxylin
- 0,2g NaIO₃
- 50 g Kalilaun
- 50 g Chloralhydrat
- 1 g Citrat

Verwendetes Gerät: kein Gerät verwendet (manuell durchgeführt)

Entwässerung

Aufsteigende Alkoholreihe aus Ethanol 70 %, 90%, 96 %, Xylol

Verwendetes Gerät: kein Gerät verwendet (manuell durchgeführt)

Eindeckung

Leica CV Mount

Verwendetes Gerät: kein Gerät verwendet (manuell durchgeführt)

2.2.4. Verwendete Antikörper

Die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers erfolgt, wie oben beschrieben, über die Hybridom-Technik. Bei dem verwendeten Primärantikörper handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper der Firma Dako. Weitere Details sind in der folgenden Tabelle (Tab. 2.3) aufgeführt.

Tab.2.3: Verwendeter Primärantikörper

Spezifität	Herkunft, Klonalität	Klon	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
CD8	Maus, monoklonal	C8/144B	IgG1, Kappa	1:50	Dako, Glostrup, Dänemark

2.2.5. Durchführung der Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Färbung wurden die unter 2.1.2 „Geräte“ aufgeführten Hilfsmitteln verwendet. Die Färbung wurde mit dem Ventana BenchMark ULTRA Färbesystem angefertigt. Mit diesem System ist es möglich, über einen auf den jeweiligen Objektträger gedruckten Barcode, das zugehörige Färbeprotokoll abzurufen.

Vor der Anfertigung der Tumorschnitte wurde eine Sensitivitätsprüfung mit dem empfohlenen Testgewebe durchgeführt. Für diese Positivkontrolle wurde als Testgewebe ein Tonsillenpräparat verwendet, da hier eine hohe Infiltration CD8⁺-Zellen zu erwarten ist.

Das in dieser Arbeit angewandte immunhistochemische Färbeprotokoll wurde wie folgt durchgeführt. Zunächst war eine fachgerechte Herstellung des Gewebeschnittes nötig. Dazu wurde das Präparat zugeschnitten und entparaffiniert. Die Anfertigung der Gewebeschnitte wurde per Mikrotom durchgeführt. Mit diesem wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einem Objektträger platziert. Zur Entparaffinierung wurde der Gewebeschnitt im Färbeautomaten mit Ventana EZ Prep Concentrate bei 72 °C und einem Wirbelmixer behandelt. Die erhöhte Temperatur führte zum Schmelzen der Paraffinschicht, wobei die Detergenz (Ventana EZ Prep Concentrate) die Oberflächenspannung der wässrigen Lösung herabsetzte. So wurde das geschmolzene Paraffin aus dem Gewebe entfernt und zur Wasseroberfläche bewegt. Die Bewegung des Wirbelmixers, verhinderte das Wiederabsetzen des Paraffins und es konnte so entfernt werden.

Den nächsten Schritt stellte die Hitzevorbehandlung dar. Diese diente der Antigendemaskierung. Hierbei wurden die bei der Fixierung entstandenen Vernetzungen teilweise wieder aufgebrochen, so dass die Konformation der antigenen Strukturen wiederhergestellt wurde.

Zur Antigendemaskierung wurde der Objektträger nach einer 8-minütigen Aufwärmphase, bei 95 °C für 64 Minuten mit Ventana ULTRA Cell Conditioning (ULTRA CC1) behandelt.

Bei ULTRA CC1 handelte es sich um einen Tris-basierten Puffer, der bei Erwärmen zur Hydrolyse der durch Formalin erzeugten kovalenten Bindungen zwischen dem Aldehyd und den im Gewebe vorhandenen Aminosäuren führt. Durch diese Bindung wurde das Protein denaturiert und vermutlich zusammenhängend hiermit die Antigenbindungswahrscheinlichkeit herabgesetzt. So wurde durch die Behandlung mit ULTRA CC1 die Möglichkeit der Antikörperbindung optimiert und ein besseres Signal erzeugt. Dieser Vorgang wird als Antigendemaskierung bezeichnet.

Nach dieser Vorbereitungsphase wurde der Gewebeschnitt mit dem primären CD8-spezifischen Antikörper (monoklonaler Maus-Antikörper, Dako) mit einer Verdünnung von 1:50 per Hand („Hand Apply“), bei Antikörper-Inkubationstemperatur (37 °C) inkubiert. Dieser Vorgang dauerte weitere 60 Minuten.

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper, wurde das Ventana ultraView Universal DAB Detektionssystem hinzugegeben. Hierbei handelte es sich um ein indirektes, biotinfreies Nachweissystem von primären Antikörpern. Dieses System macht sich die indirekte Nachweismethode zu Nutze. Es wurde also ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper verwendet. Dieser war seinerseits an ein Substrat-Chromogen-System gekoppelt. Bei der chromogenen Reaktion kommt es durch HRP zur Umsetzung des Chromogens DAB, wodurch ein braunes Präzipitat entsteht, das die Lokalisation der

Antigene anzeigt. Die Funktionsweise des View DAB Detection Kits wurde in Abbildung 2.1. verdeutlicht.

Das Ventana ultraView DAB Detection Kit besteht aus einem Peroxidase-Inhibitor, einem HRP Multimer, einem Chromogen, Wasserstoffperoxid und Kupfersulfat. Die einzelnen Bestandteile sind in Tab. 2.3 aufgelistet. Der Peroxidase-Inhibitor dient der Deaktivierung endogener Peroxidasen. Durch diesen Mechanismus sollen falsch positive Ergebnisse verringert werden. Wasserstoffperoxid dient der HRP als Substrat für die stattfindende Enzymreaktion. Die hier freiwerdenden Protonen führen durch Oxidierung des annähernd farblosen Chromogens (hier DAB) zu einem Farbumschlag. Hierbei kommt es zusätzlich zur Bildung von Wasser. Es entsteht ein DAB-Polymer. Dieser Vorgang bildet die Grundvoraussetzung für den Farbumschlag, der sich im Falle von DAB braun präsentiert. Die Zugabe der Kupfersulfatlösung führt zu einem verstärkten Farbkontrast.

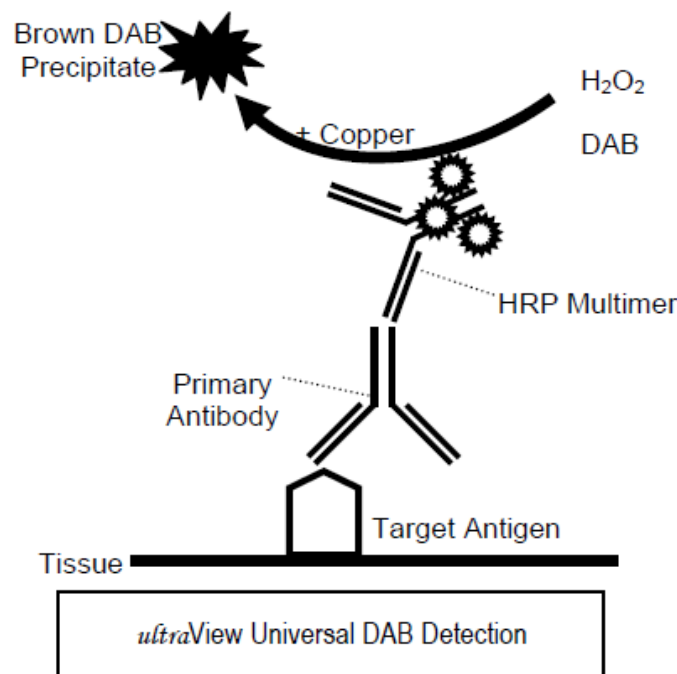


Abb. 2.1.: Funktionsweise des ultraView DAB Detection Kit (aus Packungsbeilage „ultraView Universal DAB Detection Kit“ (Ventana, 2011))

Nach der Hinzugabe des Ventana ultraView DAB Detektionssystems wurde der Schnitt aus dem Färbeautomat entnommen und es wurde manuell fortgeföhren. Nun folgte ein Spülvorgang mit destilliertem Wasser. Anschließend wurde der Schnitt mit einer Färbung mit Hämalaun nach Mayer für 1 Minute gegengeföhrt. Nach dem Vorgang der Gegenföhbung folgte eine erneute 10-minütige Spülung mit Leitungswasser. Zur Entwässerung wurde das Gewebe nun mit einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70%, 90%, 96 % Ethanol und letztlich mit einem Xylolbad bearbeitet. Zur abschließenden Fixierung wurde anschließend noch Leica CV Mount Eindeckmittel aufgetragen.

Zur Bestimmung der CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio wurde aus demselben Patientenkollektiv in gleicher Weise wie für CD8 beschrieben, immunhistochemische Präparate mittels FoxP3-Antikörper angefertigt. Dies erfolgte mit einem monoklonalen IgG1 Anti-FoxP3-Antikörper der Firma Abcam in einer Verdünnung 1:40.

2.2.6. Auswertung der Antikörperfärbung

Für die Auswertung der Antikörperfärbung wurden Fotos der invasiven Tumorgrenze (*invasive margin* (IM)) angefertigt. Dies geschah durch zwei Doktoranden. Das hierfür verwendete Lichtmikroskop war das Axio Imager.A2 mit installierter AxioCam der Firma Zeiss. Mit einer 4x – 10x Vergrößerung wurden aus jedem immunhistologisch gefärbten Schnitt drei Gesichtsfelder unterschiedlicher Lokalisation im IM mit der höchsten Anzahl an positiven Zellen in 20x Vergrößerung, sog. „high power field“ (HPF), über die am Lichtmikroskop (Axio Imager.A2, Zeiss) installierte Digitalkamera fotografiert. Es wurde darauf geachtet, dass für die Auswertung das Foto des Gesichtsfeldes zur Hälfte (50 %) Tumorgewebe und zur anderen Hälfte (50 %) tumorfreies Gewebe abbildete. Zur Auswertung wurde unter tumorfreiem Gewebe physiologisches, inflammatorisches und fibrosiertes Pankreasgewebe verstanden. Diese sog. „Hotspots“ lagen folglich allesamt im IM. Der IM wurde definiert als jeweils 500 µm breiter Bereich beidseits der Grenze zwischen maligne entarteten Zellen und tumorfreiem Gewebe⁶⁸. Eine schematische Darstellung des Tumorrandbereichs zeigt Abbildung 2.2. Die Größe des Gesichtsfeldes bei einer 20x Vergrößerung beträgt näherungsweise 0,15 mm² (450 µm x 333 µm). Dies entspricht dem abgelenkten Ausschnitt des eigentlichen Okularfeldes. Die Anfertigung der Bilder hatte zum Ziel, eine Steigerung der Objektivität und eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Bei der Auswertung der digitalen Bilder wurden jeweils die CD8⁺-Zellen im gesamten Gesichtsfeld und die CD8⁺-positiven Zellen im Tumorareal separat ausgezählt. So konnte zusätzlich zur Gesamtzahl, zwischen CD8⁺-Zellen im intra- und im peritumoralen Areal unterschieden werden. Pro Schnitt wurden jeweils drei HPFs fotografiert und ausgewertet. Aus diesen drei HPFs wurde dann ein Mittelwert gebildet, der für die statistische Auswertung verwendet wurde. Die Auswertung erfolgte zunächst verblindet durch zwei Doktoranden. Aufgrund möglicherweise subjektiver Zählweise, wurde anschließend eine interne (erneute Auszählung des gleichen Untersuchers zu einem späteren Zeitpunkt) und eine externe Kontrolle (erneute Auszählung des anderen Untersuchers zu einem späteren Zeitpunkt) durchgeführt. Bei weiteren unklaren Fällen erfolgte eine erneute Kontrolle durch einen Facharzt für Pathologie.

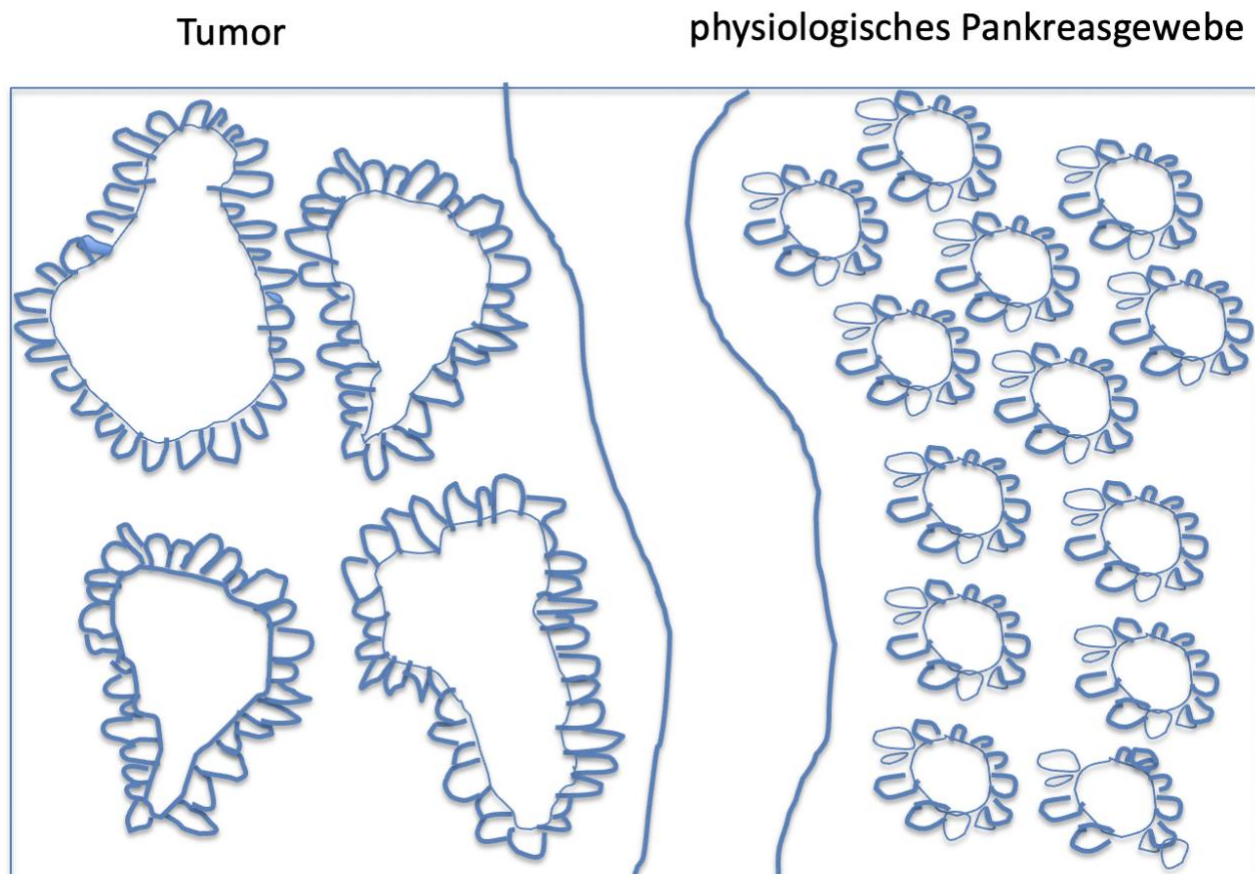


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Tumorrandbereichs (links: Tumorgewebe, mittig: Stroma, rechts: physiologisches Pankreasgewebe)

2.2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Statistiksoftware „Graphpad PRISM“ (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

Hiermit wurde die Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Maier durchgeführt. Zusätzlich wurde mittels Mann-Whitney-U-Test die CD8-Infiltration in Bezug auf verschiedene molekularbiologische und histopathologische Merkmale verglichen. Dieser wird für zwei ungepaarte, nicht normalverteilte Stichproben verwendet. Hierbei wurden p-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

Die Patientendaten wurden mit dem Programm „Excel“ (Microsoft) archiviert und aufgearbeitet. Zusätzlich konnten hiermit Diagramme und Tabellen erstellt werden.

2.2.7.1. Statistische Auswertung der CD8-Infiltration in Bezug auf das Gesamtüberleben

Da 2 der 83 Patienten in den ersten 30 postoperativen Tagen an nicht-tumorassoziierten Ursachen (Myokardinfarkt oder infektiösen Geschehen) verstarben, wurden diese nicht in die Überlebensanalyse

eingeschlossen. Bei weiteren 4 Patienten war die Durchführung einer immunhistochemischen Untersuchung aufgrund von qualitativ nicht ausreichenden Präparaten nicht möglich. So verblieben 77 Patienten für die statistischen Auswertungen in Betrachtung auf das Gesamtüberleben. Die Einteilung erfolgte anhand des Medians der gezählten CD8⁺-Zellen in zwei Gruppen. Im Zusammenhang mit der Kaplan-Maier-Überlebensanalyse wurde als Ereignis das Versterben der Patienten definiert. Das mediane Gesamtüberleben war hier der Zeitpunkt, bei dem die Hälfte der Patienten ein Ereignis erlitten haben (Zwiener et al., 2011). Patienten, die zu Studienende noch lebten, wurden zensiert.

2.2.7.2. Statistische Auswertung der CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio in Bezug auf das OS

Zusätzlich wurde aus einem Kollektiv von 46 Patienten eine CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio gebildet. Die für die Berechnung zugrundeliegenden Daten der Zellzahl der FoxP3⁺-Zellen ging aus einer weiteren Auswertung des Patientekollektivs, die bereits in einer weiteren Promotion („FoxP3 als prognostischer Marker beim chirurgisch therapierten Pankreaskarzinom - eine retrospektive Analyse unter Einbeziehung der Immunhistochemie“ (Maximilian Klippstein) veröffentlicht wurde, hervor. Die verwendeten Daten sind in einer Tabelle im Anhang unter dem Punkt 7.1.4. „Auswertung FoxP3⁺-Zellen“ zusammengefasst. Es wurde die CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio (Quotient aus CD8⁺-Zellen und FoxP3⁺-Zellen) in Zusammenhang mit dem OS gebracht. Zur Feststellung eines Zusammenhangs wurde ebenfalls eine Kaplan-Maier-Überlebenskurve verwendet.

2.2.7.3. Statistische Auswertung der CD8-Infiltration in Bezug auf die Lokalisation des Rezidivs

Bei 51 Patienten kam es im Verlauf zur Entwicklung eines Rezidivs. Diese Patienten kamen für die Analyse der Zusammenhänge zwischen der CD8-Infiltration und der Entwicklung eines Rezidivs, bzw. dessen Lokalisation, in Betracht. Aufgrund 3 fehlender Präparate wurde ein Kollektiv von 48 Patienten untersucht. Es wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Verglichen wurde die Anzahl der CD8⁺-Zellen bei Patienten, die im Verlauf ein Lokalrezidiv erlitten mit Patienten, die an einem Fernrezidiv erkrankten. Das Lokalrezidiv wurde zunächst mit dem Gesamtkollektiv der Fernrezidive vergleichen. Zusätzlich wurde dann nach einem Zusammenhang in Bezug auf die jeweilige Lokalisation (Leber, Peritoneum, Lunge) gesucht.

3. Ergebnisse

3.1. Deskriptive Statistik der erhobenen Daten

3.1.1. Beschreibung des Patientenkollektivs

Die Arbeit analysiert 83 Patienten, bei denen zwischen den Jahren 2008 – 2014 ein duktales Adenokarzinom des Pankreas diagnostiziert wurde. Alle Patienten wurden einer operativen Entfernung des Malignoms unterzogen.

Davon waren 55,42 % (46/83) der Patienten Männer und 44,58% (37/83) Frauen. Das durchschnittliche Alter zum OP-Zeitpunkt betrug 67,8 Jahre. Wiederum betrug es jeweils bei Männern 67,4 Jahre und bei Frauen 68,2 Jahre. Die Altersverteilung zum Operationszeitpunkt belief sich zwischen dem jüngsten Patienten mit 38 und dem ältesten mit 84 Jahren. In Tabelle 3.1 wurde das Patientenkollektiv übersichtshalber dargestellt.

Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums am 15.12.2015, zeigten 4 Patienten ein Überleben von über 5 Jahren. So ergab sich eine 5 Jahres-Überlebensrate von 4,8 %. Die Abbildung 3.1 zeigt die Häufigkeitsverteilung des Patientenalters in einem Balkendiagramm.

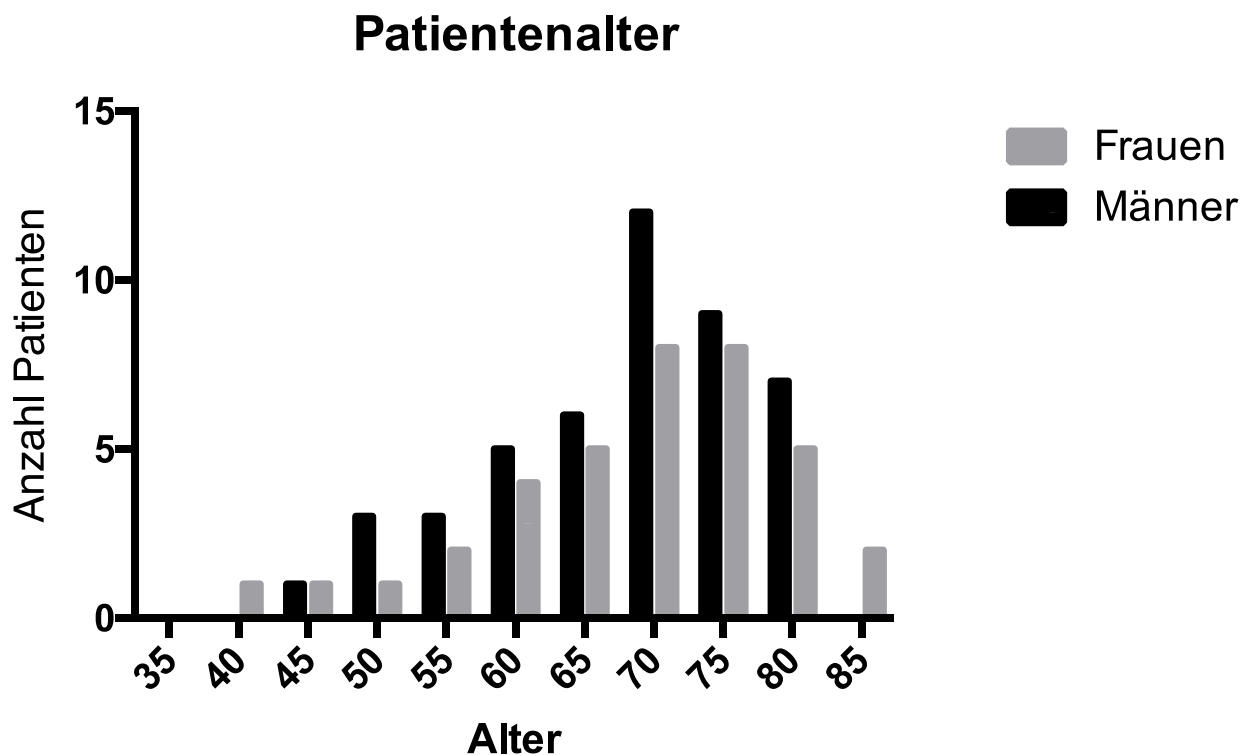


Abb. 3.1: Häufigkeitsverteilung des Patientenalters

Tab. 3.1: Übersicht des Patientenkollektivs

Charakteristika	Anzahl (%)
Anzahl der Patienten	83 (100)
Alter in Jahren (Durchschnitt zur OP)	67,8
- Männer	67,4
- Frauen	68,2
- Spannweite	38– 84
Geschlecht	
- Männer	46 (55,4)
- Frauen	37 (44,6)
Präoperativer CA 19-9-Wert	36 (43,4)
- erhöht	31 (86,1)
- normal	5 (13,9)
Diagnostik	
- Nur CT	32 (38,6)
- CT und andere Verfahren	24 (28,9)
- Kein CT	24 (28,9)
Lokalisation des Tumors	
- Caput	74 (89,2)
- Corpus	5 (6,0)
- Cauda	8 (9,6)
- davon multilokal	4 (4,8)
Staging	
- potenziell kurativ operabel	73 (88,0)
- fortgeschritten operabel (Borderline resectable)	8 (9,6)
- lokal fortgeschritten inoperabel	0 (0)
- metastasiert	2 (2,4)
Präoperative Therapie	
- Galleableitung	36 (43,4)
- Neoadjuvante Chemotherapie	0 (0)
- Neoadjuvante Radiochemotherapie	0 (0)
Operation	
- PPPD	63 (75,9)
- Kausch-Whipple-OP	8 (9,6)
- Totale Pankreatektomie	3 (3,6)
- Pankreaslinksresektion	9 (10,8)
- Pankreassegmentresektion	0 (0)
Multiviszerale Resektion	19 (22,3)
Pfortaderrekonstruktion	5 (6,0)
Arterielle Gefäßrekonstruktion	0 (0)
Histologie	
- UICC I A	4 (4,8)
- UICC I B	6 (7,2)
- UICC II A	25 (30,1)
- UICC II B	46 (55,4)
- UICC III	0 (0)
- UICC IV	2 (2,4)
Perineuralscheideninfiltration	74 (89,2)
Blutgefäßinfiltration	15 (18,1)
Lymphgefäßinfiltration	51 (61,5)

Therapie	
- Adjuvante Chemotherapie	51 (61,5)
- Keine adjuvante Chemotherapie	31 (37,4)
- Chemotherapie unklar	1 (1,2)
Komplikationen	39 (47,0)
Erstrezidiv	
- Lokal	11 (13,3)
- Leber	18 (21,7)
- Lunge	6 (7,2)
- Peritonealkarzinose	7 (8,4)
- Andere Lokalisation	9 (10,8)
- Kein Rezidiv	42 (50,6)
Überleben	
- Lebend	35 (42,2)
- Verstorben	48 (57,8)
- Mit Rezidiv	41 (49,4)
- Ohne Rezidiv	7 (8,4)

3.1.1.1. Präoperative Tumormarker

Präoperativ wurden bei 43,4 % (36/83) der Patienten der Tumormarker CA-19-9 bestimmt. Der Tumormarker CEA wurde bei 26 (31,3%, 26/83) Patienten präoperativ ermittelt. Dabei wurden bei 26 Patienten beide Tumormarker erhoben. Bei 10 Patienten wurden nur CA-19-9 und bei keinem Patienten nur CEA bestimmt. Der CA-19-9-Wert zeigte sich bei 86,1 % (31/36) der Patienten erhöht (über 37 U/ml) und bei 13,9 % (5/36) im Normbereich. Der CA-19-9-Wert bewegte sich zwischen 3,8 U/ml und 3202 U/ml.

