

Aus der Klinik für Allgemein- Viszeral- und Transplantationschirurgie
der medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**FOXP3 als prognostischer Marker beim
chirurgisch therapierten Pankreaskarzinom –
Eine retrospektive Analyse unter Einbeziehung
der Immunhistochemie**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

Vorgelegt von
Maximilian Klippstein
aus Frankfurt am Main
Magdeburg 2018

Bibliographische Beschreibung

Klippstein, Maximilian:

FOXP3 als prognostischer Marker beim chirurgisch therapierten Pankreaskarzinom – Eine retrospektive Analyse unter Einbeziehung der Immunhistochemie.

2018 - 63 Seiten, 111 Literaturangaben, 23 Abbildungen, 11 Tabellen

Kurzreferat:

Ziel der Arbeit war es den Einfluss von Tumor infiltrierenden regulatorischen T-Zellen (Treg) auf die Prognose von Pankreaskarzinompatienten zu überprüfen. Hierfür wurden primär resezierte Pankreaskarzinome immunhistochemisch mit einer Färbung gegen den für Treg spezifischen Transkriptionsfaktor FOXP3 ausgewertet. Ein umfangreiches Follow-up dokumentierte den postoperativen Krankheitsverlauf der untersuchten Patienten.

Für die endgültige Auswertung lagen Daten von 79 Patienten vor. Eine hohe Infiltrationsdichte im invasiven Grenzbereich des Tumors zeigte sich mit einer signifikant häufigeren Lymphknoteninfiltration und schlechteren Differenzierung verbunden. Das Gesamtüberleben der Patienten war signifikant länger, wenn die Fraktion der intratumoral gegenüber den peritumoral lokalisierten Treg niedrig war. Patienten die im weiteren Krankheitsverlauf Lebermetastasen entwickelten wiesen tendenziell eine höhere Treg-Dichte auf als dies bei isolierten Lokalrezidiven der Fall war.

Mit der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der regulatorischen T-Zellen im Tumor mit der Prognose des Pankreaskarzinoms assoziiert ist und diese möglicherweise kausal beeinflusst.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Epidemiologie.....	1
1.2	Stadieneinteilung.....	1
1.3	Therapie.....	3
1.3.1	Operative Behandlungsmöglichkeiten.....	3
1.3.2	Komplikationen (postoperative Morbidität).....	6
1.3.3	Chemotherapie.....	7
1.4	Prognose.....	8
1.5	Pathologie.....	9
1.6	Biomarker der Onkologie.....	11
1.7	Überblick über die Tumorimmunologie.....	11
1.8	Regulatorische T-Zellen (Treg).....	13
1.8.1	Struktur und Interaktion.....	13
1.8.2	Immunregulatorische Funktionen.....	14
1.9	Zielsetzung und Fragestellung.....	16
2	MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1	Patientenkollektiv.....	17
2.2	Probentyp.....	18
2.3	Immunhistochemie.....	19
2.4	Sensitivitätsprüfung (Positivkontrolle).....	20
2.5	Färbeprotokoll.....	20
2.5.1	FOXP3-Antikörper.....	20
2.5.2	Entparaffinierung und Vorbereitung.....	21
2.5.3	Immunhistochemische Färbung.....	21
2.5.4	Gegenfärbung.....	23

2.5.5 Übersicht verwendeter Substanzen	24
2.6 Mikroskopie	24
2.7 Auszählung und Auswertung.....	26
2.8 Statistische Auswertung.....	27
2.8.1 Überlebenszeitanalyse.....	27
2.8.2 Zusammenhänge zwischen Treg Infiltration und klinisch-pathologischen Parametern	28
3 ERGEBNISSE	29
3.1 Patientencharakteristika.....	29
3.1.1 Rezidive	29
3.1.2 Präoperative Daten	29
3.1.3 Operative Daten.....	30
3.1.4 Postoperative Daten.....	32
3.1.5 Pathologie	34
3.2 Treg Infiltration im Pankreaskarzinom.....	37
3.3 Überlebenszeitanalyse bei Blutgefäß-, Lymphgefäß- und Perineuralscheideninfiltration	39
3.4 Überlebenszeitanalyse der Treg Infiltration	41
3.5 Überlebenszeitanalyse der Treg Verteilung	41
3.6 Treg Infiltration und Differenzierungsgrad	42
3.7 Treg Infiltration und Lymphknotenstatus	43
3.8 Treg Infiltration und Primärrezidiv.....	44
3.9 FOXP3-Expression in Pankreaskarzinomzellen.....	45
4 DISKUSSION	48
4.1 Treg Infiltration in Tumoren	48
4.2 Treg Infiltration als Prognosemarker bei Tumorerkrankungen	49