3.1.1.2. Diagnostik

Die Diagnostik wurde mit CT, MRT, MRCP, Endosonographie oder anderen Methoden durchgeführt. Die Verfahren wurden in unterschiedlichen Kombinationen angewandt. Hierbei ergab sich, dass die Diagnosesicherung bei 38,6 % (32/83) der Malignomen allein durch eine CT-Untersuchung durchgeführt wurde. Bei 28,9 % (24/83) der Patienten wurde die Diagnose durch eine CT-Untersuchung und ein weiteres der genannten Verfahren (MRT, ERCP, Endosonographie oder andere) gestellt. 28,9 % (24/83) der Patienten erhielten die Diagnose ohne eine CT. Das Diagnoseverfahren blieb bei 3,6 % (3/83) der Patienten ungeklärt.

3.1.1.3. Präoperative Intervention

Aufgrund einer präoperativen entwickelten Cholangitis oder einer Cholestase, wurde bei 43,4 % (36/83) Patienten interventionell ein Stent eingelegt. Hierbei betrug die durchschnittliche Verweildauer des jeweiligen Stents 26,9 Tage.

3.1.2. Beschreibung der tumorbezogenen Daten

Alle 83 Patienten litten an einem histologisch gesicherten duktalem Adenokarzinom des Pankreas.

3.1.2.1. Tumorlokalisation

Die große Mehrheit von 85,5 % (71/83) der insgesamt 83 Pankreaskarzinome befand sich als einziger Fokus im Kopfbereich. Lediglich 2,4 % (2/83) der Patienten zeigten als unifokale Lokalisation den Korpusbereich und 7,3 % (6/83) der Patienten wiesen eine unifokale Lokalisation im Pankreasschwanz auf. Bei 4,8 % (4/83) der Patienten kam es zu einem diffusen Wachstum. Die Abbildung 3.2 illustriert das Vorkommen der verschiedenen Lokalisationen.

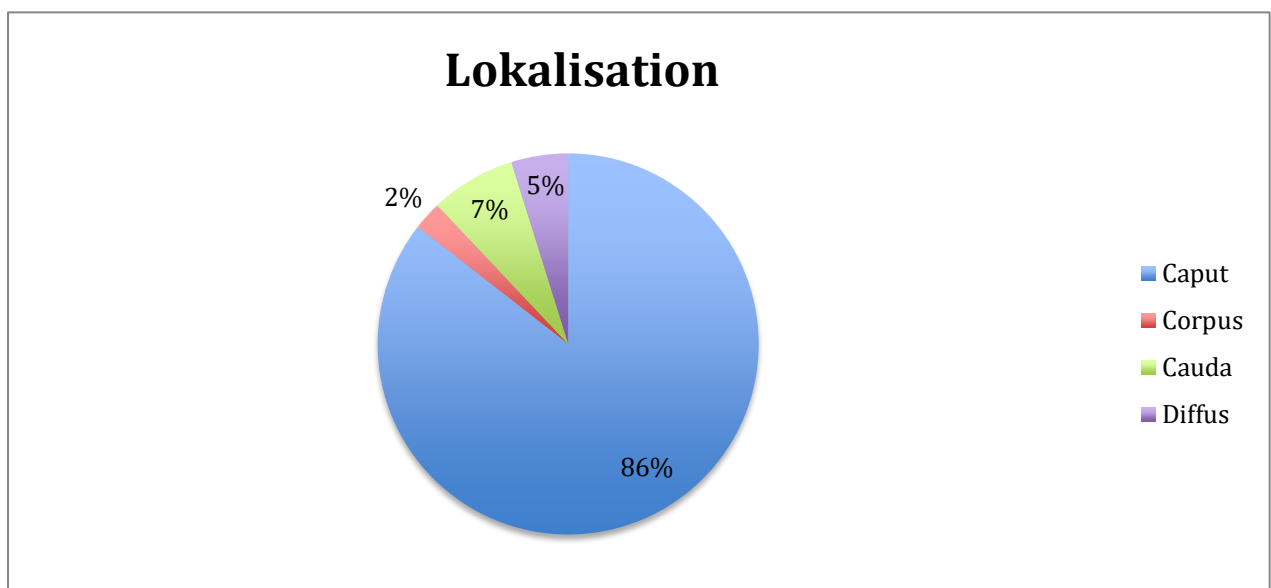


Abb. 3.2: Diagramm zur Häufigkeit der verschiedenen Lokalisationen des PDAC

3.1.2.2. Resektabilität

Alle 83 Patienten wurden einer operativen Resektion des Malignoms unterzogen (siehe Abbildung 3.3). Als potenziell kurativ operabel zeigten 88 % (73/83) der eingeschlossenen Patienten. Weitere 9,6 % (8/83) der Patienten ergaben einen lokal fortgeschrittenen operablen Befund. Hiervon lag in 5 Fällen eine venöse, in 1 Fall eine arterielle und in 2 Fällen eine venöse und arterielle Infiltration vor. Diese wurden

mittels Resektion operativ saniert. Bei 2,4 % (2/83) der Patienten lag bereits eine Metastasierung vor. Diese wurde intraoperativ erkannt und entfernt, zusätzlich erfolgte die primäre Resektion.

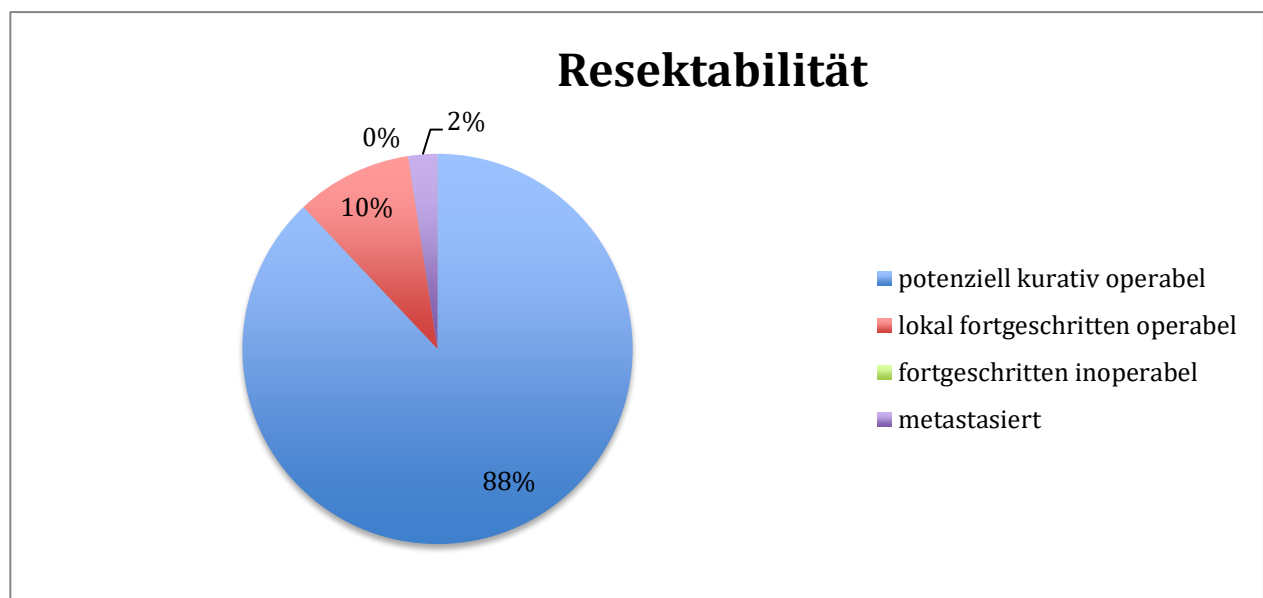


Abb. 3.3: Diagramm zur Resektabilität des PDAC

3.1.2.3. Staging und TNM-Stadium

Mit 85,6 % (71/83) präsentierte sich die Mehrheit der Tumoren im T3-Stadium nach TNM-Klassifikation. Weiter zeigten sich 6 % (5/83) im T1-, 8,4 % (7/83) im T2- und 0 % (0/83) im T4-Stadium.

Bezüglich des Lymphknotenstatus, lagen 57,8 % (48/83) der Tumore ein N1-Status vor, während 42,2 % (35/83) einen N0-Status aufwiesen.

97,6 % (81/83) der Patienten wiesen einen M-Status von M0 oder MX auf, nur 2,4 % (2/83) der Patienten zeigten einen M1-Status.

3.1.2.4. Grading

Das Grading des Tumorkollektivs setzte sich zu 13,3 % (11/83) aus Tumoren mit guter, 59 % (49/83) mit mäßiger und 25,3 % (21/83) mit schlechter Differenzierung zusammen. Bei 2,4 % (2/83) der Patienten war kein Grading angegeben (GX). Einige Beispielbilder für das Grading zeigt Abbildung 3.4.

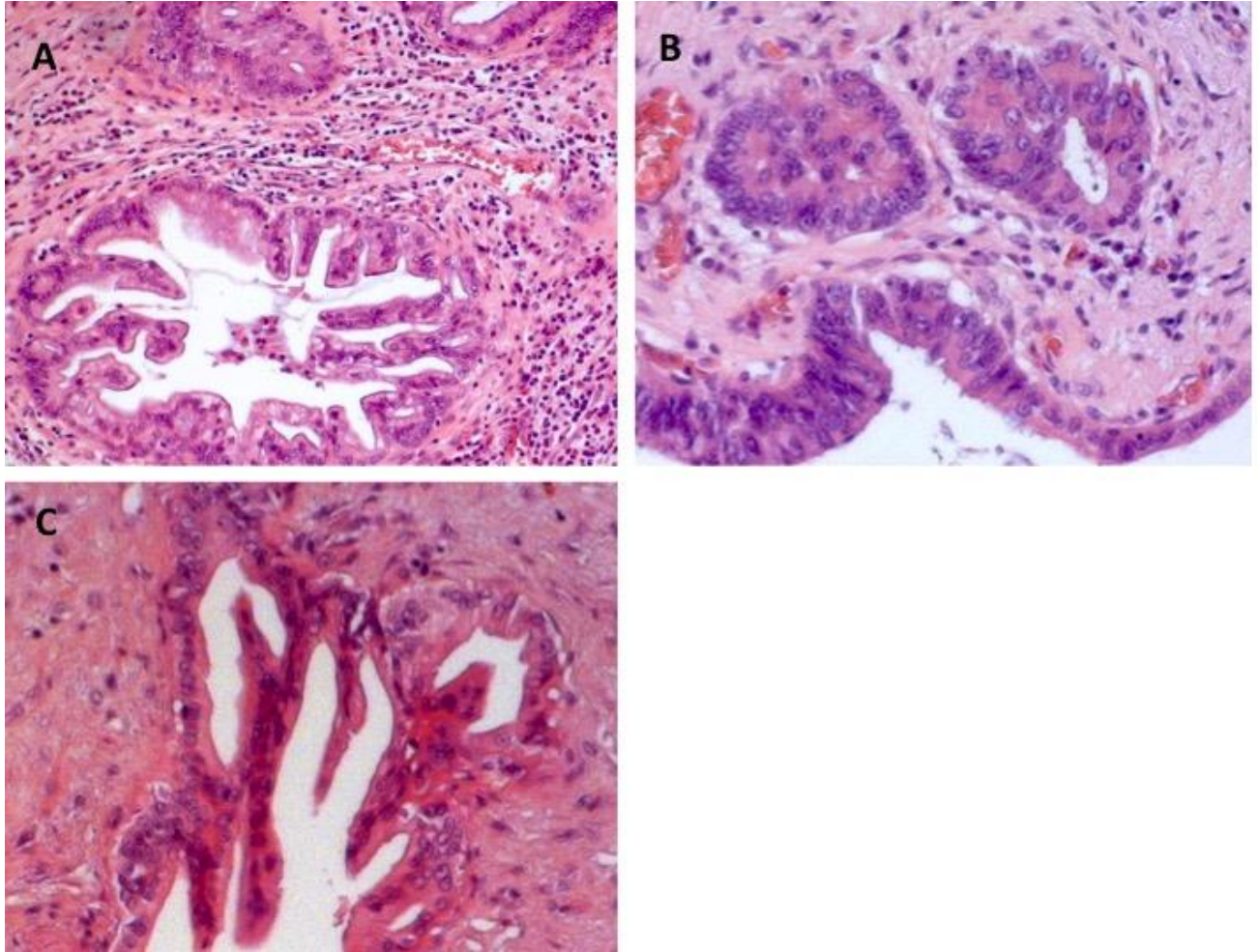


Abb. 3.4: Beispielbilder für Differenzierungsgrad des Tumors (Grading)

- | | |
|---------------------------------|------|
| (A) gut differenziert – G1 | (HE) |
| (B) mäßig differenziert – G2 | (HE) |
| (C) schlecht differenziert – G3 | (HE) |

3.1.2.5. *Lymphangiosis carcinomatosa, Perineuralscheideninvasion und Hämangiosis carcinomatosa*

Bei 61,4 % (51/83) der Patienten lag histologisch eine Lymphangiosis carcinomatosa (L1) vor. Bei weiteren 25,3 % (21/83) der Patienten konnte diese nicht nachgewiesen werden (L0), während 1,2 % (1/83) der Patienten diesbezüglich nicht beurteilbar waren (LX). Bei den restlichen 12,1 % (10/83) Patienten wurde der L-Status nicht erhoben.

Bezüglich der Perineuralscheideninvasion präsentierten sich 89,2 % (74/83) der Patienten mit einer Invasion der Nervenscheide (Pn1), 8,4 % (7/83) der Patienten wiesen hingegen keine Invasion auf. Bei den restlichen 2,4 % (2/83) der Patienten lagen hierzu keine Daten vor. Exemplarisch zeigt Abbildung 3.5 eine Perineuralscheideninfiltration.

Eine Hämangiosis carcinomatosa (V1) kam mit 18,1 % (15/83) der Patienten hingegen seltener vor. Mit einem Anteil von 66,3 % (55/83), zeigte die Mehrheit der Patienten keine Gefäßinfiltration (V0). Auch hier lagen bei 3,6 % (3/83) der Patienten keine Daten bezüglich der Hämangiosis carcinomatosa vor.

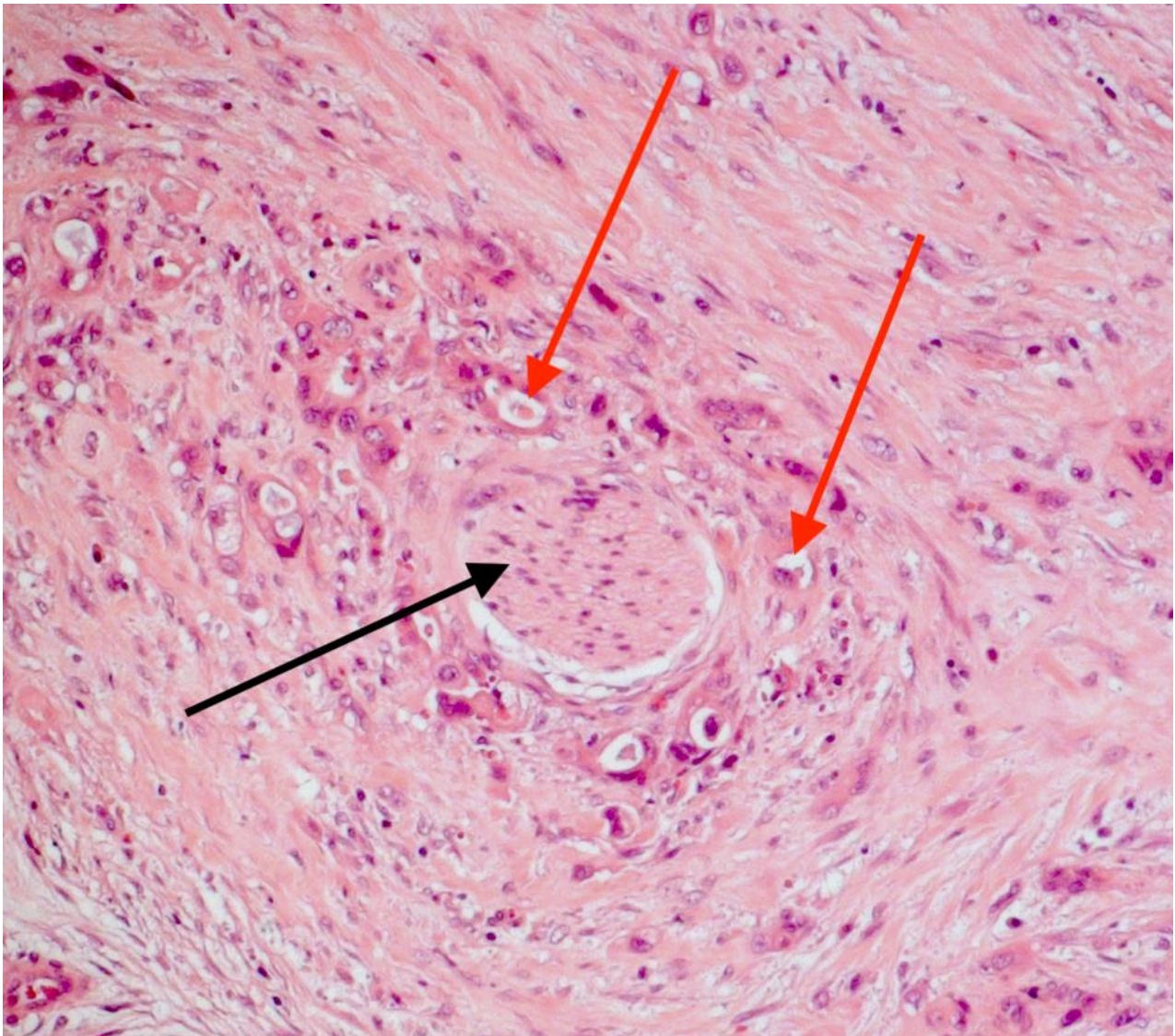


Abb. 3.5: Beispiel einer Perineuralscheideninvasion (Pn1) (Schwarz = Nervengewebe, Rot = maligne entartete Zellen; HE-Färbung, 10x)

3.1.2.6. UICC-Stadium (7. Edition)

Mit 46 Patienten lag bei 55,4 % das UICC-Stadium IIB vor. Bei 25 weiteren Patienten ergab sich ein IIA-Stadium. In Tabelle 3.2 wird eine detaillierte Übersicht der UICC-Stadien dargestellt.

Tab. 3.2: Übersicht UICC-Stadien

UICC-Stadium	n	%
IA	4	4,8
IB	6	7,2
IIA	25	30,1
IIB	46	55,4
III	0	0
IV	2	2,4

3.1.3. Beschreibung der therapiebezogenen Daten

3.1.3.1. Operative Therapie

Alle Patienten wurden einer chirurgischen Therapie unterzogen und nach diesem Kriterium ausgewählt. Bei 75,9 % (63/83) der Patienten wurde eine pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie (PPPD) durchgeführt. Bei 9,6 % (8/83) hingegen, erfolgte eine partielle Duodenopankreatektomie (Operation nach Kausch-Whipple). 10,8 % (9/83) der Patienten erhielten eine Pankreaslinksresektion, 3,6 % (3/83) der Patienten eine totale Pankreatektomie. Die Häufigkeit der verschiedenen Verfahren wurde in Abbildung 3.6 zusammengefasst.

Während der operativen Therapie, musste in 6 % (5/83) der Fälle eine Pfortaderrekonstruktion erfolgen. Eine arterielle Rekonstruktion hingegen war in keinem Fall (0 %, 0/83) notwendig.

Bei 13 (15,7 %, 13/83) Patienten kam es zu einer Multiviszeralresektion, wobei hier bei einem Patienten unter Beteiligung von mehr als zwei Organen operiert wurde. Einzeln betrachtet, wurden folglich 12 zusätzliche Resektionen durchgeführt. Zur Beseitigung möglicher Filiae wurden 5 (41,7 %, 5/12) atypische Leberresektionen durchgeführt. Weiter kam es zu 3 (25 %, 3/12) erweiterten Magenresektionen, 2 (16,7 %, 2/12) Kolonresektionen, 1 (8,3 %, 1/12) Nierenresektion und 1 (8,3 %, 1/12) Nebennierenresektion.

Der durchschnittliche Zeitraum von Diagnose bis zur Operation betrug 16,3 Tage. Die Verteilung der resezierten Organe wurde in Abbildung 3.7 dargestellt.

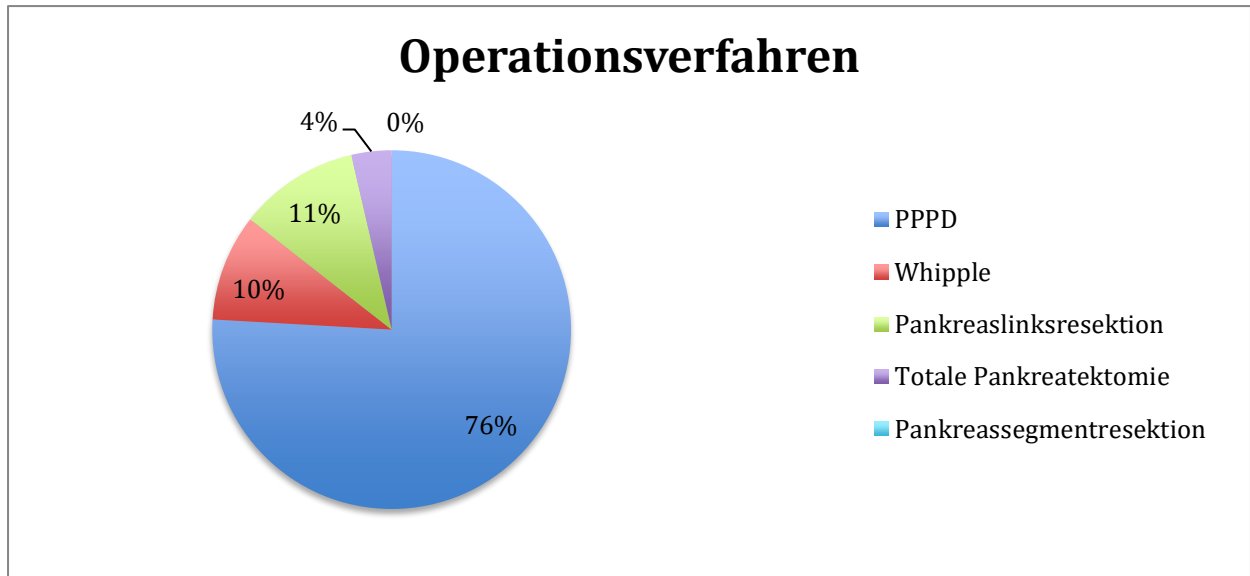


Abb. 3.6: Diagramm zur Häufigkeit der verschiedenen Operationsverfahren

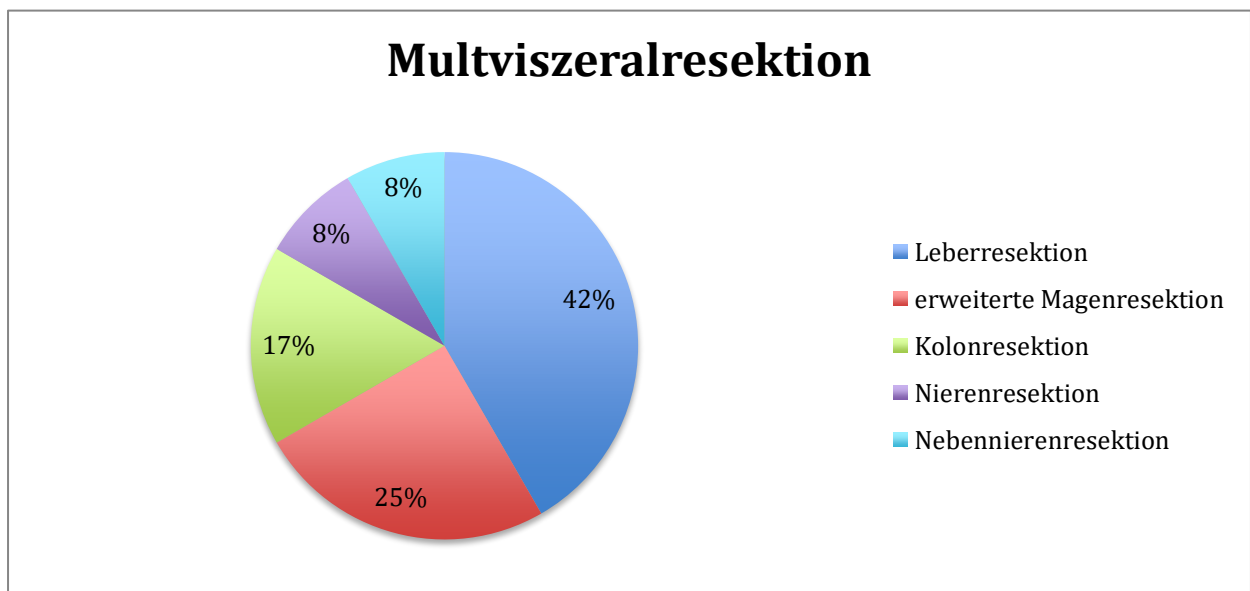


Abb. 3.7: Diagramm zur Multiviszeralresektion bei der operativen Therapie des PDAC

Bei 73,5 % (61/83) der Patienten konnte eine R0-Resektion durch den Pathologen bestätigt werden. Bei den restlichen 26,5 % (22/83) konnte lediglich eine R1-Resektion durchgeführt werden. Eine R2-Situation lag in keinem Fall vor. Da die CRM-Klassifikation erst im Jahr 2013 Einzug in den klinischen Alltag gefunden hat, lag hierzu nur ein unvollständiger Datensatz vor.

3.1.3.2. Postoperativer Verlauf

Die Patienten verbrachten durchschnittlich 4,2 Tage postoperativ auf der Intensivstation. Der maximale Aufenthalt auf Intensivstation betrug 40 Tage. Der durchschnittliche Zeitraum zwischen der Operation

und der Entlassung bezifferte sich auf 24 Tage. Innerhalb der ersten 30 postoperativen Tage verstarben insgesamt 2 (2,4 %) der 83 Patienten.

3.1.3.3. Komplikationen

Bei 34 (41 %) Patienten kam es zu Komplikationen. Dadurch musste bei 11 (13,3 %) Patienten mindestens eine Revisionsoperation durchgeführt werden. Einige Patienten entwickelten im Verlauf mehrere Komplikationen. Bei den erwähnten 34 Patienten kam es zu 49 Komplikationen. Bei diesen handelte es sich zu 26,5 % (13/49) Pankreasanastomoseninsuffizienzen, zu 10,2 % (5/49) um biliodigestive Anastomoseninsuffizienzen und zu 6,1 % (3/49) um Insuffizienzen der Gastroenterostomie. Des Weiteren kam es in 2 % (1/49) der Fälle zu einem Platzbauch, in 20,4 % (10/49) zu einer Lymphfistel und in 10,2 % (5/49) zu intraabdominellen Nachblutungen. Ebenfalls entwickelte sich bei 24,5 % (12/49) ein entzündlicher Prozess. Diese setzen sich zu 14,3 % (7/49) aus Pankreatitiden, zu 8,2 % (4/49) aus intraperitonealen Abszessen und zu 2 % (1/49) aus Peritonitiden zusammen. Abbildung 3.8 zeigt die Häufigkeiten des Auftretens der verschiedenen Komplikationen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Komplikationen.

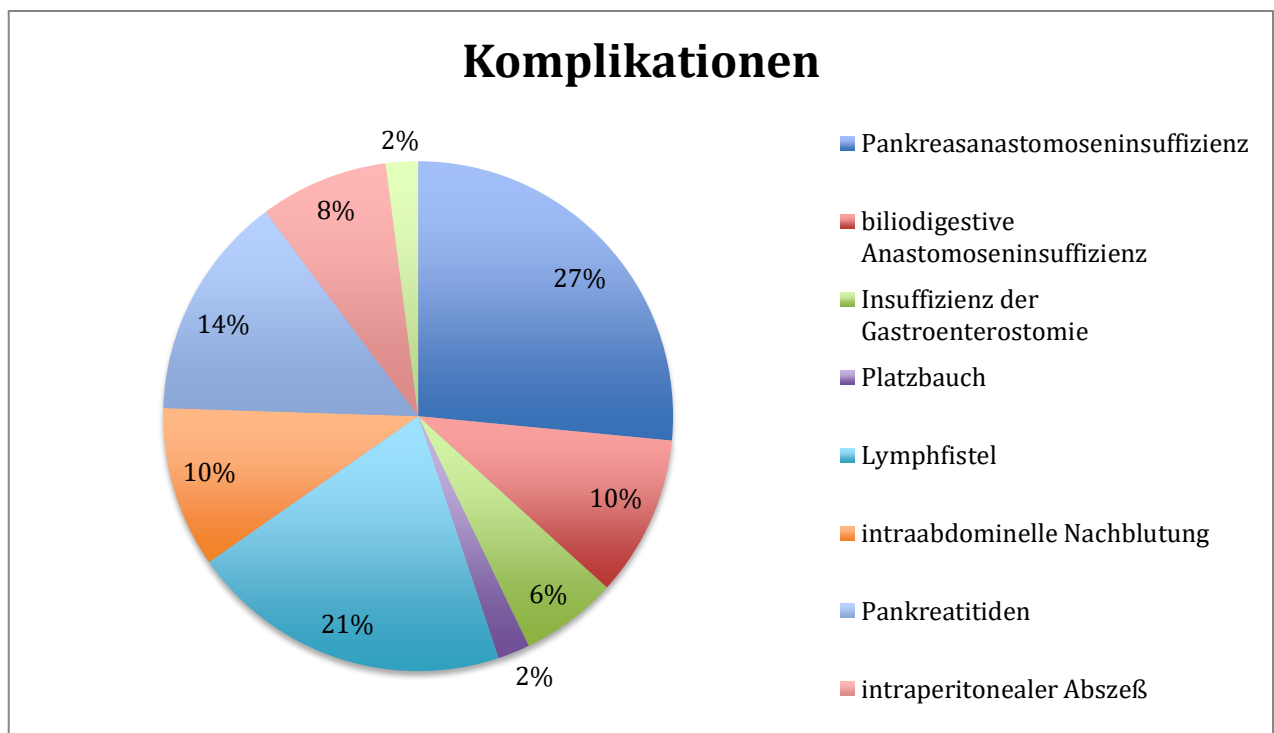


Abb. 3.8: Diagramm zur Häufigkeit der verschiedenen Komplikationsarten im Verhältnis zur Gesamtzahl der Komplikationen

3.1.3.4. Adjuvante Chemotherapie

Eine adjuvante Chemotherapie erhielten 61,4 % (51/83) der Patienten des Kollektivs. Bei 37,4 % (31/83) der Patienten wurde aus medizinischen Gründen oder auf persönlichen Wunsch des Patienten, auf eine adjuvante Chemotherapie verzichtet. Bei 1,2 % (1/83) der Patienten war der Erhalt einer adjuvanten Therapie nicht aus den Daten ersichtlich. Die Darstellung dieser Ergebnisse findet sich in Abbildung 3.9. Bei 11 Patienten fand aufgrund eines Progresses oder starken Nebenwirkungen eine Therapieumstellung statt.

Die adjuvante Chemotherapie bestand bei 68,6 % (35/51) der Patienten aus einer Gemcitabin-Monotherapie, bei 15,7 % (8/51) der Patienten aus Gemcitabin und Nab-Paclitaxel, bei 9,8 % (5/51) der Patienten aus Gemcitabin und Erlotinib und bei weiteren 3,9 % (2/51) der Patienten aus FOLFIRINOX. Mit dem Wirkstoff 5-Fluorouracil (5-FU) wurde keine (0/51) adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Bei 2 % (1/51) Patienten blieb, wie oben erwähnt, der Wirkstoff ungeklärt. Die unterschiedlichen Wirkstoffe wurden in Abbildung 3.10 zusammengefasst.

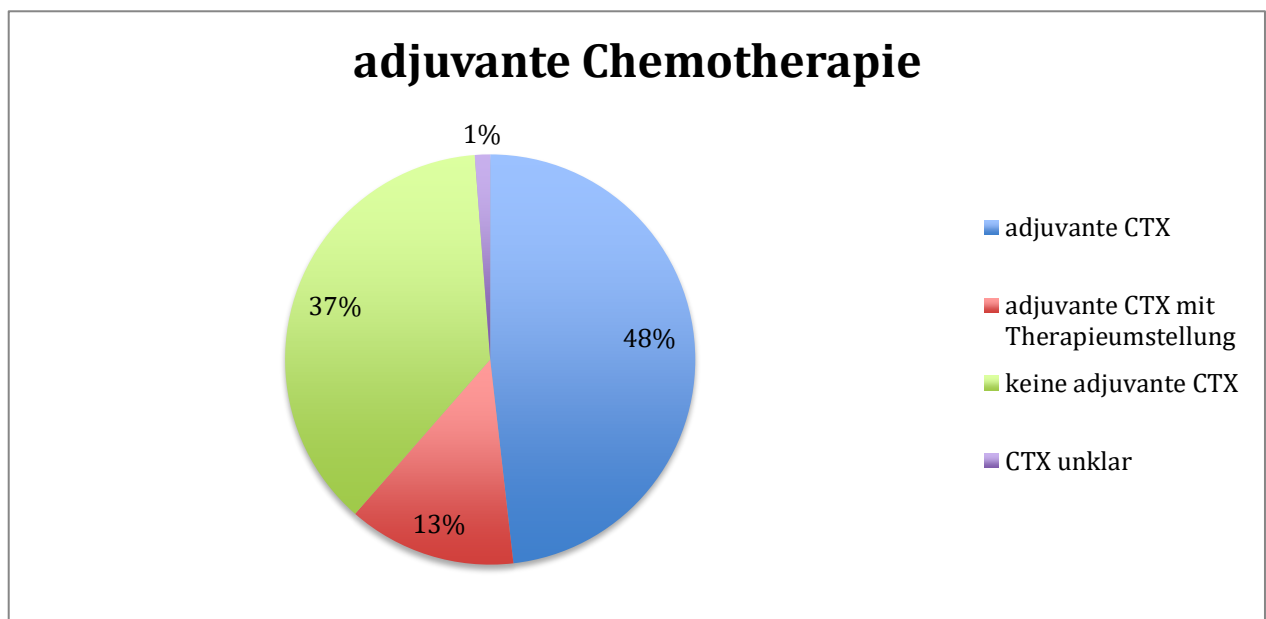


Abb. 3.9: Diagramm zur Anwendung einer adjuvanten Chemotherapie

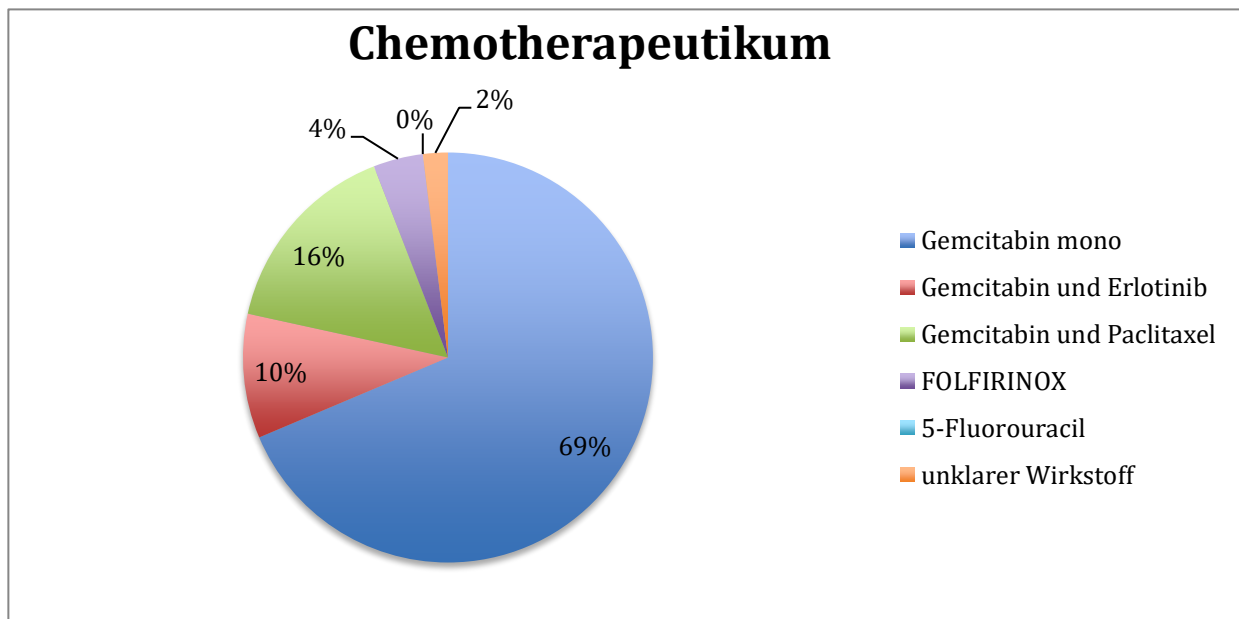


Abb. 3.10: Diagramm der angewendeten Chemotherapeutika

3.1.3.5. Entwicklung eines Rezidivs

Von den im Zeitraum zwischen den Jahren 2008 bis 2014 operierten Patienten, entwickelten 61,4% (51/83) ein Rezidiv. Im Rahmen des „Follow-Up“ wurde gezeigt, dass 80,4 % (41/51) der rezidierten Patienten, im Beobachtungszeitraum bis zum 15.12.2015 an diesem Rezidiv verstarben.

Als rezidivfrei zeigten sich 30,1 % (25/83) der Patienten des Gesamtkollektivs. Weitere 8,4 % (7/83) der Patienten verstarben an anderen Ursachen. Der rezidivfreie Zeitraum (*disease free survival, DFS*) wurde definiert als verstrichene Zeit in Monaten zwischen dem Operationsdatum und dem Auftreten eines Rezidivs. Das mediane DFS betrug 10,1 Monate. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums verstarben 57,8 % (48/83) der Patienten, während die anderen 42,2 % (35/83) überlebten. Das OS wurde definiert als verstrichene Zeit in Monaten vom Operationsdatum bis zum Tod des Patienten. Das durchschnittliche OS betrug 21,10 Monate. Unter den Patienten, die ein Rezidiv aufwiesen, kam es in 40 Fällen (78,4 %, 40/51) zu lediglich einem Rezidiv an einer Lokalisation. In 11 (21,6 %, 11/51) Fällen kam es zu mehr als einer Neubildung. An einem Leberrezidiv erkrankten 35,3% (18/51) der Patienten. Eine Peritonealkarzinose erlitten 13,7% (7/51) der Patienten, 21,6 % (11/51) der Patienten zeigten ein Lokalrezidiv. Weitere 11,8 % (6/51) der Patienten erlitten ein Lungenrezidiv als Erstrezidiv. In 17,6 % (9/51) der Fälle zeigte sich eine Metastasierung an anderen Lokalisationen, wie Knochen oder Gehirn. Diese wurden unter dem Punkt „sonstige“ zusammengefasst. Die unterschiedlichen Lokalisationen der Rezidive wurden in dem in Abbildung 3.11 abgebildeten Diagramm dargestellt.

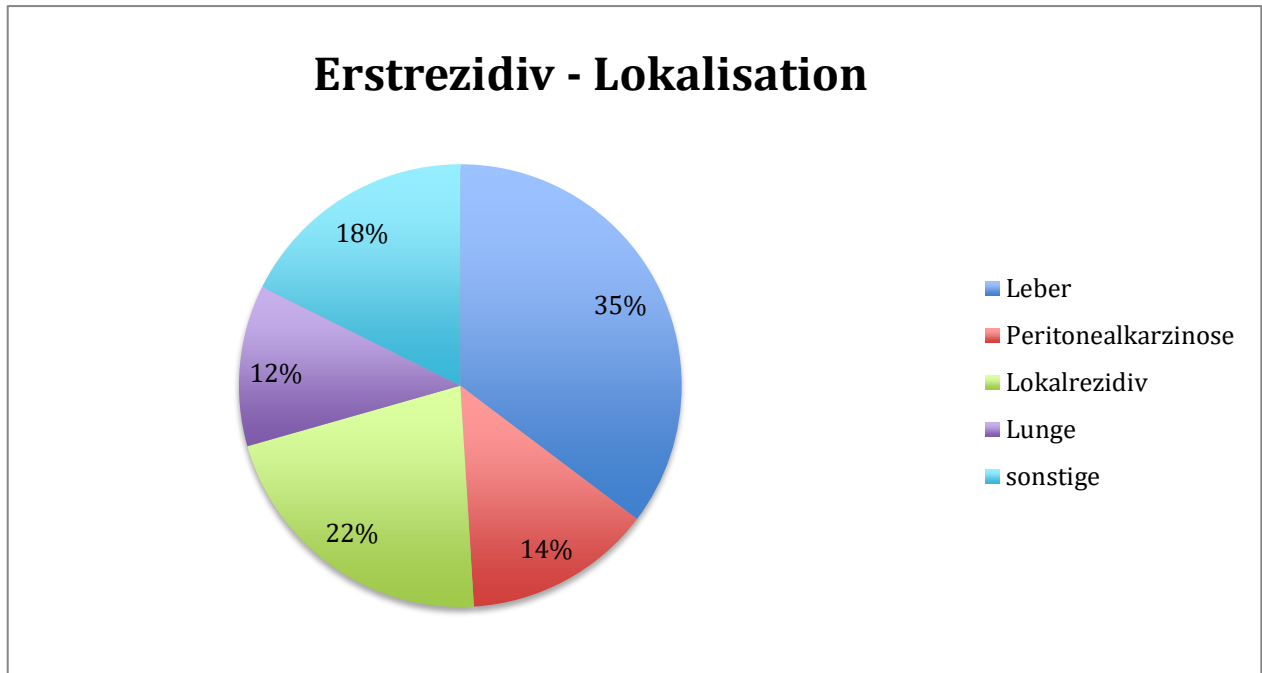


Abb. 3.11: Diagramm zur Lokalisation des Erstrezidivs

3.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit CD8

Die Auszählung der immunhistochemischen Färbung wurde bei insgesamt 79 der 83 (95,2 %) Patienten durchgeführt. Aufgrund fehlender immunhistochemisch gefärbter Schnitte konnte die Auszählung bei 4 (4,8 %) Patienten nicht durchgeführt werden.

Die Auswertung erfolgte durch mikroskopische Auszählung der im HPF befindlichen CD8⁺-Zellen (gesamten HPF, sowie im abgebildeten intra- und peritumoralen Areal). Beispielhaft zeigt dies die Abbildung 3.12. Im Folgenden werden CD8⁺-Zellen als CTLs bezeichnet. Weiter werden CTLs, die sich im intratumoralen Bereich des abgebildeten IM befinden als „CD8⁺-CTL^{tum}“. CD8⁺-CTLs, die sich im peritumoralen Bereich befinden als „CD8⁺-CTL^{per}“ und CD8⁺-CTLs im gesamten abgebildeten IM als „CD8⁺-CTL^{im}“ bezeichnet.

Die durchschnittliche Gesamtzahl der CD8⁺-CTL^{im} betrug 68,97, der CD8⁺-CTL^{tum} 16,83 und der CD8⁺-CTL^{per} 52,14. Das Vorkommen von CD8⁺-CTLs lag im IM im Durchschnitt zwischen 13 und 202,33 Zellen. Intratumoral ergaben sich Durchschnittswerte von 3 – 47,33 und peritumoral von 8 – 158,33 CD8⁺-Zellen. Eine Übersicht über die Ergebnisse befindet sich im Anhang unter dem Punkt 7.1.3. „Auswertung CD8-Zellen“.

Der Anteil der CD8⁺-CTL^{tum} im Verhältnis zu CD8⁺-CTL^{im} (rechnerisch: CD8⁺-CTL^{tum}/ CD8⁺-CTL^{im}) lag zwischen 4 % - 77 % mit einem Median von 23%.

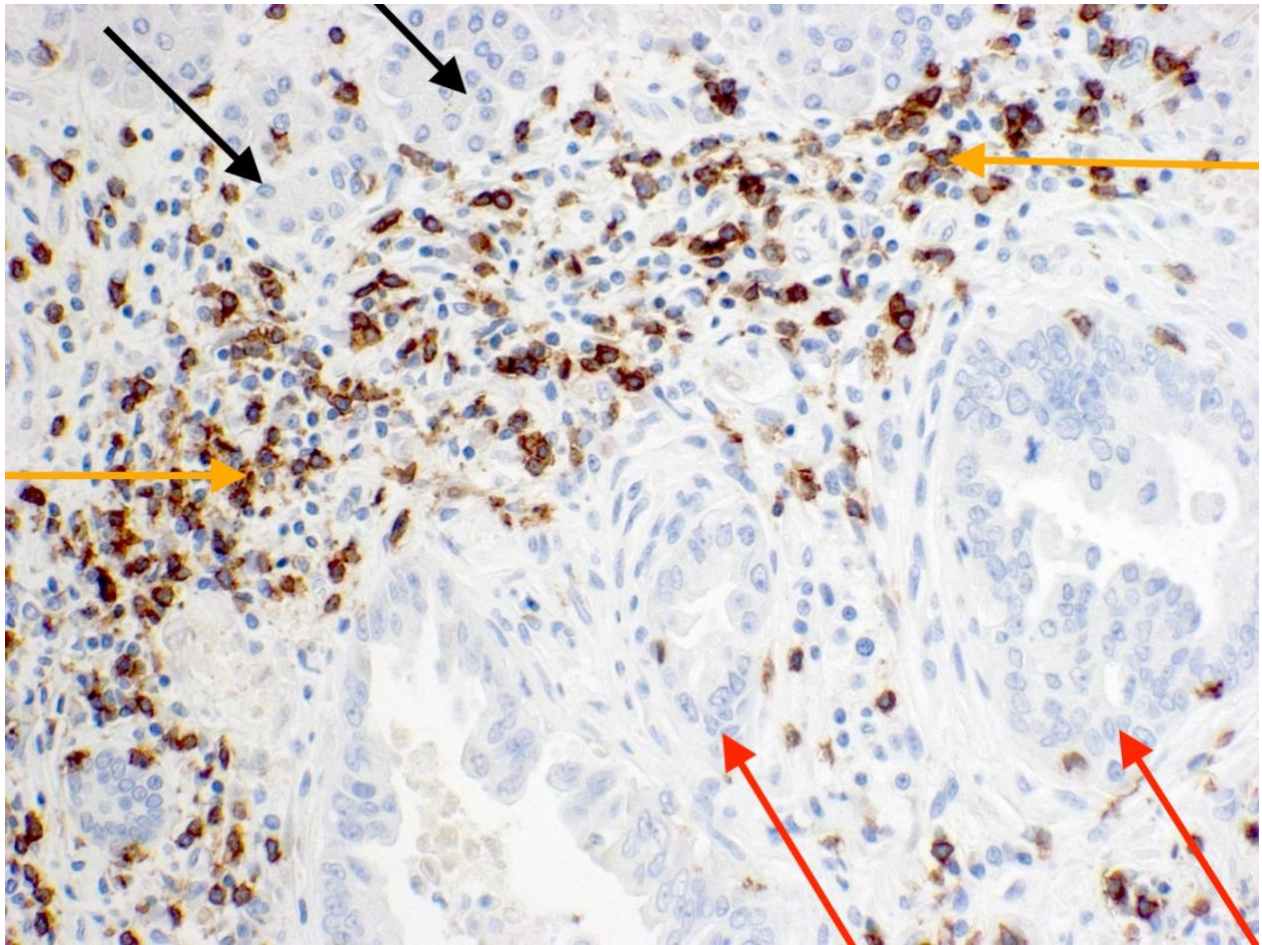


Abb. 3.12: Beispielbild für die immunhistochemische Färbung mit CD8-Antikörper (Schwarz = physiologisches Pankreasgewebe; Rot = maligne entartete Zellen; Orange = CD8⁺-Zellen)

In gleicher Weise erfolgte, zur Bestimmung der CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio, die Auszählung von FoxP3⁺-Zellen. Diese zur Berechnung verwendeten Daten der FoxP3-Auszählung wurden, wie unter Punkt 2.2.7.2 beschrieben, erhoben. Auch bei der Auszählung der FoxP3⁺-Zellen konnte die Auszählung bei 4 Patienten (4,8%) aufgrund von fehlenden immunhistochemischen Präparaten nicht stattfinden. Die Bezeichnung der Lage der FoxP3⁺-Zellen im Verhältnis zum IM erfolgt im Folgenden in gleicher Weise zu CTLs. Hier ergab die durchschnittliche Gesamtzahl der FoxP3^{+im} 25,88. Die Zellzahl der FoxP3^{+tum} lag bei 9,47 und die Anzahl der FoxP3^{+per} bei 16,17. Eine Zusammenfassung der Patientendaten ist unter dem Punkt 7.1.4 zu finden.