4.3	Verteilung der Treg Infiltration.....	52
4.4	Einfluss auf klinisch-pathologische Eigenschaften.....	53
4.5	Einfluss auf die Lokalisation des ersten Rezidivs.....	54
4.6	FOXP3-Expression in Pankreaskarzinomzellen.....	55
4.7	Operative Daten.....	56
4.8	Methodenkritik.....	57
4.8.1	Datenerhebung.....	57
4.8.2	Immunhistochemische Färbung.....	58
4.8.3	Mikroskopische Auswertung.....	59
4.9	Ausblick: Treg in der Krebsimmuntherapie.....	60
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	63
6	LITERATUR.....	64
7	ANHÄNGE.....	76
7.1	Patientenkollektiv: Übersicht.....	76
7.2	Danksagung.....	78
7.3	Eidesstattliche Erklärung.....	79
7.4	Darstellung des Bildungsweges.....	80

Tabellen

- 1.1 UICC TNM-Klassifikation, 7. Auflage, 2010
- 1.2 UICC Staging und Überlebensrate
- 1.3 Postoperative Pankreasfistel: Einflussfaktoren
- 1.4 Histologische Einteilung des Pankreaskarzinoms
- 1.5 Histopathologisches Grading des duktales Pankreaskarzinoms
- 2.1 Zusammenfassung des Dokumentationsformulars
- 2.2 Übersicht der für die FOXP3-Färbung benötigten Reagenzien.
- 3.1 Übersicht des postoperativen Verlaufs
- 3.2 Lymphknotenstatus Übersicht
- 3.3 UICC-Stadien des Patientenkollektivs
- 3.4 Pn, L, V Status des Patientenkollektivs

Abbildungen

- 1.1 Funktion der regulatorischen T-Zelle
- 2.1 Häufigkeitsverteilung des Patientenalters
- 2.2 Nachweisreaktion des ultraView DAB Detection Kit
- 2.3 Farbreaktion des Chromogens DAB
- 2.4 Gewählte Ausschnitte des Tumorgewebes
- 3.1 Operationsverfahren des Patientenkollektivs
- 3.2 Verteilung der zusätzlich resezierten Organe
- 3.3 Verteilung der postoperativen Komplikationen
- 3.4 Verteilung der eingesetzten Chemotherapeutika
- 3.5 Verteilung der Organmanifestationen des Erstrezidivs
- 3.6 Patient Nr. 41; HE-Färbung eines duktales Pankreaskarzinoms des Pankreaskorpus. Darstellung einer Perineuralscheideninfiltration, Pn1
- 3.7 Repräsentative Beispiele für FOXP3⁺ T-Zell Infiltration
- 3.8 Graphische Darstellung der Treg Anzahl und Verteilung aller 79 Patienten
- 3.9 Überlebenszeitanalyse bei Blutgefäßinfiltration (V)
- 3.10 Überlebenszeitanalyse bei Lymphgefäßinfiltration (L)
- 3.11 Überlebenszeitanalyse bei Perineuralscheideninfiltration (Pn)
- 3.12 Überlebenszeitanalyse zur Treg Inifltration
- 3.13 Überlebenszeitanalyse zur Treg Verteilung
- 3.14 Treg-Infiltration bei gut+mäßig differenziertem (G1+G2) und schlecht differenziertem Pankreaskarzinom (G3)
- 3.15 Treg-Infiltration bei negativem (N0) und positivem Lymphknotenstatus (N1)
- 3.16 Treg Infiltration des Primärtumors bei Erstrezidiv in Form von Lebermetastasten vs. Lokalrezidiv
- 3.17 Überlebenszeitanalyse der FOXP3-Expression in Pankreaskarzinomzellen
- 3.18 Repräsentative Beispiele der FOXP3-Expression in Pankreasgewebe