3.2.1 Verteilungsmuster der CD8⁺-CTLs Zellen

In 95,2 % (79/83) der Fälle finden sich peritumoral mehr CTLs als intratumoral.

In allen Tumorpräparaten konnten auch CD8⁺-CTLtm Zellen nachgewiesen werden. Somit zeigte sich bei allen untersuchten Präparaten eine Infiltration des Tumorgewebes mit CD8⁺-Zellen. Die Tabelle 3.4 fasst das Verteilungsmuster CD8⁺-CTLs im gesamten abgebildeten IM zusammen.

Tab. 3.4: Verteilungsmuster der CD8⁺-CTLtm

Anzahl CTLs	Anzahl Patienten	Prozent
Peritumoral ≤ intratumoral	0	0
Peritumoral > intratumoral	79	95,2
Nicht auswertbar	4	4,8
Gesamt	83	100

3.2.2. Überlebensanalyse

3.2.2.1. Überleben in Bezug auf die histopathologischen Merkmale

Um einen Zusammenhang zwischen dem Überleben und den histopathologischen Merkmalen herstellen zu können, wurden 2 postoperativ nicht tumorassoziiert verstorbene Patienten in dieser Auswertung nicht berücksichtigt. So wurden für diese Auswertung 81 der 83 (97,6 %) Patienten einbezogen. Betrachtet wurden der Resektionsstatus (R-Status, R1 vs. R0), das Grading (G1/G2 vs. G3), die Tumorausdehnung (T-Status, T1/T2 vs. T3), der Lymphknotenstatus (N-Status, N0 vs. N1), die Infiltration der Lymphgefäße (Lymphangiosis carcinomatosa, L-Status, L0 vs. L1), die Infiltration der Blutgefäße (Hämangiosis carcinomatosa, V-Status, V0 vs. V1) und die Perineuralscheideninfiltration (Pn-Status, Pn0 vs. Pn1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei der R-Klassifikation zu Gunsten einer R0-Resektion (p=0,0006; 42M (Monate) vs. 16,5M). Weiter zeigte sich ein Überlebensvorteil bei Patienten mit einer L0-Status und V0-Status (L0 vs. L1: p=0,0318; 47,5M vs. 24,8M; V0 vs. V1: p=0,0021; 47,5M vs. 17,6M). Ein Trend zum längeren OS ergab sich ebenfalls bei Patienten mit einem N0-Status (p=0,0771; 42,4M vs. 22,7M). Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten mit einem Pn0-Status, konnte hier kein Median gebildet werden (Median *undefined*).

Tab. 3.5: Überlebensanalyse in Bezug auf histopathologische Merkmale

	R1 vs R0	G1/G2 vs. G3	T1/T2 vs. T3	N0 vs. N1	L0 vs. L1	V0 vs. V1	Pn0 vs. Pn1
Signifikanz (p)	0,0006 (42M vs. 16,5M)	0,2149 (33,1M vs. 18,6M)	0,2090 (undefined vs. 31M)	0,0771 (42,4M vs. 22,7M)	0,0318 (47,5M vs. 24,8M)	0,0021 (47,5M vs. 17,6M)	0,1473 (undefined vs. 26,9M)

3.2.2.2 Infiltration durch CD8⁺-CTLs und Überleben

Für die Analyse des Zusammenhangs zwischen der Anzahl der CD8⁺-CTLs und dem Überleben, kamen insgesamt 77 der 83 (92,8 %) Patienten in Betracht. Bei 4 Patienten wurde kein immunhistochemischer Schnitt angefertigt. Die anderen 2 Patienten verstarben unmittelbar postoperativ aus nicht-tumorassoziierten Gründen (Myokardinfarkt, Sepsis). Es wurde eine Kaplan-Maier-Überlebenskurve angefertigt. Die p-Werte ergaben sich aus dem jeweils durchgeführten log-rank-Test.

Betrachtet wurde das OS bis zum Ende des Erhebungszeitraums in Bezug auf die Zellzahl der CD8⁺-Zellen. Geteilt wurden die Gruppen in CD8⁺-high (Zellzahl über dem Median) und CD8⁺-low (Zellzahl unter dem Median). Beim Vergleich des OS der CD8⁺-CTL^{im} in Bezug auf die Zellzahl über bzw. unter dem Median ergab sich kein signifikanter Unterschied (p=0,2172; Median=60,33; n=77; 33,1M vs. 23,8M). Gezeigt wird dies in Abb. 3.13.

Vergleicht man Patienten, die eine höhere, bzw. niedrigere Anzahl an CD8⁺-CTL^{tum} aufwiesen (CD8⁺-high vs. CD8⁺-low), zeigte sich ebenfalls kein Unterschied bezüglich des Überlebens (p=0,6027; Median=14,33; n=77; 31,0M vs. 33,1M). Auch hier wurden die Gruppen in CD8⁺-high (Zellzahl über dem Median) und CD8⁺-low (Zellzahl unter dem Median) separiert. Abb. 3.14 veranschaulicht dies.

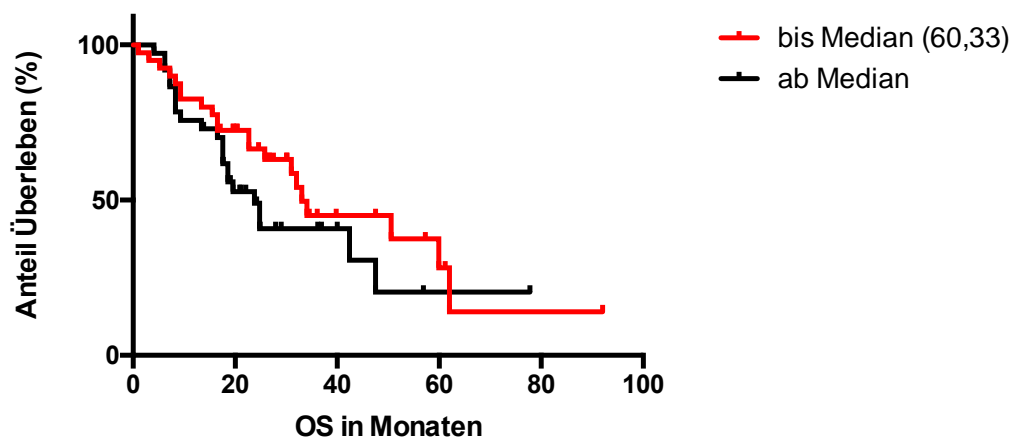


Abb. 3.13: OS in Bezug auf die Anzahl CD8⁺-CTL^{im} (p=0,2172; Median=60,33; n=77; 33,1M vs. 23,8M)

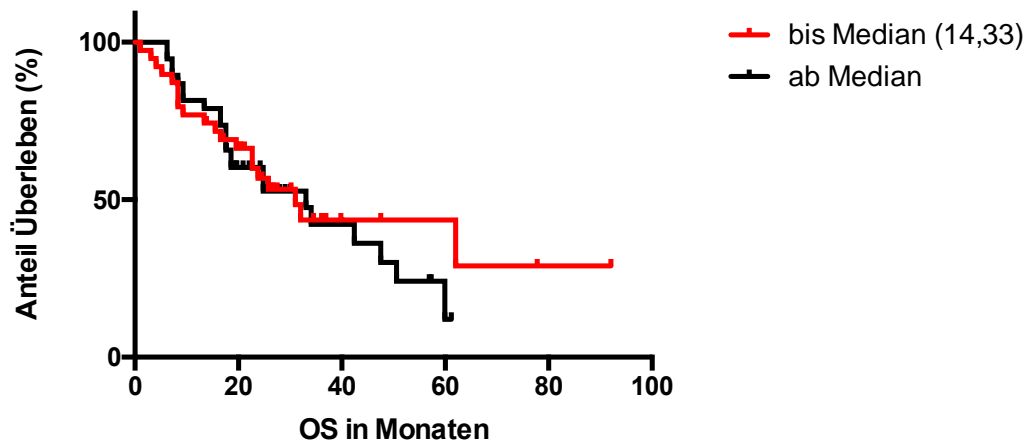


Abb. 3.14: OS in Bezug auf die Anzahl an CD8⁺-CTL^{tum} (p=0,6027; Median=14,33; n=77; 31,0M vs. 33,1M)

Bei Untersuchung des Zusammenhangs der Anzahl an CD8⁺-CTL^{per} im Bezug auf den Median mit den Überlebensdaten, ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied (p=0,1081; Median=47; n=77; 34,1M vs. 22,7M).

Vergleicht man zusätzlich das OS des oberen (0,75) und des unteren Quartils (0,25), so ergibt sich weder bei der Betrachtung der CD8⁺-CTL^{im} (p= 0,4412; n=40; 24,8M vs. 32,0M), noch der CD8⁺-CTL^{tum} (p=0,8269; n=40), ein signifikanter Unterschied.

Als weitere Subgruppe wurde das OS in Bezug auf die CD8-Infiltration bei Patienten, bei denen eine R0-Resektion erfolgte untersucht. Bei der Betrachtung der Anzahl der CD8⁺-CTL^{tum}, CD8⁺-CTL^{per} und CD8⁺-CTL^{im} ergab sich kein signifikanter Unterschied (intratumoral: p=0,2517; Median=12,83. n=56; 62,0M vs. 42,4M; peritumoral: p=0,3307; Median=41; n=56; 50,6M vs. 25,8M; gesamt. abgeb. IM: p=0,3560; Median=54,83; n=56; 59,9M vs. 42,4M).

3.2.2.3. Infiltration durch CD8⁺-CTLs und das Überleben in Abhängigkeit der Rezidivlokalisierung

Betrachtet wurde zusätzlich das OS in Bezug auf die Rezidivlokalisierung und die jeweilige Infiltration durch CD8⁺-CTLs. Es wurden für Lokal- und Fernrezidive, sowie als Untergruppe Leberrezidive, jeweils zwei Gruppen nach dem Median der numerischen Infiltration mit CD8⁺-CTLs (CD8⁺-high vs. CD8⁺-low) gebildet. Hierbei wurde auch nach CD8⁺-CTL^{tum}, CD8⁺-CTL^{per} und CD8⁺-CTL^{im} unterschieden.

Es zeigte sich ein signifikant längeres Überleben bei Patienten mit einem Leberrezidiv bei denen die Anzahl der CD8⁺-CTL^{tum} und CD8⁺-CTL^{im} über dem Median lag (CD8⁺-high) (ges. abgeb. IM: p=0,0392; Median=76,33; n=17; 11,35M vs. 18,6M; intratumoral: p=0,0339; Median=16; n=17; 10,85M vs. 18,6M). Dies wird in den Abb. 3.15 und 3.16 gezeigt. Für die Anzahl an CD8⁺-CTL^{per} bei Patienten mit

Leberrezidiv ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,3964$; Median=54,67; $n=17$; 11,35M vs. 17,6M).

In Bezug auf Lokalrezidive ergab sich ein Überlebensvorteil bei Patienten mit einer geringen Akkumulation von $CD8^+$ -CTL^{im} und $CD8^+$ -CTL^{per} ($CD8^+$ -low) (ges. abgeb. IM: $p=0,0162$; Median=48,83; $n=10$; 32,0M vs. 19,6M; peritumoral: $p=0,0162$; Median=36,5; $n=10$; 32M vs. 19,6M). Abb. 3.17 und 3.18 illustrieren dieses Ergebnis. Eine hohe Anzahl an $CD8^+$ -CTL^{tum} hingegen, ergab bei Lokalrezidiven kein signifikant verändertes OS ($p=0,5747$; Median=11,5; $n=10$; 22,7M vs. 25,8M).

Bezüglich Fernrezidiven im Allgemeinen hatte die Infiltration unabhängig der Lokalisation der $CD8^+$ -CTLs keinen signifikanten Einfluss auf das OS (ges. abgeb. IM: $p=0,3359$; Median=67,67; $n=38$; 22,7M vs. 17,6M; intratumoral: $p=0,6626$; Median=16,17; $n=38$; 17,6M vs. 24,8M; peritumoral: $p=0,0921$; Median=51,67; $n=38$; 27,9M vs. 17,6M).

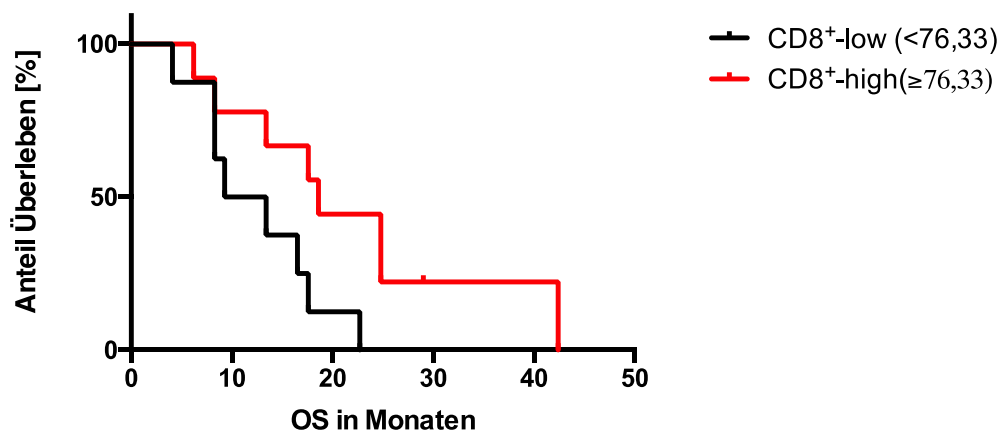


Abb. 3.15: OS in Bezug auf die Anzahl der $CD8^+$ -CTL^{im} bei Leberrezidiven ($p=0,0392$; Median=76,33; $n=17$; 11,35M vs. 18,6M)

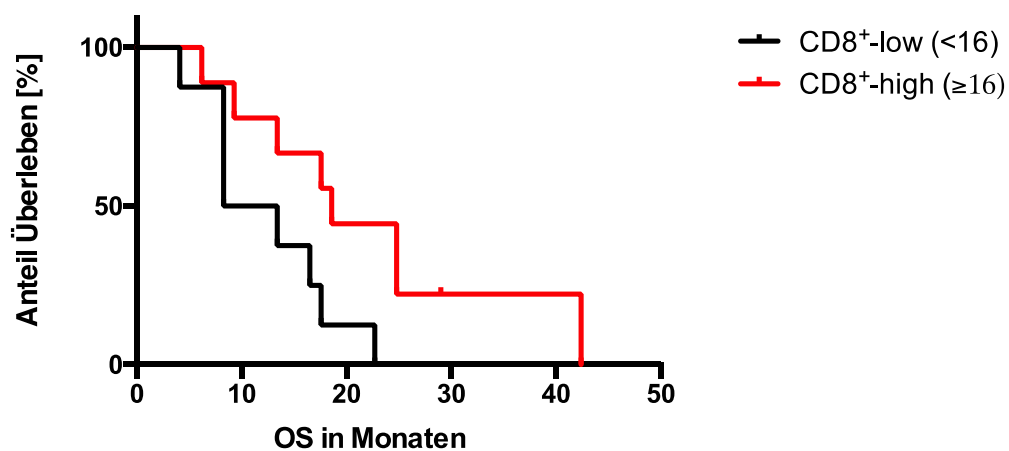


Abb. 3.16: OS in Bezug auf die Anzahl der $CD8^+$ -CTL^{tum} bei Leberrezidiven ($p=0,0339$; Median=16; $n=17$; 10,85M vs. 18,6M)

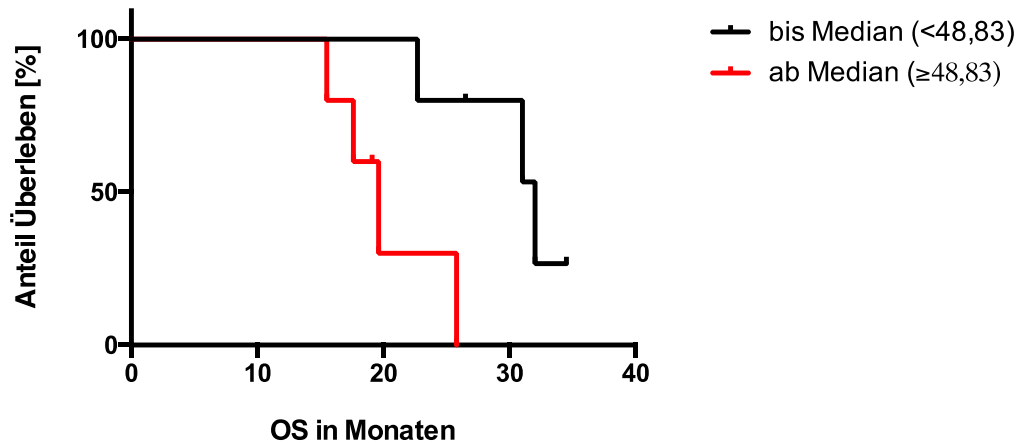


Abb. 3.17: OS in Bezug auf die Anzahl der CD8⁺-CTL^{im} bei Lokalrezidiven (p=0,0162; Median: 48,83; n=10; 32M vs. 19,6M)

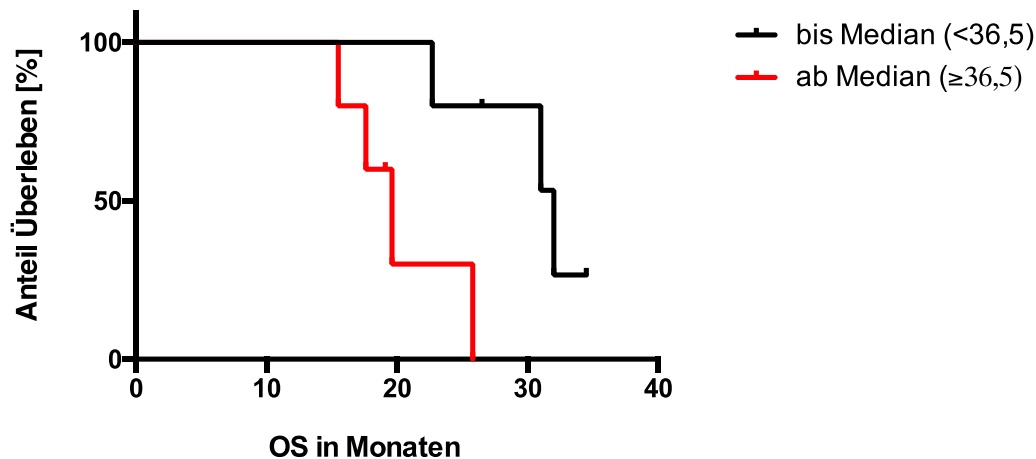


Abb. 3.18: OS in Bezug auf die Anzahl der CD8⁺-CTL^{per} bei Lokalrezidiven (p=0,0162; Median: 48,83; n=10; 32M vs. 19,6M)

3.2.2.4 Infiltration durch CD8⁺-CTLs und rezidivfreies Überleben

Es wurde eine Überlebenszeitanalyse bezüglich der Anzahl CD8⁺-CTLs und dem rezidivfreien Überleben (DFS) angefertigt. Hierzu wurden jeweils Kaplan-Maier-Überlebenskurven erstellt. Die p-Werte wurden mittels log-rank-Test ermittelt.

Bei der Ermittlung der Signifikanz bezüglich des Zusammenhangs der Anzahl an CD8⁺-CTL^{tum}, CD8⁺-CTL^{per} und CD8⁺-CTL^{im} in Betrachtung aller Rezidivlokalisationen in Bezug auf das DFS, ergab sich kein signifikanter Unterschied (ges. abgeb. IM: p=0,6022; Median: 62,67; n=48; 11,22M vs. 10,1M; intratumoral: p=0,5263; Median=15; n=48; 13,13M vs. 10,17M; peritumoral: p=0,1547; Median 51,17; n=48; 13,84M vs. 8,3).

3.2.2.5 Infiltration durch CD8⁺-CTLs und rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit der Rezidivlokalisierung

Bringt man weiter die Anzahl CD8⁺-CTLs in Zusammenhang mit dem DFS der einzelnen Rezidivlokalisierungen, zeigt sich bei Leberrezidiven in Betrachtung der CD8⁺-CTL^{tum} und CD8⁺-CTL^{im} ein signifikant besseres DFS bei höherer Anzahl an CD8⁺-CTLs (abgeb. IM: p=0,0029; Median=76,33; n=17; 3,16M vs. 10,17M; intratumoral: p=0,0159; Median=16,0; n=17; 5,02M vs. 10,17M). Abb. 3.19 und 3.20 zeigen die Überlebenskurve. In Bezug auf Fern- und Lokalrezidive ergaben sich keine weiteren signifikanten Unterschiede (Fernrezidiv: ges. abgeb. IM: p=0,8544; Median=67,67; n=38; 8,57M vs. 10,17M; intratumoral: p=0,8243; Median=16,17; n=38; 8,13M vs. 11,6M; peritumoral: p=0,4054; Median=51,67; n= 38; 11,22M vs. 8,13M; Leberrezidiv: peritumoral: p=0,1697; Median=54,67; n=17; 3,14M vs. 10,1M; Lokalrezidiv: ges. abgeb. IM: p=0,2133; Median=48,83; n=10; 20,77M vs. 13,13M; intratumoral: p=0,1071; Median=11,5; n=10; 10,7M vs. 20,77M; peritumoral: p=0,2133; Median=36,5; n=10; 20,77M vs. 13,13M).

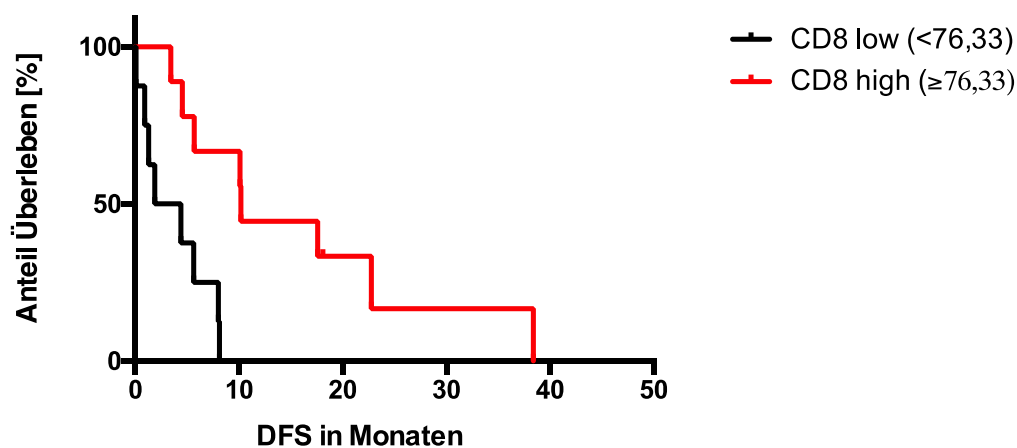


Abb 3.19: DFS in Bezug auf die Anzahl der CD8⁺-CTL^{im} bei Leberrezidiven (p=0,0029; Median=76,33; n=17; 3,16M vs. 10,17M)

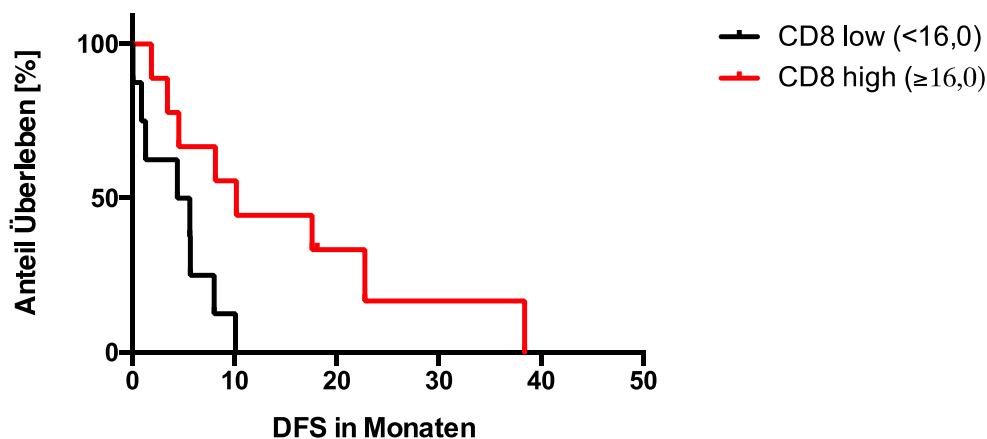


Abb 3.20: DFS in Bezug auf die Anzahl der CD8⁺-CTL^{tum} bei Leberrezidiven (p=0,159; Median=16; n=17; 5,02M vs. 10,17M)

3.1.2.6. CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio und Überleben

Aufgrund der komplexen immunologischen interzellulären Interaktionen wurden zusätzlich FoxP3⁺-Zellen in die Betrachtung miteinbezogen. Diese erfolgte in gleicher Art und Weise wie bereits unter „2.2.6 Auswertung der Antikörperfärbung“ für die Auszählung von CD8⁺-Zellen beschrieben. Aus den ermittelten Zahlen wurde anschließend eine CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio gebildet. Hierbei wurde ein Quotient aus der Anzahl der CD8⁺- und FoxP3⁺-Zellen gebildet und dieser in Bezug zum OS gesetzt. Die für die Berechnung zugrundeliegenden Daten wurden, wie unter Punkt 2.2.7.2. erwähnt, aus einer weiteren Auswertung des gleichen Patientenkollektivs entnommen. Es wurde auch hier je nach Lokalisation der Zellen zwischen intratumoral, peritumoral und dem gesamten abgebildeten IM unterschieden. Geteilt wurden die Gruppen erneut in CD8⁺/FoxP3⁺ low (Ratio unter dem Median) und CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio high (Ratio über dem Median). Im Folgenden wird analog zu der Beschreibung der CD8⁺-CTLs, die sich im intratumoralen Bereich des abgebildeten IM bestimmte CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio als „CD8⁺/FoxP3⁺tum-Ratio“, die CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio im peritumoralen Bereich als „CD8⁺/FoxP3⁺per-Ratio“ und CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio im gesamten IM als „CD8⁺/FoxP3⁺im-Ratio“ bezeichnet.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich kein signifikanter Unterschied des OS bezüglich der CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio (ges. abgeb. IM: p=0,9035; Median=2,63; n=69; 34,1M vs. 33,1M; intratumoral: p=0,4289; Median=1,61; n=69; 31M vs. 33,1M; peritumoral: p=0,5945; Median=3,01; n=69; 34,1M vs. 33,1M).