Abkürzungen

5-FU	5-Fluoruracil
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule
ANOVA	analysis of variance
APZ	antigen präsentierende Zelle
BRCA2	breast cancer 2
CA 19-9	carbohydrate antigen 19-9
CCL22	chemokine ligand 22
CCR4	chemokine receptor 4
CD	cluster of differentiation
CEA	carcinoembryonales antigen
CRM	circumferential resection margin
CT	center of the tumor / Computertomographie
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EBV	Eppstein-Barr-Virus
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERCP	endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
FOLFIRINOX	Folinsäure, 5-Fluoruracil, Irinotecan, Oxaliplatin
FOXP3	forkhead box protein 3
G	Grading
GITR	glucocorticoid-induced TNFR-related protein
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HE	hämatoxylin eosin
HER	human epidermal growth factor receptor
HLA	humane leukocyte antigen
HPF	high power field
HRP	horseradish peroxidase
IHC	Immunhistochemie
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	invasive margin

IPMN	intraduktal papillär muzinöse Neoplasie
ISGPF	international study group of pancreatic fistula
ITS	Intensivstation
KRK	Kolorektalkarzinom
L	Lymphgefäßinvasion
LK	Lymphknoten
LAK	Lymphokin-aktivierte Killer-Zellen
LNR	lymph node ratio
MadCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule 1
MCA	3-Methylcholanthren
MHC	major histocompatibility complex
MRT	Magnetresonanztomographie
nab-Paclitaxel	nanoparticle albumin-bound paclitaxel
NKZ	natürliche Killerzelle
OP	Operation
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PDE3B	Phosphodiesterase 3B
Pn	Perineuralscheideninfiltration
POPF	postoperative Pankreasfistel
PPPD	pylorus preserving pancreaticoduodenectomy
R	residual tumor after treatment
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
TAA	tumorassoziertes Antigen
TGF	transforming growth factor
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TNM-I	tumor nodes metastasis-immune
TZR	T-Zell Rezeptor
UICC	union internationale contre le cancer
V	Blutgefäßinvasion
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Weltweit versterben jährlich über 330.000 Menschen an den Folgen von Karzinomerkrankungen der Bauchspeicheldrüse¹. Verglichen mit anderen malignen Tumorerkrankungen ist das Pankreaskarzinom aktuell die 12. häufigste Krebserkrankung weltweit¹. Dass diese Tumorentität in Industrienationen wie Deutschland bei den krebbedingten Todesursachen sogar an vierter Stelle liegt, spiegelt dessen schlechte Prognose wieder. Bei steigender Inzidenz beträgt das durchschnittliche Risiko in Deutschland an einem Pankreaskarzinom zu erkranken bei beiden Geschlechtern etwa 1,8%. Das durchschnittliche Erkrankungsalter für männliche Patienten liegt bei 71 Jahren, für weibliche Patientinnen bei 75 Jahren². Als wichtigster Risikofaktor wird der Tabakkonsum angesehen. Er ist an der Entwicklung von bis zu 25% aller Pankreaskarzinome beteiligt³. Eine erhöhte Inzidenz des Pankreaskarzinoms wurde auch in Ländern mit geringerer Sonnenexposition gefunden. Der durch verminderte UVB-Strahlung verursachte relative Vitamin D Mangel mit Serumspiegeln unter 30ng/ml wird hierfür ursächlich verantwortlich gemacht⁴. Alkoholkonsum und bestimmte Ernährungsgewohnheiten, gelten als Auslöser für die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis, die wiederum mit einem erhöhtem Risiko der Karzinomentstehung vergesellschaftet ist⁵. Aufgrund der, vor allem auch in Entwicklungsländern, steigenden Lebenserwartung, einer verbesserten bildgebenden Diagnostik und dem vermehrten Tabakkonsum wird das Pankreaskarzinom voraussichtlich weltweit nicht nur an Erkrankungshäufigkeit sondern auch als Todesursache zunehmen⁶. Hochrechnungen zufolge, werden Krebserkrankungen insgesamt und insbesondere auch der maligne Tumor der Bauchspeicheldrüse als Todesursache signifikant ansteigen. So wird davon ausgegangen, dass im Jahre 2030 in den USA diese Karzinomerkrankung nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste Krebstodesursache darstellen wird⁷.