3.1.2.7. CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio und Überleben in Abhängigkeit der Rezidivlokalisierung

Weiter wurde die CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio mit dem OS in Zusammenhang mit der Rezidivlokalisierung gebracht. Betrachtet man die Ergebnisse, zeigt sich ein signifikant längeres OS bei Patienten mit einem

Leberrezidiv und einer hohen CD8⁺/FoxP3⁺ Ratio (intratumoral CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio high) (p=0,0095, Median=1,35; n=16; 10,85M vs. 21,7M). Dies wird in Abb. 3.21 dargestellt. Bezüglich der weiteren Ergebnisse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Fernrezidiv: ges. abgeb. IM: p=0,9237; Median=2,84; n=37; 16,5M vs. 24,8M; intratumoral: p=0,7509; Median=1,56; n=37; 13,4M vs. 24,8M; peritumoral: p=0,5250; Median=3,76; n=37; Leberrezidiv: ges. abgeb. IM: p=0,3287; Median=2,35; n=16; 11,35M vs. 18,1M; peritumoral: p=0,3488; Median=3,1; n=16; 11,35M vs. 18,1M; alle Rezidivlokalisationen: ges. abgeb. IM: p=0,6495; Median=2,74; n=46; 22,7M vs. 24,8M; intratumoral: p=0,8939; Median=1,58; n=46; 16,5M vs. 24,8M; peritumoral: p=0,9553; Median=3,28; n=46; 22,7M vs. 24,8M). Aufgrund der zu geringen Fallzahl konnte bezüglich der CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio und Lokalrezidiven keine Auswertung durchgeführt werden.

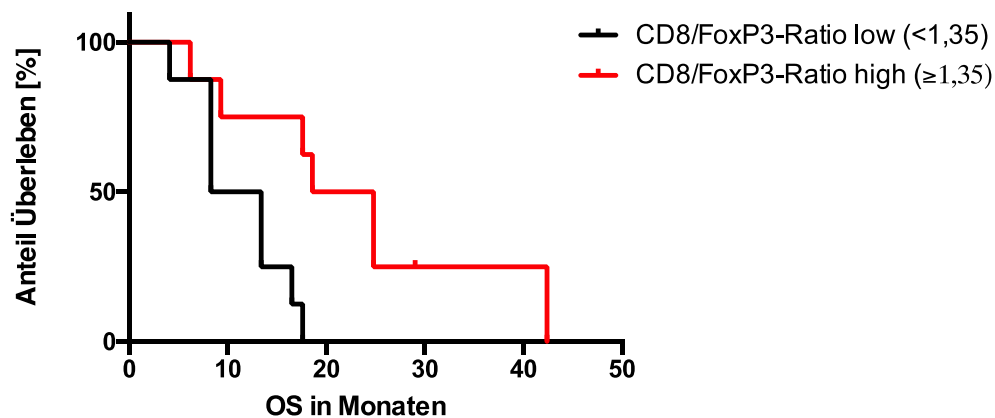


Abb. 3.21: CD8⁺/FoxP3⁺ Ratio in Bezug auf OS bei Leberrezidiven (p=0,0095, n=16, 21,7M vs. 10,85M)

3.1.2.8. CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio und rezidivfreies Überleben

Weiter wurde ebenfalls eine Überlebenszeitanalyse für das DFS in Bezug auf die CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio durchgeführt. Diese wurde wie bereits in den vorhergehenden Analysen über eine Kaplan-Maier-Überlebenskurve ermittelt und erneut in CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio low vs. CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio high unterteilt. Bei der Betrachtung aller Rezidivlokalisationen ergab sich kein signifikanter Unterschied im DFS (ges. abgeb. IM: p=0,8095; Median=2,73; n=46; 10,7M vs. 13,13M; intratumoral: p=0,5747; Median=1,58; n=46; 10,17M vs. 14,9M; peritumoral: p=0,7513; Median=3,28; n=46; 10,7 vs. 13,13M).

3.1.2.9. CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio und rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit der Rezidivlokalisation

In Analogie zur Auswertung bezüglich der Infiltration durch CD8⁺-CTLs wurde zusätzlich eine Überlebenszeitanalyse bezüglich der CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio (low vs. high) und dem DFS in Abhängigkeit

der Rezidivlokalisierung erstellt. Insgesamt zeigten sich hier bei der Betrachtung von Fern- und Leberrezidiven keine signifikanten Unterschiede bezüglich des DFS. Hierbei erfolgte erneut die Auswertung des gesamten abgebildeten IM und des intra- bzw. peritumoralen Areals (Fernrezidive: ges. abgeb. IM: $p=0,8456$; Median=2,84; $n=37$; 9,36M vs. 10,83; intratumoral: $p=0,2431$; Median=1,56; $n=37$; 5,67M vs. 14,9M; peritumoral: $p=0,4345$; Median=3,76; $n=37$; 9,36M vs. 10,83M; Leberrezidiv: ges. abgeb. IM: $p=0,1859$; Median=2,35; $n=16$; 5,02M vs. 9,15M; intratumoral: $p=0,0687$; Median=1,35; $n=16$; 5,65M vs. 12,87M; peritumoral: $p=0,1687$; Median=3,1; $n=16$; 4,53M vs. 9,15M). Aufgrund der zu geringen Fallzahl konnte bezüglich der $CD8^+$ /FoxP3⁺-Ratio und Lokalrezidiven keine Auswertung durchgeführt werden.

3.2.3. Korrelationsanalyse

3.2.3.1. Korrelation hinsichtlich der Infiltration durch $CD8^+$ -CTLs

Für die Untersuchung der Tumordinfiltration durch $CD8^+$ -CTLs konnten 86,8 % (72/83) der Patienten in Betracht gezogen werden. Hierbei wurde die peritumorale Infiltration mit der intratumoralen Infiltration des abgebildeten IM verglichen. Es wurde hierbei eine hoch signifikant höhere peritumorale Lokalisation von $CD8^+$ -Zellen als intratumoral beobachtet ($p<0,0001$; $n=77$; 47,0 vs. 14,33). Ein Beispiel zeigt Abb. 3.22.

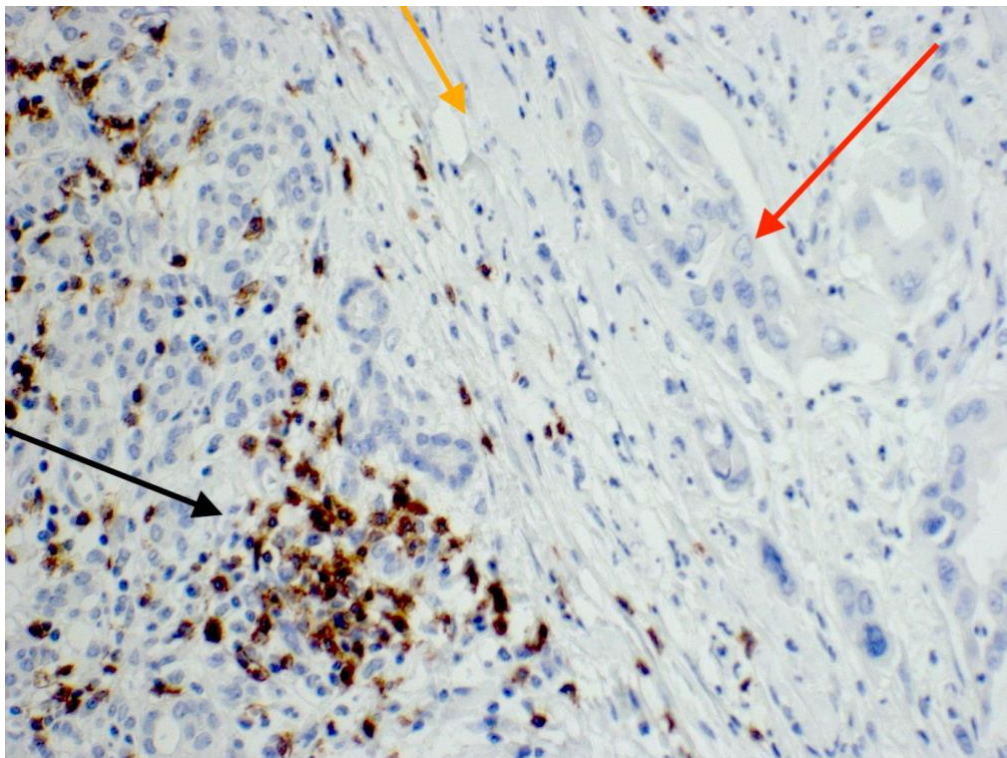


Abb. 3.22: Beispielbild für die Akkumulation von $CD8^+$ -CTL^{per} (Vergrößerung 20x, Schwarz = peritumorale Akkumulation von $CD8^+$ -Zellen; Rot = Tumorgewebe; Orange = desmoplastisches Stroma)

3.2.3.2. Infiltration durch CD8⁺-CTLs und TNM

Untersucht wurde der Einfluss der Infiltration durch CD8⁺-CTLs auf die Entwicklung von Lymphknotenmetastasen. Es wurde der Status regionärer Lymphknotenmetastasen in Zusammenhang mit der Anzahl der CD8⁺-CTL^{im} -CTL^{tum} und -CTL^{per} gebracht. Diesbezüglich konnten 47 Patienten mit N1-Status mit 32 Patienten mit N0-Status verglichen werden. Die Ergebnisse wurden über einen ungepaarten, nicht-parametrischen, Zweistichprobentest (Mann-Whitney-U-Test) ermittelt. Hierbei ergab sich, dass Patienten ohne Lymphknotenmetastasierung eine signifikant höhere Infiltration durch CD8⁺-CTL^{im} aufzeigten ($p=0,0404$; $n=79$; 66,0 vs. 54,17). Die Verhältnisse werden in Abbildung 3.23 abgebildet.

Betrachtet man hingegen die Anzahl der CD8⁺-CTL^{tum}, ergab sich kein signifikanter Unterschied in der CD8-Expression in Bezug auf das Vorliegen einer Lymphknotenmetastasierung ($p=0,2682$; $n=79$; 13,0 vs 17,17, siehe Abbildung 3.24).

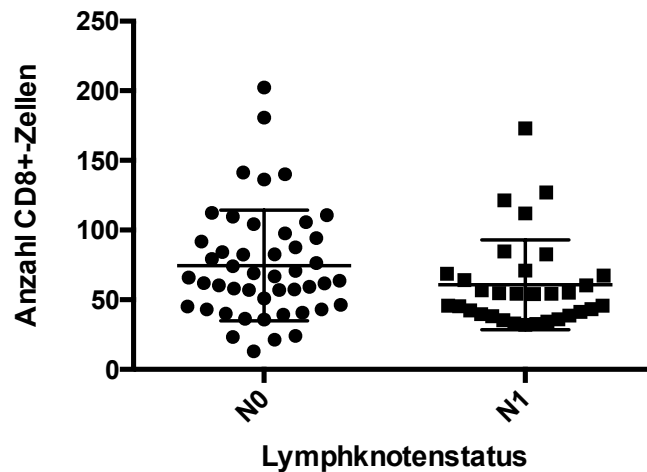


Abb. 3.23: Regionärer Lymphknotenstatus bezüglich der Anzahl an CD8⁺-CTL^{im}

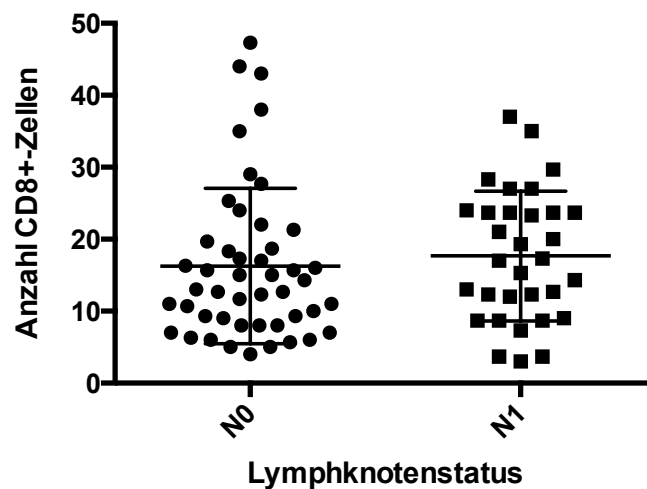


Abb. 3.24: Regionärer Lymphknotenstatus bezüglich der Anzahl an CD8⁺-CTL^{tum}

Weiter wurde die Auswirkung einer Infiltration mit CD8⁺-CTL^{per} betrachtet. Hier ergab sich eine signifikant höhere Anzahl CD8⁺-CTL^{per} bei Patienten die einen N1-Status aufwiesen (p=0,0177; n=79; 35,0 vs 53,67). Abbildung 3.25 zeigt diesen Zusammenhang.

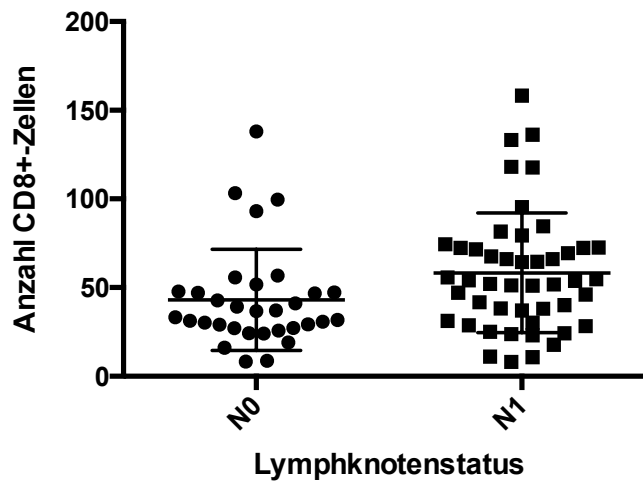


Abb. 3.25: Regionärer Lymphknotenstatus bezüglich der peritumoralen Anzahl an CD8⁺- CTL^{per}

Weitere Ergebnisse bezüglich der Korrelation histopathologischer Merkmale mit der Infiltration durch CD8⁺-CTLs zeigten keine signifikanten Unterschiede (Lymphknotenstatus (N0 vs. N1): intratumoral: p=0,2682; n=79; 13,0 vs. 17,17; T-Stadium (T1/T2 vs. T3): ges. abgeb. IM: p=0,7744; n=79; 55,67 vs. 60,33; intratumoral: p=0,6371; n=79; 15,33 vs. 14,67; peritumoral: p=0,7981; n=79; 44,86 vs. 46,67; Grading (G1/G2 vs. G3): ges. abgeb. IM: p=0,7390; n=79; 59,83 vs. 58,0; intratumoral: p=0,5797; n=79; 15,17 vs. 13,9; peritumoral: p=0,6752; n=77; 46,5 vs. 47; V-Status (V0 vs. V1): ges. abgeb. IM: p=0,4245; n=77; 58 vs. 56,17; intratumoral: p= 0,6943; n=77; 12,67 vs. 14,67; peritumoral: p=0,3142; n=77; 46,67 vs. 36,5; L-Status (L0 vs. L1): ges. abgeb. IM: p=0,8495; n=79; 54,33 vs. 59,83; intratumoral: p=0,5552; n=79; 15,33 vs. 12,84; peritumoral: p=0,9496; n=79; 39,33 vs.46,83; Pn-Status (Pn0 vs. Pn1): ges. abgeb. IM: p=0,9134; n=77; 64 vs. 58,67; intratumoral: p=0,5517; n=77; 14,33 vs. 15; peritumoral: p=0,8932; n=77; 46,67 vs. 46,5).

3.2.3.3. Infiltration durch CD8⁺-CTLs und Rezidiventwicklung

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Anzahl CD8⁺-CTLs im untersuchten Präparat mit der Entwicklung eines Rezidivs, bzw. dessen Lokalisation und dem Zeitpunkt des Auftretens verglichen. Hierzu wurde ebenfalls ein ungepaarter, nicht-parametrischer Zweistichprobentest (Mann-Whitney-U-Test) angewandt. Man kann davon ausgehen, dass Patienten mit einem R1-Status tendenziell häufiger ein Lokalrezidiv entwickeln als Patienten mit einer R0-Resektion. Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Resultaten zu erhalten, wurden daher nur bei einer R0-Resektion gewonnene Tumorproben für diese Auswertung verwendet.

Vergleicht man die Anzahl CD8⁺-Zellen von Patienten, die ein Lokalrezidiv mit denen von Patienten, die ein Fernrezidiv (Leber, Lunge, Peritoneum) erlitten, so zeigt sich, dass Patienten, die ein Lokalrezidiv entwickelten, eine signifikant niedrigere Anzahl von CD8⁺-Zellen im Primarius aufwiesen. Dieses Ergebnis ergab sich bei der Betrachtung der Anzahl der CD8⁺-CTL^{im} (p=0,0260; n=31; 42,17 vs 86,67). Hinsichtlich der Anzahl an CD8⁺-CTL^{tum} ergab sich keine Signifikanz, jedoch zeigt sich ein Trend zu einer geringeren intratumoralen Infiltration mit CD8⁺-CTLs bei Lokalrezidiven (p=0,0539; n=31; 10,0 vs 17,0). Ebenfalls zeigte sich ein Trend zu einer hohen Anzahl CD8⁺-CTL^{per} bei Lokalrezidiven (p=0,069; n=31; 29,67 vs. 51,67). Hierbei war die Auswertung bei 3 Patienten aufgrund von fehlenden Schnitten nicht möglich. Abb. 3.26 veranschaulicht dies.

Betrachtet man nun die einzelnen Rezidivlokalisationen zeigt sich hier, dass Patienten, die ein Lokalrezidiv erlitten, im Vergleich zu Patienten, die eine Lebermetastase entwickelten, eine signifikant niedrigere Anzahl an CD8⁺-CTL^{im} aufwiesen (p=0,0200; n=17; 42,17 vs 84,67). Die Auszählung der CD8⁺-CTL^{tum} und CD8⁺-CTL^{per} ließ ebenfalls eine Tendenz zu einer niedrigeren Anzahl an CD8⁺-CTLs im Primarius bei Lokalrezidiven im Vergleich zu Leberrezidiven erkennen (intratumoral: p=0,0746; n=17; 10,0 vs 18,33; peritumoral: p=0,0584; n=17; 29,67 vs. 69,33). Abb. 3.27 zeigt die zugehörigen Abbildungen.

Zwischen einem Lokalrezidiv und einem Lungenrezidiv konnte kein Unterschied bezüglich der Infiltration durch CD8⁺-CTLs gefunden werden (abgeb. IM: p=0,9004; n=11; 42,17 vs 40,67; intratumoral: p=0,4242; n=11; 10,0 vs 11,0; peritumoral: p=0,6494; n=11; 29,67 vs. 31,33). Ebenfalls ohne signifikantes Ergebnis blieb der Vergleich zwischen Patienten mit Rezidiv und ohne Rezidiv in Bezug auf die Anzahl der CD8⁺-CTLs (ges. abgeb. IM: p=0,2457; n=56; 57 vs. 45,67; intratumoral: p=0,7778; n=56; 12,67 vs. 13,0; peritumoral: p=0,3696, n=56; 51,15 vs. 38,0). Die Korrelation zwischen der Entwicklung eines Lokalrezidivs und der Peritonealkarzinose war aufgrund einer zu geringen Fallzahl nicht möglich.

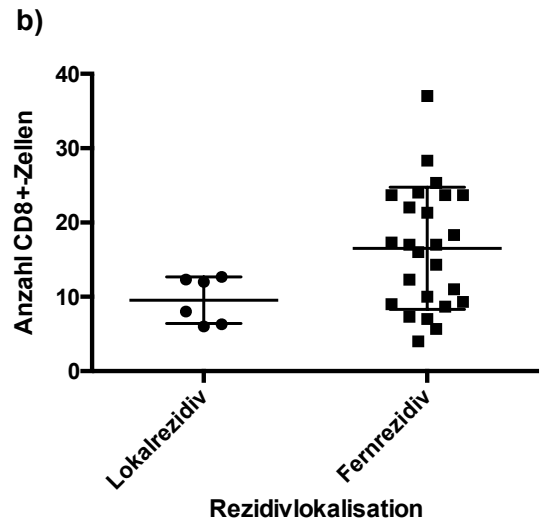
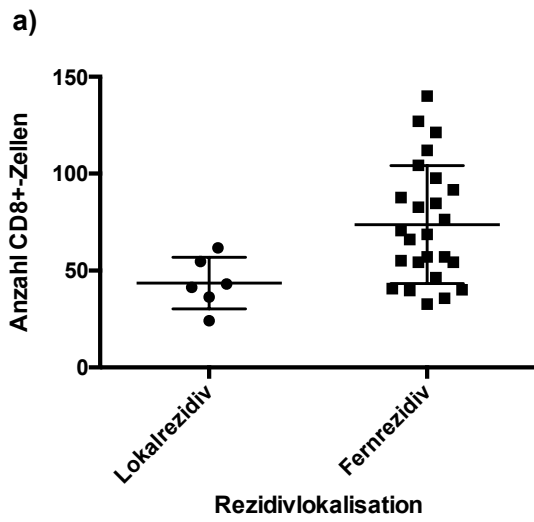


Abb. 3.26: Anzahl der a) CD8⁺-CTL^{im} und b) CD8⁺-CTL^{tum} in Bezug auf die Entwicklung einer Lokal- oder Fernmetastase

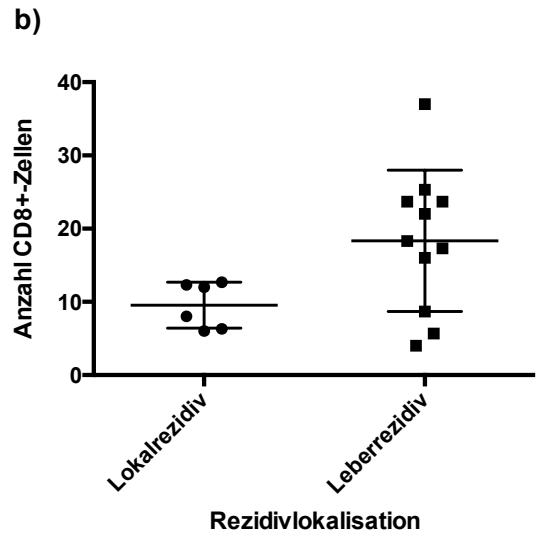
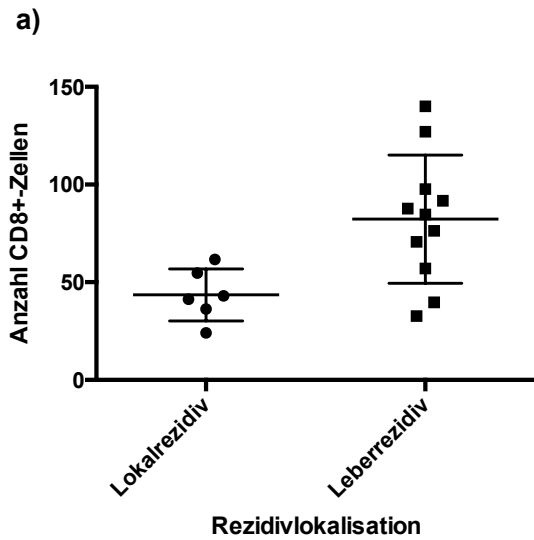


Abb. 3.27: Anzahl der a) CD8⁺-CTL^{im} und b) CD8⁺-CTL^{tum} in Bezug auf Entwicklung einer Lokal- oder Lebermetastase

4. Diskussion

4.1. Einleitung

Das Pankreaskarzinom stellt mit seiner hohen Mortalität eine der aggressivsten Krebserkrankungen dar. Die häufig lange klinische Unauffälligkeit führt zu späten und meist erst im metastasierten Stadium gestellten Diagnosen. Bis heute ist der einzige kurative Therapieansatz die chirurgische Resektion. Operativ therapierte Patienten entwickeln jedoch fast immer Rezidive, was zu einer hohen Sterblichkeit führt und folglich zu einer niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate. Individualisierte, multimodale Therapieansätze, wie z.B. Antikörpertherapien, sollen die aktuellen Therapieoptionen erweitern. Für den Fortschritt der personalisierten Medizin und die Entwicklung neuer Therapien ist das molekulare Profil des Malignoms von zentraler Bedeutung. Biomarker stellen hierfür ein nützliches Instrument dar. Mit ihrer Hilfe können Aussagen über beispielsweise Prognose, mögliche Therapien oder Therapieansprechen getroffen werden. Ein solcher potenzieller Marker ist CD8. CD8 repräsentiert als Oberflächenmarker der CTLs die Aktivität des adaptiven Immunsystems. CTLs tragen zur Zerstörung von Malignomzellen bei und spielen eine zentrale Rolle bei der Tumorabwehr.

Verschiedene vorhergehende Studien berichten bereits, dass eine T-Zellinfiltration beim PDAC einen positiven Einfluss auf das OS und DFS hat ^{73,74}. Anhaltspunkte für einen Einfluss der T-Zellinfiltration auf das DFS und das OS wurden bereits auch für Neoplasien anderer Organe, wie beispielsweise dem Ovarialkarzinom gefunden. Zhang et al. lieferten bereits 2003 Anhaltspunkte für den Einfluss der T-Zellinfiltration auf das DFS und das OS beim fortgeschrittenen epithelialen Ovarialkarzinom ⁷⁵. Zu ähnlichen Ergebnissen in Bezug auf das kolorektale Karzinom kam Pagès et al. im Jahr 2005 ⁷⁶.

In dieser Arbeit soll die Frage aufgegriffen werden, in welchem Zusammenhang eine Infiltration des Malignoms mit CD8⁺-CTLs mit dem OS steht. Hierzu wurde jedoch im Gegensatz zu den vorhergehenden Studien primär der IM des Karzinoms untersucht. Bisher lag der Fokus auf zentral gelegenen Tumoranteilen. Der IM wurde als 1 mm breiter Saum des Tumorrandes definiert, der zu 50% Tumor und zu 50 % tumorfreies Gewebe beinhaltet ^{68,69}.

Aufgrund einer ausgeprägten Stromareaktion des PDACs zeigt sich eine unterschiedliche Verteilung immunaktiver Zellen von peri- in Richtung intratumoral. Vermutet wird, dass die vermehrte Anwesenheit von CD8⁺-CTLs eine effektive lokale Tumorkontrolle widerspiegelt. Der effektive Wirkungsort der CD8⁺-CTLs, ob intra- oder peritumoral, ist jedoch nicht abschließend geklärt. Diesem Umstand soll hier ebenfalls nachgegangen werden. Folglich stellt sich hierbei die Frage welchen Effekt die CD8⁺-CTLs in Bezug auf ihre Lokalisation haben.

Eine wesentliche Ursache für die hohe Sterblichkeit beim PDAC, ist die frühe und häufige Metastasierung. Durch das Verständnis des Rezidivierungsmusters, könnten Patienten bereits gezielt auf diese untersucht werden. So stellt sich die Frage nach dem Einfluss einer intra- und peritumoralen Infiltration durch CD8⁺-CTLs auf das Metastasierungsverhalten. Bisher liegt, nach unserem Wissen, keine Literatur bezüglich dieser Fragestellung vor.

4.2. Tumorinfiltration durch CD8⁺-CTLs

Das PDAC zeigt typischerweise ein ausgeprägtes desmoplastisches Stroma. Hierunter versteht man peritumorales Bindegewebe, welches durch tumorassoziierte immunologische Prozesse hervorgerufen wird. Es besteht aus MPSC, extrazellulären Matrixproteinen, und einer Vielzahl von Immunzellen ¹⁴. Das Stroma bildet eine Barriere zwischen dem Tumorzentrum und dem umliegenden Gewebe. Es stellt sich nun die Frage, welchen Einfluss diese desmoplastische Stromareaktion auf die Verteilung und Wirkung von CD8⁺-CTLs hat.

Ausgewertet wurde die Anzahl der CD8⁺-CTLs im Bereich des IM. Die hier erhobenen Daten, zeigen eine deutliche Akkumulation an CD8⁺-CTL^{per} ($p < 0,0001$; $n=77$; Median: 47,0 vs 14,33). Das Ergebnis lässt vermuten, dass das desmoplastische Stroma die Tumorinfiltration durch CD8⁺-CTLs erschwert. Da CD8⁺-Zellen über direkte zytotoxische Mechanismen auf die malignen Zellen wirken, die einen unmittelbaren Zellkontakt voraussetzen, kommt es zu einer Verminderung der antitumoralen Wirkung. Im Umkehrschluss wirkt das desmoplastische Stroma protumoral.

Bereits 2004 wurden aktivierte Pankreassternzellen als Ursache für eine überschießende Produktion von extrazellulärer Matrix im PDAC ausgemacht ¹³. Diana et al. berichtet über eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der stromalen CD8⁺-CTLs und der Dichte des desmoplastischen Stromas. Hierfür wurde die Bildung einer Barriere durch das Stroma und die damit einhergehende verminderte Durchwanderung von CD8⁺-CTLs in Richtung Tumorzentrum ausgemacht. Weiter zeigten Patienten dieser Studie bei einer erhöhten intratumorale Stromainfiltration durch CD8⁺-Zellen ein längeres Gesamtüberleben (overall survival, OS), progressionsfreies Überleben (progression free survival, PFS) und fernrezidivfreies Überleben (distant metastasis free survival, DMFS). Eine Akkumulation von CD8⁺-CTLs im Tumorrand zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied im OS, PFS oder DMFS ⁷⁷.

Das peritumorale Stroma verhindert die Invasion von zytotoxischen T-Zellen in das Tumorgewebe ⁷⁸. In Anbetracht der in dieser Auswertung gewonnenen Ergebnisse liegt eine Hemmung der Stromabildung nahe und eine vermehrte Infiltration durch CD8⁺-Zellen zu ermöglichen. Betrachtet man den hier und in weiteren Studien beobachteten positiven Einfluss von CD8⁺-Zellen auf den Verlauf der Erkrankung ^{72,73,77}, stellt die Hemmung der desmoplastischen Stromabildung einen Therapieansatz dar ⁷⁰. Diesbezüglich gab es bei anderen Tumorentitäten bereits verschiedene Bemühungen. In einer das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom betreffenden Studie, konnte die Stromabarriere bereits mittels Kollagenasen

in einem *ex vivo* Modell reduziert und so die Tumordinfiltration durch T-Zellen gesteigert werden ⁷⁹. Weitere Studien haben gezeigt, dass auch die Gabe von AT₁-Blockern, wie z.B. Losartan, durch eine Drosselung der Angiotensin-II-Aktivität die Stromabarriere zu vermindern scheint. Ein Beispiel hierfür ist eine das Ovarialkarzinom betreffende Studie von Zhao et al. Hier wird die Reduktion von Kollagen, und die hiermit verbundene Verminderung des Tumorstromas, durch von Losartan induzierte microRNA beschrieben. Neben der Verminderung der Tumorbarriere führt eine Verminderung des Tumorstromas auch zur verminderten Kompression von in den Tumor reichenden Gefäßen, was eine bessere Perfusion durch Chemotherapeutika zur Folge hat. Dies bedeutet möglicherweise eine Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle ⁸⁰.

Es wird vermutet, dass sich das Stroma durch eine mangelnde Antigenexpression einer regulären T-Zellantwort entzieht und so weiter wächst ⁸¹. In einem von Zhang et al. durchgeführten Mausmodell konnte, über einen CD8⁺-T-Zelltransfer mit gegen das Stroma gerichteten CTLs, eine vermindertes Stromawachstum erreicht werden. Dies führte hier zu einer anhaltenden Stagnation der Tumorprogression⁸¹.

Eine ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion hat laut Kenntnisstand einen hemmenden Einfluss auf die Infiltration durch CD8⁺-CTLs in Richtung Tumorzentrum. Folglich ergibt sich ein verminderter Kontakt von CD8⁺-CTLs und Tumorzellen, wodurch eine potenzielle antitumorale Wirkung dieser Zellen abgeschwächt wird. Es liegt nahe weiter zu klären, welchen Einfluss dieser Umstand auf das Überleben hat. Im Folgenden wird der Einfluss von CD8⁺-CTLs und ihrer Lokalisation im Tumorrand auf das OS und DFS beleuchtet.

4.3. Infiltration durch CD8⁺-CTLs und Überleben

Im Bereich des IM trifft gesundes Pankreasgewebe auf maligne entartete Zellen und ist daher von besonderem Interesse. Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, kumulieren CD8⁺-Zellen unmittelbar peritumoral. Durch die desmoplastische Stromareaktion kommen weniger CTLs in direkten Kontakt mit entarteten Zellen. Es stellt sich die Frage, ob dies Einfluss auf das Überleben hat.

Vorhergehende Studien zeigten bereits einen Zusammenhang zwischen einer hohen Infiltration durch CTL und einem besseren OS, bzw. DFS. Die Bestimmung der immunaktiven Zellen erfolgte hierbei jedoch meist unter Betrachtung des Tumorzentrums oder grober Unterscheidung zwischen Tumorzentrum und Tumorrand ^{73,77}. Die in dieser Auswertung ermittelten Ergebnisse legen den Fokus jedoch auf den IM und somit auf den Bereich des unmittelbaren Kontakts der entarteten mit physiologischen Pankreaszellen. Bei der Überlebenszeitanalyse der CD8⁺-CTLs im Bezug auf den Tumorrandbereich konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der CD8⁺-CTL^{im}, der CD8⁺-CTL^{tum} und der CD8⁺-CTL^{per} und dem OS ermittelt werden. Auch bezüglich des Vergleichs zwischen der Anzahl CD8⁺-Zellen der unteren und oberen Quartile ergab sich kein signifikanter Unterschied im OS. Ein Trend ließ sich hier

weder bei hoher Anzahl an CD8⁺-CTL^{tum} noch bei CD8⁺-CTL^{per} erkennen. Weiter wurde das OS und DFS in Bezug auf die einzelnen Rezidivlokalisationen (Lokal-, Fern- und Leberrezidive) und die CD8⁺-CTL-Lokalisation bestimmt. Es ergab sich hier, dass Patienten mit einem Leberrezidiv und einer hohen Zellzahl an CD8⁺-CTL^{tum} und CD8⁺-CTL^{im} eine signifikant besseres OS und DFS aufwiesen. Patienten, die ein Lokalrezidiv entwickelten, zeigten ein signifikant höheres OS bei einer niedrigeren Zellzahl an CD8⁺-CTL^{per} und CD8⁺-CTL^{im}. Alle weiteren ermittelten Ergebnisse bezüglich der Rezidivlokalisation und dem OS, bzw. DFS, blieben ohne Signifikanz. Aufgrund der Interaktionen zwischen immunaktiven Zellen und der protumoralen Wirkung von FoxP3⁺-Zellen⁸², wurde weiter eine CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio der Zellen im IM gebildet und mit dem OS verglichen. Die CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio ergab hier zunächst keinen signifikanten Unterschied im OS. Bei der Betrachtung der Rezidivlokalisation jedoch, zeigte sich, dass Patienten, die ein Leberrezidiv entwickelten und eine hohe CD8⁺/FoxP3⁺^{tum} aufwiesen, ein signifikant längeres OS zeigten. Einen Trend zu einem längeren DFS ließ sich hier ebenfalls zeigen. Für die übrigen Lokalisationen ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich zunächst kein Hinweis auf einen positiven Einfluss der CD8⁺-CTL-Infiltration des IM auf das OS oder DFS. Differenziert man jedoch das Patientenkollektiv bezüglich der Lokalisation des Rezidivs ergibt sich ein anderes Bild. Hiernach weisen Patienten, die im Verlauf ein Leberrezidiv entwickeln und eine hohe Anzahl an CD8⁺-CTL^{tum} zeigen eine signifikant besseres OS und DFS auf. Gleiches zeigt sich bei Patienten die eine hohe CD8⁺/FoxP3⁺^{tum}-Ratio aufweisen.

Ein Zusammenhang zwischen einem günstigen Krankheitsverlauf und der Anwesenheit von CTLs wurde bereits 2004 bei Fukunaga et. al hergestellt. Ein längeres Überleben ergab sich hier u.a. bei Infiltration mit CD8⁺-Zellen⁷². Später kam Ino et al. im Jahr 2013 ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine stärkere CD8⁺-Tumorinfiltration mit einem besseren OS einhergeht⁷³. Der Fokus wurde vorrangig auf im Tumorzentrum lokalisierte CD8⁺-Zellen gerichtet, der IM wurde hier nicht differenziert betrachtet. Carstens et al. zeigte dann im Jahr 2017 diesen Zusammenhang erneut⁸³.

Aufgrund des direkt zytotoxischen Wirkmechanismus erfolgt eine effektive Zerstörung maligne entarteter Zellen vermutlich intratumoral im direkten Kontakt mit der Tumorzelle. Auch Carstens et al. kam über die Bestimmung der räumlichen Verteilung der CTLs zu dem Ergebnis, dass ein direkter Kontakt der CTLs zur Tumorzelle für eine suffiziente antitumorale Wirkung notwendig ist. Patienten mit einer vermehrt Tumorzell-nahen CTLs hatte hier einen Überlebensvorteil⁸³.

Der in der vorliegenden Auswertung untersuchte IM liegt im Grenzbereich zwischen maligner und benigner Zelle und ist daher von besonderem Interesse. Hier scheinen vor allem Patienten mit einem späteren Leberrezidiv von einer hohen Infiltration mit CD8⁺-CTLs zu profitieren. Die Tumorzellzerstörung durch CTLs gelingt hier möglicherweise besonders effektiv.

Um die pro- und antitumoral wirkenden Einflüsse des TME zu berücksichtigen, wurden in die Auswertung zusätzlich FoxP3⁺-Zellen miteinbezogen und in Relation zu CD8⁺-Zellen gesetzt. FoxP3 ist

ein Transkriptionsfaktor und dient der Identifikation von regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen). Treg-Zellen supprimieren die T-Zellaktivierung und wirken so protumoral. Beim PDAC, sowie bei den meisten anderen Tumorentitäten, haben FoxP3⁺-Zellen einen negativen Einfluss auf den Verlauf^{82,84}. Die Auswertung hat auch hier ergeben, dass Patienten mit einem Leberrezidiv und einer hohen CD8⁺/FoxP3⁺^{tum}-Ratio ein besseres OS und DFS zeigen. Auch hier zeigt sich der protektive Effekt von CD8⁺-CTLs vorrangig bei Patienten mit Leberrezidiv. Auch Hwang et al. zeigte bereits einen Überlebensvorteil bei Patienten, die eine Pankreaslinksresektion unterzogen wurden und eine niedrigen FoxP3⁺/Granzym B⁺-Ratio aufwiesen. Hier wurde jedoch nicht bezüglich der einzelnen Rezidivlokalisationen unterschieden. Granzym B⁺ war hier ein Marker für aktivierte CTLs⁸⁵. Kongruente Ergebnisse zeigen sich auch bei anderen Entitäten. Gao et al. und Fu et al. zeigten beispielsweise bereits 2007, dass bei hepatozellulären Karzinomen eine hohe Anzahl an CTLs im Verhältnis zu Treg-Zellen einen Überlebensvorteil bringt^{86,87}.

Allgemein spiegelt die Anwesenheit von CD8⁺-Zellen die Aktivität des spezifischen Immunsystems wider. CTLs wirken über die erwähnten Mechanismen zytotoxisch auf maligne entartete Zellen und wirken sich so positiv auf den Krankheitsverlauf aus. Eine Infiltration mit CD8⁺-Zellen sorgt somit für eine lokale Tumorkontrolle. Gleichzeitig ist eine alleinige Anwesenheit von CTLs nicht automatisch mit einer effektiven Immunantwort gleichzusetzen. Dysfunktionale oder durch Interaktion mit anderen Immunzellen gehemmte T-Lymphozyten, sog. *exhausted t cells*, nehmen nicht oder nur vermindert an der Tumorabwehr teil. *Exhausted t cells* können nicht mittels einfacher Immunhistochemie von adäquat wirkenden CTLs unterschieden werden. Eine hohe Anzahl an CD8⁺-Zellen ist somit kein sicherer Nachweis einer effektiven Immunabwehr. Im Umkehrschluss führt möglicherweise eine geringe Ansammlung immunkompetenter CTLs zu einer effektiveren Tumorzerstörung als eine hohe Ansammlung von *exhausted t cells*. Verschiedene immunsupprimierende Faktoren im intra- und peritumoralen Milieu können die Aktivität von CTLs herabsetzen und so ihre antitumoralen Mechanismen drosseln. Für den Nachweis von *exhausted T cells* müssten neben CD8, beispielsweise auch TIM-3 und PD-1 (CD8⁺TIM-3⁺PD-1⁺-T-Zellen) oder LAG-3 und PD-1 (CD8⁺LAG-3⁺PD-1⁺-T-Zellen) gefärbt werden, da sich diese Rezeptoren typischerweise hier befinden⁸⁸.

Letztlich scheinen vor allem die molekularen Subgruppen mit hoher Infiltration von CD8⁺-CTL^{im}, CD8⁺-CTL^{tum} und einer CD8⁺/FoxP3⁺^{tum}-Ratio in Bezug auf Leberrezidive einen günstigen Verlauf zu zeigen. Die Infiltration durch CTLs im Tumorrandbereich zeigt sich hier als möglicher prognostischer Marker. Der genaue Grund hierfür kann jedoch über die durchgeführte Methodik nicht ermittelt werden.

Die Ergebnisse legen in Zusammenschau mit der aktuellen Literatur eine effektive antitumorale Wirkung bei intratumoraler Lage von CTLs nahe. Das immunsuppressive Milieu das durch das PDAC im Laufe der Tumorprogression erzeugt wird, sorgt für eine Abschwächung der antitumoralen Wirkung CD8⁺-CTLs^{89,90}. Einerseits kommt es durch das Tumorgewebe selbst zur T-Zellhemmung, andererseits haben

auch Treg-Zellen, Fibroblasten, myeloide Suppressorzellen (engl. *myeloid-derived suppressor cell*, MDSC) und TAM's einen inhibitorischen Einfluss ⁸⁹. In der Umgehung dieses tumoralen Abwehrmechanismus liegt ein Angriffspunkt in der Malignombekämpfung. Durch die Hemmung von Immun-Checkpoints über Immun-Checkpoint-Inhibitoren, könnte eine adaptive Immunantwort durch CTLs gestärkt und die antitumorale Wirkung wieder hergestellt werden. Bei metastasierten Melanomen beispielsweise, konnte durch die Anwendung von Ipilimumab (CTLA4-Inhibitor) bereits ein besseres OS erzielt werden ⁹¹. Aber auch bei anderen Tumorentitäten, wie dem Lungenkarzinom, sind in Bezug auf Checkpoint-Inhibitoren Fortschritte zu verzeichnen ⁹². Ein weiterer Ansatz stellt die Förderung der Tumordinfiltration durch CTLs dar. Erfolge hierfür waren beispielsweise über die Inhibition von PD-1 oder die Aktivierung von 4-1 BB zu sehen, was eine verstärkte Infiltration durch CD8⁺-Zellen zur Folge hatte ⁹³. Die Reaktivierung von *exhausted T cells* oder die Vermeidung von *T cell exhaustion* könnten zusätzlich zu einer effektiveren Tumorabwehr beitragen.

Nachdem sich bei Patienten mit Leberrezidiv ein positiver Einfluss von CD8⁺-CTLs im Bereich des IM gezeigt hat, stellt sich weiter die Frage, ob die Anwesenheit von immunaktiven Zellen auch Einfluss auf die Lokalisation eines Rezidivs hat.

4.4. Infiltration durch CD8⁺-CTLs und Rezidivlokalisierung

Es hat sich gezeigt, dass Patienten, die im Verlauf ein Leberrezidiv entwickeln, vermehrt CD8⁺-CTL^{im} aufweisen. Die Infiltration des IM mit CD8⁺-CTL scheint daher Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung zu haben. Hieraus ergibt sich neben dem Einfluss auf das Überleben, auch die Frage welchen Einfluss CD8⁺-CTLs im IM des PDAC auf die Lokalisation des Erstrezidivs haben.

Patienten, die eine hohe Anzahl an CD8⁺-CTL^{im} aufwiesen und bei denen eine R0-Resektion erreicht wurde, entwickelten signifikant häufiger ein Fernrezidiv als ein Lokalrezidiv. Gleiches gilt für den Vergleich zwischen Lokal- und Leberrezidiv. Hier zeigt sich ebenfalls, dass eine höhere Anzahl an CD8⁺-CTL^{im} für ein Leberrezidiv als Erstrezidiv spricht. Bei Betrachtung der Anzahl der CD8⁺-CTL^{tum} und der CD8⁺-CTL^{per} ergab sich eine Tendenz zur vermehrten CD8-Infiltration bei Patienten mit Fern- bzw. Leberrezidiv. Im Umkehrschluss zeigen Patienten mit Lokalrezidiv eine niedrigere Anzahl an CD8⁺-CTL^{im} als Patienten mit einem Fern- bzw. Leberrezidiv. Wie bereits in Kapitel 4.3. „CD8-Infiltration und Überleben“ erwähnt, zeigt sich beim Blick auf das OS und DFS, dass Patienten mit einem Leberrezidiv und eine hohe Infiltration an CD8⁺-CTL^{tum} und CD8⁺-CTL^{im} ein signifikant längeres OS und DFS aufwiesen.

Zurzeit findet sich keine Literatur, die im Vergleich zu diesen Ergebnissen herangezogen werden kann. Bisherige Studien beziehen sich vor allem auf die Frage nach dem Überleben oder dem Zeitraum bis zur Entwicklung eines Rezidivs. Diana et al. zeigte 2016 beispielsweise, dass eine hohe stromale Expression von CD8⁺-CTLs unter anderem mit einem besseren PFS und DMFS einhergeht, bezüglich der Lage von CD8⁺-CTLs im Tumorrandbereich blieb das Ergebnis jedoch ohne Signifikanz ⁷⁷. Die stromale Anwesenheit von CD8⁺-Zellen scheint daher auch protektiv bezüglich der Entwicklung eines Rezidivs zu wirken, wobei sich das bisher für den Tumorrandbereich nicht nachweisen ließ. Auch Galon et al. kommt bezüglich der Tumormikroumgebung des kolorektalen Karzinoms zu dem Schluss, dass die Aktivierung des adaptiven Immunsystems, unabhängig der Lage der CTLs im Tumor oder Tumorrandbereich, einem Rezidiv vorbeugt. Folglich würde durch eine T-Zell-vermittelte Immunantwort allgemein die Metastasierungstendenz abgeschwächt werden ⁹⁴.

Die Ergebnisse lassen sich zwar nicht direkt auf die hier gewonnenen Ergebnisse übertragen, geben jedoch Hinweise auf ein verlängertes rezidivfreies Überleben bei erhöhter Zellzahl von CD8⁺-CTLs. Es lässt sich vermuten, dass abhängig von der Infiltration durch CD8⁺-CTLs verschiedene Rezidivlokalisationen als Erstrezidiv wahrscheinlich werden. Möglicherweise steht dies mit der zunehmenden lokalen Tumorkontrolle bei erhöhter Anwesenheit von CTLs im Zusammenhang. Patienten mit einer höheren Anzahl an CD8⁺-CTL^{im} konnten Lokalrezidive hier besser verhindern, wodurch tendenziell zuerst ein Fern- bzw Leberrezidiv als Erstrezidiv klinisch apparent wird. So gibt die Anzahl CD8⁺-CTL^{im} Hinweise auf das Metastasierungsmuster des PDAC.

Das Verständnis über das Metastasierungsverhalten des PDAC wäre von prognostischem und therapeutischem Nutzen. Hierbei könnte Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko oder schlechter Prognose identifiziert werden. Beispielsweise wären durch gezielte Diagnostik oder verkürzte Kontrollintervalle eine frühe Detektion des entsprechenden Rezidivs möglich und ein rascher Therapiebeginn denkbar. Hierbei könnten ebenfalls bisher unbekannte, molekularbiologische Subgruppen mit verschiedenen Auswirkungen auf das Rezidivmuster eine Rolle spielen. In Bezug auf immuntherapeutische Therapieansätze wäre bspw. die Verstärkung der lokalen Tumorkontrolle oder spezieller die Unterstützung der CD8⁺-T-Zellantwort zur Prävention einer Rezidiventwicklung hilfreich. Zur Abschätzung der Prognose werden bereits bekannte, histopathologische Merkmale verwendet. Der Einfluss der Infiltration durch CD8⁺-CTLs im IM auf diese wird im Folgenden weiter beleuchtet.