1.2 Stadieneinteilung

Die Ausbreitung einer Pankreaskarzinomerkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wird entsprechend der TNM Klassifikation beurteilt (siehe Tabelle 1.1) und in einer hieraus abgeleiteten Stadieneinteilung eingestuft (siehe Tabelle 1.2). Diese Einteilung des Pankreaskarzinoms nach TNM-Klassifikation

und Tumorstadium wurde von der UICC (union internationale contre le cancer) festgelegt.

Tab.1.1 UICC TNM-Klassifikation, 7. Auflage, 2010

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
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 arteria mesenterica superior
T4	Tumor infiltriert den truncus coeliacus und/oder die arteria mesenterica superior
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
N1a	Metastase in einem einzelnen regionären Lymphknoten
N1b	Metastasen in mehreren regionären Lymphknoten
M	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab.1.2 UICC Staging und Überlebensrate (modifiziert aus Hartwig et al.: pancreatic cancer: current options for diagnosis, staging and therapeutic management⁸)

Stadium	Resektabilität	Mittlere Überlebenszeit, Monate	5-Jahres-Überlebensrate, %
0 (Tis, N0, M0)	resektabel		
IA (T1, N0, M0)	resektabel	24–42	31–39
IB (T2, N0, M0)	resektabel	20–26	22–27
IIA (T3, N0, M0)	resektabel, im fortgeschrittenen Stadium	15–30	16–25

	borderlineresektabel		
IIB (T1–3, N1, M0)	resektabel, im fortgeschrittenen Stadium borderlineresektabel	12–21	8–10
III (T4, jedes N, M0)	borderlineresektabel oder palliativ	11–14	0–7
IV (jedes T, jedes N, M1)	palliativ	5–12	0–4

1.3 Therapie

Abhängig vom Stadium des Tumors wird zwischen kurativer und palliativer Therapiesituation unterschieden. Die kurative Situation beinhaltet immer eine Resektion des Tumors.

Ob nun ein Tumorstadium mit potentiell resektablem Befund vorliegt, wird im Rahmen einer Tumorkonferenz von Experten verschiedener Fachrichtungen entschieden, darunter ein erfahrener Pankreaschirurg. Die Entscheidung wird unter Einbeziehung der UICC Tumorklassifikation getroffen.

Neben der operativen Therapie gehört auch die Chemotherapie zum Behandlungskonzept des Pankreaskarzinoms. Diese wird leitliniengerecht als adjuvante oder palliative Therapie eingesetzt.

Voraussetzung für den Beginn einer Chemotherapie ist immer die histologische Sicherung des Pankreaskarzinoms. Die Operationsindikation kann jedoch allein aufgrund der Bildgebung gestellt werden. Die Indikation zur Einleitung der adjuvanten Chemotherapie erfolgt postoperativ aufgrund einer histopathologischen Untersuchung des Resektates.

1.3.1 Operative Behandlungsmöglichkeiten

Die aktuell einzig kurative Therapie des Pankreaskarzinoms ist die radikale chirurgische Resektion. Gilt das Karzinom als potentiell resektabel sollte daher stets eine primäre Resektion durchgeführt werden⁹.

Seit Ende des neunzehnten Jahrhunderts entwickelte sich das Verfahren der Pankreasresektion stetig weiter. So gelang es Allen Whipple erstmalig 1940 die bis dahin zweizeitige Pankreaskopfresektion in nur einer Operation durchzuführen¹⁰.

Bis die heute überwiegend zur Anwendung kommende pyloruserhaltende Pankreatoduodenektomie erstmals durch Traverso und Longmire publiziert wurde dauerte es bis zum Jahre 1978¹¹. Heute gilt diese Art der Pankreasresektion als ein allgemein etabliertes und sicheres Operationsverfahren.