4.5. Infiltration durch CD8⁺-CTLs und TNM-Klassifikation

Eine bereits lange etablierte Klassifikation zur Evaluation der Prognose, der Morbidität und möglicher Therapieoptionen ist die TNM-Klassifikation. Hier fließen verschieden tumorspezifische und

histopathologische Kriterien. Über histopathologische Gegebenheiten beispielsweise, lassen sich Aussagen zur Prognose des PDACs treffen. Hierbei relevant sind vor allem die Ausdehnung des Primarius (T-Status), das Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen (N-Status), den Differenzierungsgrad (Grading), Hämangiosis carcinomatosa (V-Status), Lymphangiosis carcinomatosa (L-Status) und die Perineuralscheideninfiltration (Pn-Status). CD8⁺-Zellen haben Einfluss auf das Tumorverhalten und die Progression. Über den Zusammenhang zwischen der Infiltration mit CD8⁺-CTLs und histopathologischen Markern könnten daher Informationen über den Verlauf gewonnen werden.

In der vorliegenden Auswertung wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der CD8⁺-CTL^{im} und dem Lymphknotenstatus festgestellt. Patienten mit einem N0-Status wiesen eine höhere Infiltration durch CD8⁺-CTL^{im} auf als Patienten mit einer Lymphknotenmetastasierung. Bei Patienten mit einem N1-Status zeigte sich eine signifikant höhere Akkumulation von CD8⁺-CTL^{per}.

Ein protektiver Effekt der CD8⁺-Zellen wurde bereits bei weiteren Tumorentitäten festgestellt. Hier sind beispielsweise das Magen- oder Mammakarzinom zu nennen ^{95,96}. Auch konnte dieser Effekt beim Zervixkarzinom beobachtet werden ⁹⁷. Auch bei Ino et al. und Diana et al. wurde nach einer Korrelation zwischen histopathologischen Merkmalen und der CD8-Infiltration gesucht, jedoch zeigte sich hier kein Zusammenhang ^{73,77}.

Auch wenn die Ergebnisse der unterschiedlichen Entitäten heterogen zu sein scheinen, geben sie dennoch Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Infiltration durch CD8⁺-CTL^{im} und einem N0-Status.

CD8⁺-T-Zellen tragen im Rahmen der *Immunosurveillance* maßgeblich zur Abwehr maligne entarteter Zellen bei ^{60,63}. CD8⁺-CTLs haben in dieser Auswertung Auswirkung auf das Metastasierungsverhalten und die Streuungstendenz des Primärtumors. Die hier, sowie in verschiedenen Studien, erhobene Daten legen nahe, dass eine hohe Infiltration durch CD8⁺-Zellen im Tumorrandbereich des Primarius die Entwicklung von regionären Lymphknotenmetastasen vermindert und damit eine lokale Tumorkontrolle zur Folge hat. Eine Akkumulation von CD8⁺-CTL^{per} hingegen scheint keinen maßgeblichen Effekt auf die Vermeidung von Lymphknotenmetastasen zu haben und geht mit einer höheren Rate an regionären Lymphknotenmetastasen einher. Der Grund hierfür ist vermutlich der mangelnde Kontakt zwischen Tumorgewebe und CTLs wodurch eine weitere Tumorausbreitung im Sinne einer lymphnodalen Metastasierung nicht verhindert werden kann. Die lokale Tumorkontrolle nimmt folglich mit peritumorale Lage der CD8⁺-CTLs ab.

Die ermittelten Ergebnisse sind differenziert zu betrachten. Patienten mit einer hohen Akkumulation von CD8⁺-CTL^{per}, weisen hier eine gesteigerte Tendenz zu Lymphknotenmetastasen auf. Im Umkehrschluss wäre bei einer hohen Infiltration mit CD8⁺-CTL^{tum} durch den direkten Kontakt zur Malignomzelle eine geringere Lymphknotenmetastasierung zu erwarten. Die Anzahl der CD8⁺-CTL^{tum} hatte hier jedoch keinen Einfluss auf die lymphogene Metastasierung. Eine hohe Anzahl an CD8⁺-CTL^{im} führte hier jedoch zu einer erfolgreichen lokalen Tumorkontrolle.

Die aktuelle Literatur gibt keine eindeutige Antwort auf den Einfluss der CTL-Infiltration auf die Lymphknotenmetastasierung. Die Ergebnisse geben jedoch Hinweise auf eine vermehrte lymphogene Metastasierung bei peritumorale Lage der CD8⁺-CTLs, wobei hier möglicherweise die lokale Tumorkontrolle verloren geht. Gleichzeitig scheint eine insgesamt hohe Anwesenheit von CD8⁺-CTLs im IM einen protektiven Effekt auf die Entwicklung von Lymphknotenmetastasen zu haben.

4.6. Methodenkritik

Die angewandte Immunhistochemie wurde mit dem Färbeautomaten Ventana BenchMark Ultra IHC/ISH Staining durchgeführt. Dadurch konnte ein einheitlicher Ablauf der immunhistochemischen Färbung gewährleistet werden. Eine Standardisierung des Färbevorgangs, wie beispielsweise einheitliche Inkubations- und Waschzeiten, war durch die Verwendung des Färbeautomaten gegeben. So wurde eine hohe Vergleichbarkeit erreicht, was bei einer manuellen Färbung in diesem Maße nur unzureichend möglich wäre. Unterschiede der Färbeintensität aufgrund variierender Chargen des CD8-Antikörpers können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Antikörperfärbung ist hochspezifisch für das Oberflächenprotein CD8. Allerdings wird dieses Protein, neben CTLs, auch auf Zellen, wie den Thymozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen, NK-Zellen, Makrophagen oder Monozyten exprimiert. Die Expression ist jedoch gering, so dass der Einfluss dieser Zellen auf die Ergebnisse eher als gering eingeschätzt wird.

Die Patientendaten wurden sorgfältig erhoben. Trotz doppelter Kontrolle durch einen zweiten Auswerter, kann eine Fehlübertragung nicht ausgeschlossen werden. Bei den erhobenen Patientendaten handelt es sich um retrospektiv erhobene Daten. Abhängig der vorhandenen Datensätze, war daher nicht immer eine vollständige Datenerfassung möglich. Dies hatte unterschiedliche Patientenzahlen für verschiedene Analysen zur Folge.

Die zu färbenden Präparate wurden aus einem Tumorgewebe enthaltenden Paraffinblock gefertigt. Hierbei wurde die Auswahl anhand des jeweiligen HE-Serienschnitts getroffen. Über die alleinige Betrachtung des HE-Serienschnitts konnte jedoch keine Aussage über die Immunzellichte von CD8⁺-Zellen in dem untersuchten histologischen Schnitt getroffen werden. Daher kann nicht sichergestellt werden, dass der tumorenhaltende Paraffinblock mit der größten Tumordinfiltration durch CD8⁺-CTLs ausgewählt wurde. Dennoch kann der Schnitt als repräsentativ gewertet werden.

Die Auszählung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher. Aufgrund subjektiver Zählweise kam es hier zu variablen Ergebnissen. Es wurde deshalb eine interne Kontrolle (erneute Auszählung durch den gleichen Untersucher zu einem späteren Zeitpunkt) und eine externe Kontrolle (erneute Auszählung durch einen zweiten Untersucher) durchgeführt. Die Auswahl der immunhistochemisch gefärbten Gesichtsfelder, sowie die Auszählung, wurden durch einen Facharzt für Pathologie überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

Zusätzlich haben neben Treg-Zellen im Bereich der Tumormikroumgebung weitere Zelltypen, wie z.B. MDSC, Einfluss auf die Wirkung von CD8⁺-CTLs und das Tumorverhalten. Diese Zelltypen wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

4.7. Schlussfolgerung und Therapieausblick

Die Ergebnisse lassen einen protektiven Effekt durch die Infiltration von CD8⁺-CTL^{im} und CD8⁺-CTL^{tum} vermuten. Eine Infiltration mit CD8⁺-CTLs ist als Indikator für eine hohe Aktivität des adaptiven Immunsystems zu sehen und sorgt im Rahmen der *Immunosurveillance* für die Zerstörung maligne entarteter Zellen.

Malignome mit einer höheren CD8⁺-CTL-Infiltration im IM des Primarius entwickeln nach diesen Ergebnissen im Verlauf häufiger ein Fernrezidiv. Differenziert betrachtet, spricht eine erhöhte Anzahl von CD8⁺-CTLs vor allem für die Entwicklung von Lebermetastasen. So könnte dieses molekularbiologische Risikoprofil beispielsweise zu einer engmaschigeren Nachsorge führen und so eine frühe Detektion von Rezidiven beitragen.

Darüber hinaus wäre die Aktivierung von exhausted t cells bei Fern- bzw. Leberrezidiven, aufgrund der hohen Anzahl von CD8⁺-CTL^{im} und dem hiermit einhergehenden besseren OS, besonders vielversprechend.

Studien wie die von Ino et al., Diana et al. oder Carstens et al. lassen auf einen antitumoralen Mechanismus von CD8⁺-Zellen und hiermit verbunden auf ein längeres OS schließen^{73,77,83}. Eine Betrachtung des Tumorrandbereichs, beispielsweise bei Diana et al., erbrachte jedoch keinen Hinweis auf einen Überlebensvorteil bei einer hohen CD8⁺-Infiltration in dieser Region⁷⁷. Dieses Ergebnis konnte hier zunächst bestätigt werden. Bei zusätzlicher Aufteilung des IM in ein intra- und peritumorales Areal ergaben sich hier jedoch verschiedene neue Erkenntnisse. Den Ergebnissen zufolge scheinen Patienten mit einer Lebermetastasierung und einer hohen Infiltration an CD8⁺-CTL^{tum} bezüglich des OS und DFS einen besonderen Vorteil zu haben. Der direkte Kontakt von CD8⁺-CTLs zur entarteten Zelle scheint von entscheidender Bedeutung für die Malignombekämpfung zu sein, worauf Carstens et al. bereits hinwies⁸³. Auch zeigten Patienten mit einer Lebermetastasierung die eine hohe CD8⁺/FoxP3^{tum}-Ratio aufwiesen ebenfalls einen signifikanten Vorteil bezüglich des OS. Das Verhältnis von antitumoral zu protumoral wirkenden Zellen nahm hier Einfluss auf das OS.

Weiter wurde ermittelt, dass Patienten ohne Lymphknotenmetastasierung, mehr CD8⁺-CTL^{im} aufwiesen. Dies bestätigt weiter den protektiven Mechanismus der CD8⁺-CTLs und unterstreicht die Rolle dieser Zellen in der Tumorabwehr. Im Gegensatz hierzu litten Patienten mit einer Akkumulation von CD8⁺-CTL^{per} signifikant häufiger an Lymphknotenmetastasen. CD8⁺-CTL^{per} hatten hier keinen direkten Kontakt zur Tumorzelle und konnten so nicht zu deren Untergang beitragen. Dies bestätigt die Rolle des adaptiven Immunsystems in der lokalen Tumorkontrolle.

Die Suche nach weiteren molekularbiologischen Subgruppen kann Informationen über den Krankheitsverlauf und das Tumorverhalten liefern. Auch könnte der Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren bei einer hohen Akkumulation von CD8⁺-Zellen zur Verstärkung der antitumoralen T-Zell-Antwort besonders vielversprechend sein. Derzeit ist die Anwendung von Checkpoint-Inhibitoren in der Primärtherapie von PDACs nicht zugelassen. In der palliativen Situation ergibt sich jedoch bereits seit der im Jahr 2021 aktualisierten S3-Leitlinie die Möglichkeit der Anwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren (Empfehlungsgrad 0) ³⁵. Hierfür werden jedoch bestimmte molekulare Eigenschaften, beispielsweise Mikrosatelliten-Instabilität, vorausgesetzt ³⁵. Die Anwendung von Checkpoint-Inhibitoren, wie z.B. Ipilimumab oder Nivolumab, hat auch bereits bei der Therapie von Melanomen und Lungenkarzinomen zu vielversprechenden Ergebnissen geführt ^{38,91}. Ein anderes Beispiel ist Pembrolizumab, das seit Ende 2019 auch als first-line Therapie bei metastasierten oder rezidivierten, PD-1⁺ Kopf-Hals-Tumoren zugelassen ist ⁹⁸. Die Wirksamkeit von Immuncheckpoint-Inhibitoren beim PDAC fiel bisher gering aus. Die fehlenden Erfolge dieser Therapie, könnten unter anderem an einer im Vergleich geringen Penetration des Tumorgewebes durch CD8⁺-CTLs liegen. Grund für die mäßige Infiltration ist vor allem die intensive desmoplastischen Stromareaktion des PDAC. Allgemein scheint die Überwindung der Stromabarriere mit dem Ziel einen direkten Kontakt zwischen Tumorzellen und den CD8⁺-CTLs zu schaffen sinnvoll. Ein Therapieansatz ist die Kombination aus Förderung der Tumordinfiltration durch CD8⁺-CTLs mittels Auflockerung der Stromabarriere und der Anwendung von Checkpoint-Inhibitoren. In den letzten Jahren hat sich eine Kombination aus AT₁-Rezeptorantagonisten/ACE-Hemmern und Chemotherapeutika, wie Gemcitabin, etabliert. Angiotensin-II initiiert über den vascular endothelial growth factor (VEGF) die Angiogenese, initiiert zusätzlich die Zellproliferation, eine Entzündungsreaktion und dient als Wachstumsfaktor für Myozyten und Fibroblasten. Von besonderer Bedeutung ist hier der AT₁-Blocker Losartan. Durch die zusätzliche Gabe von Losartan zu Gemcitabin ergibt sich ein Überlebensvorteil ^{99,100}. Bei anderen Entitäten wie dem Ovarialkarzinom führte die Gabe von Losartan zu einer signifikanten Hemmung der tumoralen Stromaentwicklung und einer hiermit verbundenen Verbesserung der Tumordurchblutung, was zur besseren Perfusion durch Chemotherapeutika führt ⁸⁰.

Auch wird derzeit der Versuch unternommen ein bereits in hämatoonkologischen Behandlungsschemata etabliertes Therapieverfahren auf andere Tumorentitäten, unter anderem dem PDAC, zu übertragen. Hierbei handelt es sich um die sog. CAR-T-Zell-Therapie (engl. *chimeric antigen receptor-T cell therapy*). Bei dieser Therapie werden dem Patienten T-Zellen extrahiert und gentechnisch modelliert, so dass diese gegen TA gerichtet, gezielt Tumorzellen zerstören können. Beispielsweise könnten sich gegen Mesothelin (MSLN) gerichtete T-Zellen als wirksam in Bezug auf die Tumorzelllyse erweisen ¹⁰¹. Dies wird aktuell in verschiedenen Maus- und in-vitro-Modellen untersucht ¹⁰². Der weitere Fortschritt diesbezüglich bleibt abzuwarten. Es ist jedoch möglich, dass hier in naher Zukunft Fortschritte zu verzeichnen sein werden und diese Therapie bei verschiedenen soliden Malignomen, wie z.B. dem PDAC, angewendet werden könnte ¹⁰³.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von CD8⁺-CTLs im Tumorrandbereich (*invasive margin*, IM) auf das Überleben und die Rezidivlokalisierung zu untersuchen. Insgesamt wurden 83 an einem PDAC erkrankte Patienten eingeschlossen. Die CD8⁺-Infiltration wurde durch eine immunhistochemische Färbung an Paraffinblöcken mit einem monoklonalen CD8-Antikörper ermittelt. Ausgezählt wurden über drei Areale mit ausgeprägter CD8⁺-Infiltration, sog. „high power fields“ (HPF, je 50% Tumorgewebe und 50% peritumorales Gewebe). Ermittelt wurde die Anzahl im gesamten HPF (CD8⁺-CTL^{im}), sowie im intratumoralen (CD8⁺-CTL^{tum}) und peritumoralen (CD8⁺-CTL^{per}) Areal des HPF. Zusätzlich wurde das Verhältnis zwischen CD8⁺-CTLs und FoxP3⁺-Zellen ermittelt. Die Daten der FoxP3⁺-Infiltration aus dem gleichen Patientenkollektiv lagen vor und wurden bereits in einer weiteren Arbeit veröffentlicht.

Im untersuchten Kollektiv ergab sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben (OS) hinsichtlich der CD8⁺-Infiltration im IM. Bei Patienten mit einem Leberrezidiv zeigte sich hingegen, dass eine erhöhte Infiltration von CD8⁺-CTL^{im} und CD8⁺-CTL^{tum} mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben (OS) und krankheitsfreien Überleben (DFS) einher gingen. Patienten mit einem Lokalrezidiv zeigten ein besseres OS bei niedriger Infiltration durch CD8⁺-CTL^{im} und CD8⁺-CTL^{per}. Auch eine hohe CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio ging mit einem signifikant besseren OS, sowie einem Trend zu einem besseren DFS bei Patienten mit Leberrezidiv einher. Bei Betrachtung der Zellverteilung zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl von CD8⁺-CTL^{im} bei Patienten, die ein Fernrezidiv erlitten im Vergleich zu Patienten mit einem Lokalrezidiv, wobei sich insgesamt eine signifikant erhöhte peritumorale Akkumulation von CD8⁺-Zellen ergab. Ebenfalls signifikant höher war die Zellzahl der CD8⁺-CTL^{im} bei Leberrezidiven im Vergleich zu Lokalrezidiven. In Bezug auf histopathologische Prognosefaktoren zeigte sich eine signifikant höhere Infiltration mit CD8⁺-CTL^{im} bei fehlender regionärer Lymphknotenmetastasierung (N0), wohingegen eine erhöhte Anzahl von CD8⁺-CTL^{per} signifikant häufiger mit einer Lymphknotenmetastasierung einherging.

Zusammenfassend konnte hier erstmalig ein Zusammenhang zwischen der Infiltration des Tumorrandbereichs mit CD8⁺-CTL's und dem Metastasierungsverhalten des PDAC beschrieben werden. Nach den Ergebnissen tragen CD8⁺-CTLs zur lokalen Tumorkontrolle bei. Vor allem Patienten mit einer Lebermetastasierung scheinen von einer vermehrten Infiltration durch CD8⁺-CTL^{im} zu profitieren. Der Überlebensvorteil in Bezug auf die CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio weist, neben einem tumorprotektiven Mechanismus, auf die Bedeutung von CTLs und dem Verhältnis zu immunsupprimierenden Zellen in der unmittelbaren Tumorumgebung hin. Die tumorale Infiltration durch CD8⁺-CTLs wird vermutlich durch eine starke Stromareaktion gebremst, was zu einer peritumoralen Akkumulation von CTLs führt. Die Infiltration von CD8⁺-Zellen im IM hatte in dieser Auswertung somit prognostischen Wert. Ebenfalls deutlich wird der Überlebensvorteil von Leberrezidiven bei der Bestimmung der CD8⁺/FoxP3⁺-Ratio, so dass eine Kombination verschiedener pro- und antitumoraler Marker sinnvoll scheint.

6. Literaturverzeichnis

1. Chan JM, Gong Z, Holly EA, Bracci PM. Dietary patterns and risk of pancreatic cancer in a large population-based case-control study in the San Francisco Bay Area. *Nutr Cancer*. 2013;65(1):157-164. doi:10.1080/01635581.2012.725502
2. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol*. 2012;23(7):1880-1888. doi:10.1093/annonc/mdr541
3. Boyle P, Maisonneuve P, Bueno de Mesquita B, et al. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case control study of the search programme of the IARC. *Int J Cancer*. 1996;67(1):63-71. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960703)67:1<63::AID-IJC12>3.0.CO;2-D
4. Bracci PM. Obesity and pancreatic cancer: overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol Carcinog*. 2012;51(1):53-63. doi:10.1002/mc.20778
5. Gupta S, Wang F, Holly EA, Bracci PM. Risk of pancreatic cancer by alcohol dose, duration, and pattern of consumption, including binge drinking: a population-based study. *Cancer Causes Control*. 2010;21(7):1047-1059. doi:10.1007/s10552-010-9533-6
6. Larsson SC, Permert J, Håkansson N, Näslund I, Bergkvist L, Wolk A. Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *Br J Cancer*. 2005;93(11):1310-1315. doi:10.1038/sj.bjc.6602868
7. Nöthlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN. Meat and Fat Intake as Risk Factors for Pancreatic Cancer: The Multiethnic Cohort Study. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(19):1458-1465. doi:10.1093/jnci/dji292
8. Malka D, Hammel P, Maire F, et al. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*. 2002;51(6):849-852.
9. Humphris JL, Johns AL, Simpson SH, et al. Clinical and pathologic features of familial pancreatic cancer. *Cancer*. 2014;120(23):3669-3675. doi:10.1002/cncr.28863
10. Corbo V, Tortora G, Scarpa A. Molecular Pathology of Pancreatic Cancer: From Bench-to-Bedside Translation. *Curr Drug Targets*. 2012;13(6):744-752. doi:10.2174/138945012800564103
11. Winter JM, Maitra A, Yeo CJ. Genetics and pathology of pancreatic cancer. *HPB (Oxford)*. 2006;8(5):324-336. doi:10.1080/13651820600804203
12. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer 2016. *The Lancet*. 2016;388(10039):73-85. doi:10.1016/S0140-6736(16)00141-0

13. Apte MV, Park S, Phillips PA, et al. Desmoplastic Reaction in Pancreatic Cancer: Role of Pancreatic Stellate Cells. *Pancreas*. 2004;29(3):179-187.
14. Pandol S, Edderkaoui M, Gukovsky I, Lugea A, Gukovskaya A. Desmoplasia of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(11 0):S44-S47. doi:10.1016/j.cgh.2009.07.039
15. Wang LM, Silva MA, D'Costa Z, et al. The prognostic role of desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2015;7(4):4183-4194. doi:10.18632/oncotarget.6770
16. Wittekind C, Meyer HJ. *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. 7th ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2010.
17. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg*. 2004;91(5):586-594. doi:10.1002/bjs.4484
18. Hartwig W, Hackert T, Hinz U, et al. Pancreatic Cancer Surgery in the New Millennium: Better Prediction of Outcome. *Annals of Surgery*. 2011;254(2):311-319. doi:10.1097/SLA.0b013e31821fd334
19. Tummala P, Howard T, Agarwal B. Dramatic Survival Benefit Related to R0 Resection of Pancreatic Adenocarcinoma in Patients With Tumor ≤ 25 mm in Size and ≤ 1 Involved Lymph Nodes. *Clin Transl Gastroenterol*. 2013;4(3):e33. doi:10.1038/ctg.2013.4
20. Campbell F, Smith RA, Whelan P, et al. Classification of R1 resections for pancreatic cancer: the prognostic relevance of tumour involvement within 1 mm of a resection margin. *Histopathology*. 2009;55(3):277-283. doi:10.1111/j.1365-2559.2009.03376.x
21. Konstantinidis IT, Warshaw AL, Allen JN, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: is there a survival difference for R1 resections versus locally advanced unresectable tumors? What is a "true" R0 resection? *Ann Surg*. 2013;257(4):731-736. doi:10.1097/SLA.0b013e318263da2f
22. Verbeke CS, Leitch D, Menon KV, McMahon MJ, Guillou PJ, Anthony A. Redefining the R1 resection in pancreatic cancer. *Br J Surg*. 2006;93(10):1232-1237. doi:10.1002/bjs.5397
23. Leach SD, Lee JE, Charnsangavej C, et al. Survival following pancreaticoduodenectomy with resection of the superior mesenteric–portal vein confluence for adenocarcinoma of the pancreatic head. *Br J Surg*. 1998;85(5):611-617. doi:10.1046/j.1365-2168.1998.00641.x
24. Mollberg N, Rahbari NN, Koch M, et al. Arterial resection during pancreatectomy for pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg*. 2011;254(6):882-893. doi:10.1097/SLA.0b013e31823ac299
25. Hackert T, Niesen W, Hinz U, et al. Radical surgery of oligometastatic pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(2):358-363.

doi:10.1016/j.ejso.2016.10.023

26. Kim CB, Ahmed S, Hsueh EC. Current surgical management of pancreatic cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2011;2(3):126-135. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2011.029
27. Müller MW, Aßfalg V, Michalski CW, Büchler P, Kleeff J, Friess H. Pankreassegmentresektion. *Chirurg*. 2009;80(1):14-21. doi:10.1007/s00104-008-1576-9
28. Tomlinson JS, Jain S, Bentrem DJ, et al. Accuracy of Staging Node-Negative Pancreas Cancer: A Potential Quality Measure. *Arch Surg*. 2007;142(8):767-774. doi:10.1001/archsurg.142.8.767
29. Liao WC, Chien KL, Lin YL, et al. Adjuvant treatments for resected pancreatic adenocarcinoma: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet Oncology*. 2013;14(11):1095-1103. doi:10.1016/S1470-2045(13)70388-7
30. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, et al. A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(12):1200-1210. doi:10.1056/NEJMoa032295
31. Oettle H, Post S, Neuhaus P, et al. Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 2007;297(3):267-277. doi:10.1001/jama.297.3.267
32. Ueno H, Kosuge T, Matsuyama Y, 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):908-915. doi:10.1038/sj.bjc.6605256
33. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017;389(10073):1011-1024. doi:10.1016/S0140-6736(16)32409-6
34. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, 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):1473-1481. doi:10.1001/jama.2013.279201
35. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 2.0, 2021, AWMF. Published online 2021:222.
36. Jazirehi AR, Lim A, Dinh T. PD-1 inhibition and treatment of advanced melanoma-role of pembrolizumab. *Am J Cancer Res*. 2016;6(10):2117-2128.
37. McGranahan N, Furness AJS, Rosenthal R, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*. 2016;351(6280):1463-1469. doi:10.1126/science.aaf1490

38. Sgambato A, Casaluca F, Sacco PC, et al. Anti PD-1 and PDL-1 Immunotherapy in the Treatment of Advanced Non- Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Review on Toxicity Profile and its Management. *Curr Drug Saf.* 2016;11(1):62-68.
39. Johansson H, Andersson R, Bauden M, Hammes S, Holdenrieder S, Ansari D. Immune checkpoint therapy for pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(43):9457-9476. doi:10.3748/wjg.v22.i43.9457
40. Uesaka K, Boku N, Fukutomi A, et al. Adjuvant chemotherapy of S-1 versus gemcitabine for resected pancreatic cancer: a phase 3, open-label, randomised, non-inferiority trial (JASPAC 01). *The Lancet.* 2016;388(10041):248-257. doi:10.1016/S0140-6736(16)30583-9
41. Mavros MN, Xu L, Maqsood H, et al. Perioperative Blood Transfusion and the Prognosis of Pancreatic Cancer Surgery: Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(13):4382-4391. doi:10.1245/s10434-015-4823-6
42. Allen PJ, Kuk D, Castillo CFD, 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. *Ann Surg.* 2017;265(1):185-191. doi:10.1097/SLA.0000000000001763
43. Kang MJ, Jang JY, Chang YR, Kwon W, Jung W, Kim SW. Revisiting the concept of lymph node metastases of pancreatic head cancer: number of metastatic lymph nodes and lymph node ratio according to N stage. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(5):1545-1551. doi:10.1245/s10434-013-3473-9
44. Riediger H, Keck T, Wellner U, et al. The Lymph Node Ratio is the Strongest Prognostic Factor after Resection of Pancreatic Cancer. *J Gastrointest Surg.* 2009;13(7):1337. doi:10.1007/s11605-009-0919-2
45. Yamamoto Y, Ikoma H, Morimura R, et al. The clinical impact of the lymph node ratio as a prognostic factor after resection of pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 2014;34(5):2389-2394.
46. Benassai G, Mastrorilli M, Quarto G, Cappiello A, Giani U, Mosella G. Survival after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas. *Chir Ital.* 2000;52(3):263-270.
47. Chang DK, Johns AL, Merrett ND, et al. Margin clearance and outcome in resected pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(17):2855-2862. doi:10.1200/JCO.2008.20.5104
48. Meyer W, Jurowich C, Reichel M, Steinhäuser B, Wunsch PH, Gebhardt C. Pathomorphological and histological prognostic factors in curatively resected ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Surg Today.* 2000;30(7):582-587. doi:10.1007/s005950070096
49. Millikan KW, Deziel DJ, Silverstein JC, et al. Prognostic factors associated with resectable adenocarcinoma of the head of the pancreas. *Am Surg.* 1999;65(7):618-623; discussion 623-624.