Dennoch hat die Operation eine im Vergleich zu anderen viszeralchirurgischen Eingriffen eine relativ hohe Mortalität. Wichtigster Einflussfaktor ist die chirurgische Erfahrung des Operateurs. So liegt die Mortalität in spezialisierten Zentren bei unter 6%. Die Kliniken aber, die nicht auf die Resektion von Pankreaskarzinomen spezialisiert sind, weisen hingegen eine Mortalitätsrate von bis zu 20% und darüber auf¹².

Aufgrund der meist spät einsetzenden klinischen Beschwerdesymptomatik, sind zum Diagnosezeitpunkt weniger als 20% aller Patienten mit einem Pankreaskarzinom als resektabel einzustufen¹³. Ursache dieser geringen Resektionsrate ist die bereits erfolgte lokale Tumorausdehnung und die Fernmetastasierung des Tumors.

Obwohl die Resektion von Fernmetastasen, vor allem in Leber und Peritoneum, heutzutage durchaus technisch möglich ist, wird dieser im Ergebnis kein genereller Überlebensvorteil zugeschrieben¹⁴. In Einzelfällen können zwar R0 Resektionen eines metastasierten Pankreaskarzinoms durchgeführt werden, generell empfohlen werden diese metastasenchirurgischen Eingriffe jedoch nicht. Bei Rezidiven nach primärer Pankreasresektion wird eine erneute Resektion zwar diskutiert aber nur in Ausnahmefällen durchgeführt. Ob dadurch ein genereller Überlebensvorteil erzielt werden kann muss in klinischen Studien untersucht werden¹⁵.

Im Falle einer lokal fortgeschrittenen Tumorerkrankung einschließlich Lymphknotenmetastasen, jedoch ohne Fernmetastasierung, sollte eine Resektion gegen ein neoadjuvantes Therapiekonzept abgewogen werden. Letzteres wird derzeit innerhalb von klinischen Studien untersucht. Diese klinisch häufig anzutreffende Situation wird als Borderline-Resektibilität (grenzwertig resektabel) bezeichnet. Entscheidend für die Einstufung zum grenzwertig resektablem Tumor ist seine Beziehung zu umliegenden Gefäßen. Infiltrierte oder ummauerte Venen (V. portae und V. mesenterica superior) gelten als resektabel, solange eine Gefäßrekonstruktion möglich ist.

Als borderline-resektabel wird weiterhin die Infiltration der A. gastroduodenalis definiert, auch bei direktem Kontakt des Tumors zur A. hepatica. Ist der Truncus coeliacus selbst mit einbezogen gilt der Tumor als nicht resektabel. Bei

Infiltration der A. mesenterica superior muss weniger als 180 Grad der Gefäßzirkumferenz in den Tumor miteinbezogen sein, um als borderline-resektabel zu gelten¹⁶.

Eine arterielle Gefäßresektion resultiert allerdings nicht in einer signifikanten Verbesserung des Gesamtüberlebens¹⁷.

Bei einem ausgedehnten Befund ist eine Multiviszeral-resektion eine mögliche Therapieoption. Häufige zusätzlich durchgeführte Verfahren sind die Hemikolektomie, die Nephrektomie und die Adrenalectomie¹⁸. Die postoperative Morbidität steigt in diesen Fällen nicht signifikant im Vergleich zur alleinigen Pankreasresektion.

Grundsätzlich ist das gewählte Operationsverfahren abhängig von der intrapancreatischen Lokalisation des Tumors. Im Kopfbereich stehen die pyloruserhaltende Pankreatoduodenektomie nach Traverso-Longmire (PPPD) und die Partielle Pankreatoduodenektomie nach Kausch-Whipple zur Wahl.

In beiden Fällen werden Pankreaskopf, Duodenum, Gallenblase, Teile des ductus choledochus und regionäre Lymphknoten entfernt. Bei der PPPD wird auf eine zusätzliche Resektion des distalen Magens verzichtet. Beide Operationsverfahren zeigen bezüglich Langzeitüberleben und OP Mortalität vergleichbare Ergebnisse¹⁹.

Bei einer Lokalisation in Korpus und/oder Schwanz wird eine Pankreaslinksresektion durchgeführt. In diesem Operationsverfahren müssen, neben dem betroffenen Pankreasabschnitt, die regionären Lymphknoten mitreseziert werden. Die Splenektomie gehört standardmäßig zur Pankreaslinksresektion dazu.

Im Falle der Tumorlokalisation sowohl in Kopf als auch im Schwanz und/oder Korpus, bleibt als einzig mögliches kuratives Verfahren die totale Pankreatektomie. Obwohl chirurgisch, wie bei der Linksresektion, keine Pankreasanastomose mehr notwendig ist, treten nach totaler Entfernung der Bauchspeicheldrüse häufig postoperative Komplikationen auf.

Die Patienten leiden anschließend unter Blutzuckerentgleisungen, da das gesamte (exokrine und endokrine) Pankreas exstirpiert wurde. Die endokrinen hormonellen Funktionen von Insulin und dessen Gegenspieler Glukagon fallen aus, so dass eine postoperative medikamentöse Substitutionstherapie notwendig wird.

In bestimmten Fällen eines frühen Tumorstadiums ist die laparoskopisch durchgeführte Pankreasresektion möglich, jedoch im Vergleich zu anderen gastrointestinalen Tumorresektionen eher selten. Bei vergleichbarer

Hospitalisierungszeit und Ergebnis bildet sie für erfahrene Chirurgen eine Alternative zur offenen Resektion²⁰.

1.3.2 Komplikationen (postoperative Morbidität)

Trotz stetig sinkender Mortalitätsraten zeigt die Pankreasresektion noch immer hohe Komplikationsraten von bis zu 50%. Zu den häufigsten gehören die Pankreasfistel, eine Magenentleerungsstörung, sowie intraabdominelle Abszesse und postoperative Blutungen¹².

Als größte Herausforderung der Pankreaskopfresektion gilt die operative Anlage einer Pankreasanastomose²¹. Als Komplikation ist die Ausbildung einer Pankreasfistel, einem Austritt von Pankreassekret in das umliegende Gewebe, die Folge. Da dieses Sekret aggressive Verdauungsenzyme beinhaltet, kann es zur Zersetzung (Autodigestion) körpereigener Strukturen und damit verbundenen Entzündungen und intraabdominellen Arrosionsblutungen kommen. Auch bei der Pankreaslinksresektion treten Pankreasfisteln auf. Die Angaben in der Literatur über die Häufigkeit des Auftretens einer Pankreasfistel unterscheiden sich erheblich. Dies lässt sich einerseits durch verschiedene Einflussfaktoren (siehe Tab. 1.3), andererseits durch eine, über lange Zeit, nicht einheitlichen Definition der Pankreasfistel erklären. Als Folge der unterschiedlich gehandhabten Definitionen (insgesamt 26 verschiedene), variierte in der Literatur die Inzidenz von unter 10% bis knapp 30%²². Seit 2005 ist eine Einteilung der Pankreasfistel nach ISGPF (International Study Group for pancreatic surgery) allgemein anerkannt: Zur eindeutigen Diagnosestellung muss die intraoperativ gelegte Pankreasdrainage am 3. postoperativen Tag beurteilt werden. Ein im Vergleich zur Serumamylase dreifach erhöhter Wert im Drainagesekret gilt als Nachweis einer Pankreasfistel. Anhand der klinischen Symptomatik des Patienten werden 3 Grade der Pankreasfistel unterschieden, wobei nur bei Grad C eine Revisionsoperation notwendig ist²³. Generell lassen sich über 90% der Pankreasfisteln konservativ therapieren²⁴.

Tab.1.3 Postoperative Pankreasfistel: Einflussfaktoren (modifiziert aus: *Pancreatic surgery: evolution and current tailored approach*²⁵)

Pankreas	Patient	Eingriff
Weiches Pankreasgewebe	Männliches Geschlecht	Art der Pankreasanastomose

Kleiner Pankreasgang	>70 Lebensjahr	Verwendung von Somatostatin
Pankreaszysten	Dauer des Ikterus	Intraoperativer Blutverlust
Neoplasie in Duodenum, Gallengang oder Ampulle	Cerebrovaskuläre Vorerkrankung	Erfahrung des Chirurgen

1.3.3 Chemotherapie

Der Stellenwert einer postoperativen adjuvanten Chemotherapie ist unbestritten.