50. Bilici A. Prognostic factors related with survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014;20(31):10802-10812. doi:10.3748/wjg.v20.i31.10802
51. Cho SH, Jeon J, Kim SI. Personalized Medicine in Breast Cancer: A Systematic Review. *J Breast Cancer*. 2012;15(3):265-272. doi:10.4048/jbc.2012.15.3.265
52. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989
53. Ziegler A, Koch A, Krockenberger K, Großhennig A. Personalized medicine using DNA biomarkers: a review. *Hum Genet*. 2012;131(10):1627-1638. doi:10.1007/s00439-012-1188-9
54. Roberts SG, Blute ML, Bergstralh EJ, Slezak JM, Zincke H. PSA doubling time as a predictor of clinical progression after biochemical failure following radical prostatectomy for prostate cancer. *Mayo Clin Proc*. 2001;76(6):576-581. doi:10.4065/76.6.576
55. Dell'Aquila E, Fulgenzi CAM, Minelli A, et al. Prognostic and predictive factors in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2020;11(10):924-941. doi:10.18632/oncotarget.27518
56. Fang Y, Yao Q, Chen Z, et al. Genetic and molecular alterations in pancreatic cancer: Implications for personalized medicine. *Med Sci Monit*. 2013;19:916-926. doi:10.12659/MSM.889636
57. Foroutan B. Personalized Medicine: A Review with Regard to Biomarkers. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*. 2015;7(6). doi:10.4172/jbb.1000248
58. Hartmann LC, Sellers TA, Schaid DJ, et al. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(21):1633-1637. doi:10.1093/jnci/93.21.1633
59. Tian Q, Price ND, Hood L. Systems Cancer Medicine: Towards Realization of Predictive, Preventive, Personalized, and Participatory (P4) Medicine. *Journal of internal medicine*. 2012;271(2):111. doi:10.1111/j.1365-2796.2011.02498.x
60. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*. 2004;22(1):329-360. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803
61. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;121(1):1-14. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x
62. Teng MWL, Galon J, Fridman WH, Smyth MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(9):3338. doi:10.1172/JCI80004

63. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-998. doi:10.1038/ni1102-991
64. Gibbings D, Befus AD. CD4 and CD8: an inside-out coreceptor model for innate immune cells. *J Leukoc Biol*. 2009;86(2):251-259. doi:10.1189/jlb.0109040
65. Gascoigne NRJ. Do T cells need endogenous peptides for activation? *Nat Rev Immunol*. 2008;8(11):895-900. doi:10.1038/nri2431
66. Nagata S. Fas-Mediated Apoptosis. In: *Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation VI*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer, Boston, MA; 1996:119-124. doi:10.1007/978-1-4899-0274-0_12
67. Andersen MH, Schrama D, Straten P, Becker JC. Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126(1):32-41. doi:10.1038/sj.jid.5700001
68. Halama N, Michel S, Kloor M, et al. Localization and Density of Immune Cells in the Invasive Margin of Human Colorectal Cancer Liver Metastases Are Prognostic for Response to Chemotherapy. *Cancer Res*. 2011;71(17):5670-5677. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0268
69. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group. *Advances In Anatomic Pathology*. 2017;24:1. doi:10.1097/PAP.0000000000000162
70. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology*. 2013;14(10):1014. doi:10.1038/ni.2703
71. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells — what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(7):497-512. doi:10.1038/nrd4253
72. Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, 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.
73. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, et al. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*. 2013;108(4):914. doi:10.1038/bjc.2013.32
74. Ryschich E, Nötzel T, Hinz U, et al. Control of T-Cell-Mediated Immune Response by HLA Class I in Human Pancreatic Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(2):498-504.
75. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(3):203-213. doi:10.1056/NEJMoa020177

76. Pagès F, Berger A, Camus M, et al. Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(25):2654-2666. doi:10.1056/NEJMoa051424
77. Diana A, Wang LM, D'Costa Z, et al. Prognostic value, localization and correlation of PD-1/PD-L1, CD8 and FOXP3 with the desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(27):40992-41004. doi:10.18632/oncotarget.10038
78. von Bernstorff W, Voss M, Freichel S, et al. Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001;7(3 Suppl):925s-932s.
79. Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest*. 2012;122(3):899-910. doi:10.1172/JCI45817
80. Zhao Y, Cao J, Melamed A, et al. Losartan treatment enhances chemotherapy efficacy and reduces ascites in ovarian cancer models by normalizing the tumor stroma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(6):2210-2219. doi:10.1073/pnas.1818357116
81. Zhang B, Zhang Y, Bowerman NA, et al. Equilibrium between Host and Cancer Caused by Effector T Cells Killing Tumor Stroma. *Cancer Res*. 2008;68(5):1563-1571. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5324
82. Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2015;5:15179. doi:10.1038/srep15179
83. Carstens JL, Correa de Sampaio P, Yang D, et al. Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer. *Nat Commun*. 2017;8. doi:10.1038/ncomms15095
84. Wartenberg M, Zlobec I, Perren A, et al. Accumulation of FOXP3⁺T-cells in the tumor microenvironment is associated with an epithelial-mesenchymal-transition-type tumor budding phenotype and is an independent prognostic factor in surgically resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(6):4190-4201. doi:10.18632/oncotarget.2775
85. Hwang HK, Kim HI, Kim SH, 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):4477-4484. doi:10.3892/ol.2016.5252
86. Gao Q, Qiu SJ, Fan J, et al. Intratumoral Balance of Regulatory and Cytotoxic T Cells Is Associated With Prognosis of Hepatocellular Carcinoma After Resection. *JCO*. 2007;25(18):2586-2593. doi:10.1200/JCO.2006.09.4565
87. Fu J, Xu D, Liu Z, et al. Increased Regulatory T Cells Correlate With CD8 T-Cell Impairment and Poor Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2328-2339. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.102

88. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature Immunology*. 2011;12(6):492-499. doi:10.1038/ni.2035
89. Schnurr M, Duedell P, Bauer C, et al. Strategies to relieve immunosuppression in pancreatic cancer. *Immunotherapy*. 2015;7(4):363-376. doi:10.2217/imt.15.9
90. Wörmann SM, Diakopoulos KN, Lesina M, Algül H. The immune network in pancreatic cancer development and progression. *Oncogene*. 2014;33(23):2956-2967. doi:10.1038/onc.2013.257
91. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(8):711-723. doi:10.1056/NEJMoa1003466
92. Schvartsman G, Ferrarotto R, Massarelli E. Checkpoint inhibitors in lung cancer: latest developments and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol*. 2016;8(6):460-473. doi:10.1177/1758834016661164
93. Hall M, Liu H, Malafa M, et al. Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from human pancreatic tumors. *J Immunother Cancer*. 2016;4:61. doi:10.1186/s40425-016-0164-7
94. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-1964. doi:10.1126/science.1129139
95. Khedr RAEG, Ghannam AA, El-Rashidy MA, El-Deen AAS. The Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes CD8 and Foxp3 and their Impact on Recurrence in Breast Cancer Patients. *Journal of Cancer Science & Therapy*. 2016;8(7). doi:10.4172/1948-5956.1000414
96. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2008;99(10):1704-1711. doi:10.1038/sj.bjc.6604738
97. Piersma SJ, Jordanova ES, Poelgeest MIE van, et al. High Number of Intraepithelial CD8⁺ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Is Associated with the Absence of Lymph Node Metastases in Patients with Large Early-Stage Cervical Cancer. *Cancer Res*. 2007;67(1):354-361. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3388
98. Burtneess B, Harrington KJ, Greil R, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. 2019;394(10212):1915-1928. doi:10.1016/S0140-6736(19)32591-7
99. Anandanadesan R, Gong Q, Chipitsyna G, Witkiewicz A, Yeo CJ, Arafat HA. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells through an angiotensin II type 1 receptor and ERK1/2 signaling. *J Gastrointest Surg*. 2008;12(1):57-66. doi:10.1007/s11605-007-0403-9

100. Nakai Y, Isayama H, Ijichi H, et al. Inhibition of renin-angiotensin system affects prognosis of advanced pancreatic cancer receiving gemcitabine. *Br J Cancer*. 2010;103(11):1644-1648. doi:10.1038/sj.bjc.6605955
101. D\elm C, Tano ZE, Varghese AM, Adusumilli PS. CAR T-cell Therapy for Pancreatic Cancer. *J Surg Oncol*. 2017;116(1):63-74. doi:10.1002/jso.24627
102. Li T, Li H, Li S, et al. Research progress and design optimization of CAR-T therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Med*. 2019;8(11):5223-5231. doi:10.1002/cam4.2430
103. Akce M, Zaidi MY, Waller EK, El-Rayes BF, Lesinski GB. The Potential of CAR T Cell Therapy in Pancreatic Cancer. *Front Immunol*. 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.02166

7. Anlagen

7.1. Stadien der TNM-Klassifikation

TNM-Klassifikation UICC 2010	
T-Klassifikation	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor begrenzt auf Pankreas, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor begrenzt auf Pankreas, mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich jenseits des Pankreas aus, jedoch ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der A. mesenterica superior
T4	Tumor infiltrierte Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior
N-Klassifikation	
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden
M-Klassifikation	
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

7.2. Stadien der UICC-Klassifikation

Stadium UICC 2010	TNM-System		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1-T3	N1	M0
Stadium III	T4	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

7.3. Auswertung CD8⁺-Zellen

Pat. - Nr.	Alter	Geschlecht	Überleben in Monate	Zeitraum bis 1. Rezidiv in Monaten	Überleben Zum Ende des Beobachtungszeitraums (15.12.2015)	CD8 Mittelwert Sichtfeld	CD8 Mittelwert Tumor	CD 8 Mittelwert peritumoral
1	69	m	4	4	nein	63,67	11,67	52
2	64	w	8	8	nein	66,67	13	53,67
3	58	m	7	4	nein	104,33	9	95,33
4	74	w	18	8	nein			keine IHC
5	59	m	60	17	nein	57	11	46
6	71	m	17	8	nein	105,67	24	81,67
7	60	m	22	0	nein	57	5,67	51,33
8	70	m	16	16	nein	69	29	40
9	57	m	92+	77	ja	35,67	7	28,67
10	72	m	0+	0	nein	34,33	15,33	19
11	60	w	17	10	nein	94,33	15	79,33
12	64	w	46	34	nein	121,33	28,33	93
13	63	m	8	4	nein	79,33	15	64,33
14	53	m	9	1	nein	39,67	23,67	16
15	68	m	23	14	nein	66	14,33	51,67
16	68	w	18	4	nein	180,67	47,33	133,34
17	57	m	8	5	nein	76,33	4	72,33
18	68	m	41	38	nein	84,67	37	47,67
19	67	m	7	3	nein	68,67	17	51,67
20	49	m	78+	78	ja	74	8	66
21	48	m	16	5	nein	46,33	21,33	25
22	68	w	22	7	nein	36,33	8	28,33
23	69	m	58	11	nein	40	17	23
24	77	m	61+	61	ja	32	23,67	8,33
25	74	w	31	20	nein	43	12,67	30,33
26	71	w	49	10	nein	55	23,67	31,33

27	61	w	13	1	nein	23,33	12,33	11
28	71	w	17	8	nein	70,67	16	54,67
29	71	m	18+	18	nein	173	35	138
30	46	w	26	10	nein			kein IHC
31	55	w	48+	34	ja	54,33	7,33	47
32	77	w	57+	57	ja	38,33	29,67	8,66
33	65	m	57+	57	ja	112,33	27,67	84,66
34	64	m	32	26	nein	54,33	24	30,33
35	54	w	19	13	nein	61,67	6	55,67
36	77	m	40+	40	ja	82,67	27	55,67
37	63	m	40+	40	ja	45,67	8,67	37
38	79	m	13	10	nein	91,67	17,33	74,34
39	70	m	37+	4	ja	112	12,33	99,67
40	73	w	7	4	nein	60,33	19,33	41
41	67	m	30	10	nein	13	5	8
42	72	w	36+	36	ja	62	8	54
43	80	m	36+	36	ja	45,67	9	36,67
44	70	w	24	22	nein	140	22	118
45	81	w	24	17	nein	127	23,67	103,33
46	73	m	28+	28	ja	202,33	44	158,33
47	82	m	28+	28	ja	36	8,67	27,33
48	71	w	27+	27	ja	51	12,67	38,33
49	54	m	27+	13	ja	24	6,33	17,67
50	83	w	35+	34	ja	41,33	12,33	29
51	77	w	16	5	nein	32,67	8,67	24
52	49	w	25+	25	ja	136,33	18,67	117,66
53	74	m	6	5	nein	82,33	16,33	66
54	66	w	25+	25	ja	43,33	12,67	30,66
55	65	m	25+	24	ja	40,67	9,33	31,34
56	76	m	24+	24	ja	64	17,33	46,67
57	46	m	9	6	nein			keine IHC
58	66	w	33	20	nein	45,33	21	24,33
59	70	m	25	18	nein	54,67	12	42,67
60	61	w	30+	30	ja	35,33	3,67	31,66
61	65	w	30+	30	ja	56,67	23,33	33,34
62	73	m	35+	35	ja			kein IHC
63	79	w	29+	18	ja	97,67	25,33	72,34
64	78	m	1+	1	nein	21,33	10,67	10,66
65	80	w	8	0	nein	60,33	9,33	51
66	84	w	20+	20	ja	45	7	38
67	70	w	6	3	nein	87,67	18,33	69,34
68	76	m	9	8	nein	57,33	15,67	41,66
69	38	w	14+	14	ja	141,33	5	136,33
70	60	w	22+	22	ja	109,67	38	71,67
71	80	m	21+	14	ja	82,67	10	72,67
72	81	m	21+	21	ja	67,33	20	47,33
73	70	m	9+	9	nein	71	14,33	56,67

74	74	m	20+	20	ja	42,33	3	39,33
75	76	m	20+	20	ja	39,33	15,67	23,66
76	75	w	20+	20	ja	54	27	27
77	80	w	19+	10	ja	84,33	19,67	64,66
78	75	m	15	2	nein	58	11	47
79	74	w	3+	3	nein	43	6	37
80	74	w	5+	5	nein	38,67	13	25,67
81	48	m	18+	16	ja	110,67	43	67,67
82	59	m	0+	0	nein	59,33	35	24,33
83	68	w	17+	17	ja	33	3,67	29,33

7.4. Auswertung FoxP3⁺-Zellen

Pat.-Nr.	Alter	Geschlecht	Überleben in Monate	Zeitraum bis 1. Rezidiv in Monaten	Überleben Zum Ende des Beobachtungszeitraums (15.12.2015)	FoxP3 Mittelwert Sichtfeld	FoxP3 Mittelwert Tumor	FoxP3 Mittelwert peritumoral
1	69	m	4	4	nein	28,67	12,33	16,33
2	64	w	8	8	nein	41,67	15,33	26,33
3	58	m	7	4	nein	30,67	18,33	12,33
4	74	w	18	8	nein			0,00
5	59	m	60	17	nein	18,33	8,00	10,33
6	71	m	17	8	nein	22,00	8,33	13,67
7	60	m	22	0	nein			0,00
8	70	m	16	16	nein	38,00	21,33	16,67
9	57	m	92+	77	ja	24,67	11,00	13,67
10	72	m	0+	0	nein	13,33	10,00	3,33
11	60	w	17	10	nein	44,67	11,67	33,00
12	64	w	46	34	nein	12,67	6,67	6,00
13	63	m	8	4	nein	17,00	9,00	8,00
14	53	m	9	1	nein	26,33	15,67	10,67
15	68	m	23	14	nein	25,33	7,33	18,00
16	68	w	18	4	nein	44,33	29,33	15,00
17	57	m	8	5	nein	20,00	7,67	12,33
18	68	m	41	38	nein	11,00	4,33	6,67
19	67	m	7	3	nein	18,33	9,67	8,67
20	49	m	78+	78	ja	19,33	4,67	14,67
21	48	m	16	5	nein	8,67	4,00	4,67
22	68	w	22	7	nein	14,33	3,00	11,33
23	69	m	58	11	nein	39,00	9,00	30,00
24	77	m	61+	61	ja	8,33	2,00	6,33
25	74	w	31	20	nein	14,67	3,67	11,00
26	71	w	49	10	nein	11,67	5,67	6,00
27	61	w	13	1	nein	39,67	18,33	21,33
28	71	w	17	8	nein	7,00	2,33	4,67
29	71	m	18+	18	nein	36,00	16,33	19,67
30	46	w	26	10	nein	21,67	8,00	13,67

31	55	w	48+	34	ja	20,67	10,67	10,00
32	77	w	57+	57	ja	29,67	16,67	13,00
33	65	m	57+	57	ja	24,67	13,00	11,67
34	64	m	32	26	nein	16,00	7,00	9,00
35	54	w	19	13	nein	20,33	4,33	16,00
36	77	m	40+	40	ja	24,00	12,67	11,33
37	63	m	40+	40	ja	22,33	8,67	13,67
38	79	m	13	10	nein	26,33	15,00	11,33
39	70	m	37+	4	ja	27,00	11,00	16,00
40	73	w	7	4	nein	39,00	7,33	31,67
41	67	m	30	10	nein	14,33	7,33	7,00
42	72	w	36+	36	ja	3,33	1,00	2,33
43	80	m	36+	36	ja			0,00
44	70	w	24	22	nein	4,00	1,67	2,33
45	81	w	24	17	nein	22,33	10,00	12,33
46	73	m	28+	28	ja	39,33	4,67	34,67
47	82	m	28+	28	ja	24,67	6,67	18,00
48	71	w	27+	27	ja	42,67	26,33	16,33
49	54	m	27+	13	ja	42,33	7,00	35,33
50	83	w	35+	34	ja	16,67	2,67	14,00
51	77	w	16	5	nein	65,67	14,67	51,00
52	49	w	25+	25	ja	40,67	13,00	27,67
53	74	m	6	5	nein	26,00	11,67	14,33
54	66	w	25+	25	ja	36,67	10,33	26,33
55	65	m	25+	24	ja	14,33	6,00	8,33
56	76	m	24+	24	ja	15,00	9,00	6,00
57	46	m	9	6	nein	33,00	14,00	19,00
58	66	w	33	20	nein	27,33	13,67	13,67
59	70	m	25	18	nein	11,67	7,00	4,67
60	61	w	30+	30	ja	16,00	3,33	12,67
61	65	w	30+	30	ja	40,33	6,67	33,67
62	73	m	35+	35	ja	12,33	5,67	6,67
63	79	w	29+	18	ja	52,00	11,00	41,00
64	78	m	1+	1	nein	31,67	9,67	22,00
65	80	w	8	0	nein	26,67	9,67	17,00
66	84	w	20+	20	ja	18,00	14,00	4,00
67	70	w	6	3	nein	36,00	13,00	23,00
68	76	m	9	8	nein	38,33	4,67	33,67
69	38	w	14+	14	ja	62,00	16,67	45,33
70	60	w	22+	22	ja	75,33	20,67	54,67
71	80	m	21+	14	ja	47,67	3,00	44,67
72	81	m	21+	21	ja	24,00	10,67	13,33
73	70	m	9+	9	nein	13,00	3,67	9,33
74	74	m	20+	20	ja	10,00	2,00	8,00
75	76	m	20+	20	ja	21,33	10,67	10,67
76	75	w	20+	20	ja	14,67	3,67	11,00
77	80	w	19+	10	ja	50,67	16,33	34,33

78	75	m	15	2	nein			0,00
79	74	w	3+	3	nein	8,67	4,33	4,33
80	74	w	5+	5	nein	8,33	4,00	4,33
81	48	m	18+	16	ja	16,00	7,33	8,67
82	59	m	0+	0	nein	11,00	7,67	3,33
83	68	w	17+	17	ja	23,33	3,67	19,67

8. Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. Christiane Bruns (aktuell Direktorin der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Tumorchirurgie der Uniklinik Köln) und weiter ihrem Nachfolger Herrn Prof. Dr. med. R. Croner (aktuell Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantchirurgie des Universitätsklinikums Magdeburg) für das Überlassen des Themas und die Schaffung des wissenschaftlichen Rahmens für die Entstehung dieser Arbeit.

Weiter bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Frank Benedix für die Begleitung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Für die Hilfe bei der Auswertung und Anfertigung der histopathologischen Schnitte danke ich dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg. Hier möchte ich besonders die Hilfe durch Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kalinski hervorheben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Felix Popp, der mich über den gesamten Zeitraum der Arbeit hinweg, stets mit Rat und Tat unterstützt und meinen beruflichen Werdegang maßgeblich beeinflusst hat.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie danken, die mich immer unterstützt und inspiriert hat „über den Tellerrand“ zu schauen.

9. Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Retrospektive Evaluation von CD8 als molekularer Marker zur Abschätzung der Lokalisation eines Tumorrezidivs und der Prognose beim Pankreaskarzinom“

in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie mit Unterstützung durch Prof. Dr. Frank Benedix, ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Köln, den 12.05.2023

10. Lebenslauf

Name: Malte Christian Suchan
Geburtsdatum/-ort: 22.11.1989 in Tübingen

Bildungsweg

10/2012 – 12/2016 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
Abschluss: - 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: sehr gut
- 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: sehr gut

09/2010 – 06/2012 Studium der Humanmedizin an der Universität Pécs, Ungarn
Abschluss: - 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum)

06/2009 Constantin-Vanotti-Schule Überlingen; Abschluss: Abitur (Note 2,2)

Berufsweg

Seit 10/2019 Assistenzarzt in der Klinik für Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Uniklinik Köln

10/2017 – 10/2019 Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Tumor- und Transplantationschirurgie der Uniklinik Köln

Praktisches Jahr

06/2016 - 10/2016 Chirurgie, Klinikum der Universität München, Campus Innenstadt

03/2016 - 06/2016 Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

11/2015 - 03/2016 Innere Medizin, Universitätsklinikum Magdeburg

Famulaturen

03/2015	Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
08/2014 - 09/2014	Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, Klinikum Bogenhausen, München
03/2014	Kardiologie - Medizinische Klinik II, Helios Spital Überlingen
08/2013- - 09/2013	Gastroenterologie - Klinik für Innere Medizin, Klinikum rechts der Isar, München
03/2013	Allgemein- und Viszeralchirurgie, Helios Spital Überlingen

Köln, den 12.05.2023