Laut den aktuellen Leitlinien zur Behandlung des Pankreaskarzinoms sollte die adjuvante Chemotherapie spätestens 6 Wochen nach Operation beginnen und nach 6 Monaten abgeschlossen werden. Diese wird, sofern es der körperliche Zustand des Patienten zulässt, immer nach einer Resektion empfohlen. Zur allgemeinen Einschätzung des Patienten wird der ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Status angewandt. Dieser bedeutet eine Bewertung der körperlichen Verfassung des Patienten. Ab einem Wert von 3 oder höher wird von einer Chemotherapie abgeraten²⁶.

Als Standardtherapie gilt die Monotherapie mit dem Pyrimidin-Analoga Gemcitabin, alternativ kann 5-Fluoruracil/Folinsäure angewandt werden. Beide zeigen eine gleichwertige Wirksamkeit²⁷. Bei Unverträglichkeit sollte die Therapie mit dem jeweils anderen Präparat fortgesetzt werden.

Einer zusätzlichen Bestrahlungsbehandlung im Sinne einer adjuvanten kombinierten Radiochemotherapie wird aktuell kein Überlebensvorteil zugeschrieben²⁸.

Die präoperative neoadjuvante Chemotherapie kommt bei der Therapie des Pankreaskarzinoms nicht routinemäßig zum Einsatz. Lediglich bei lokal fortgeschrittenen bzw. borderlineresektablen Tumoren kann sie eine Therapieoption, innerhalb von Studien, darstellen. So konnte etwa ein Drittel dieser Patientennach abgeschlossener neoadjuvanter Chemotherapie einen potentiell resektablen Befund aufweisen. Das Langzeitüberleben ist dann vergleichbar mit den Patienten, die primär bereits als resektabel eingestuft wurden²⁹.

In der palliativen Behandlungssituation für das metastasierte Pankreaskarzinom konnten verschiedene Chemotherapien einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zu einer Gemcitabin Monotherapie erzielen³⁰. Hierzu zählen Gemcitabin plus nab-Paclitaxel³¹, sowie FOLFIRINOX³².

Bei nab-Paclitaxel, handelt es sich um ein an ein Albumin gebundenes Paclitaxel (nanoparticle album-bound).

Auch die Kombination aus 5-FU+Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX) konnte in Studien bezüglich der Überlebenszeit verbesserte Ergebnisse erzielen. Da diese Therapie jedoch mit einer deutlich erhöhten Toxizität verbunden ist, kann sie nur für Patienten eines ECOG Status von 0 oder 1 empfohlen werden³².

1.4 Prognose

Derzeit haben Patienten, die an einem duktalem Pankreaskarzinom erkranken noch immer eine sehr schlechte Prognose. Durchschnittlich zeigt das duktales Pankreaskarzinom eine 5-Jahres-Überlebensrate von unter 4% und zählt damit zu den aggressivsten Malignomen des Menschen³³.

Zur Analyse des postoperativen Gesamtüberlebens werteten Cameron et al. 1000 Pankreasresektionen eines einzelnen Chirurgen aus. Nach erfolgreicher Resektion fand sich die 5-Jahres-Überlebensrate insgesamt bei knapp 20%. Waren weitere als positiv anzusehende prognostische Faktoren gegeben, wie ein negativer Lymphknotenstatus und eine R0 Resektion, stieg die 5-Jahres-Überlebensrate auf über 40% an³⁴.

Neben einer potentiell kurativen Resektion hat auch eine postoperative adjuvante Chemotherapie Einfluss auf das Gesamtüberleben bei Pankreaskarzinompatienten. Eine nach sechs Monaten abgeschlossene adjuvante Chemotherapie erhöhte die Lebenserwartung des Patienten im Durchschnitt um 6-10 Monate³⁵.

Neben den klinischen und histopathologischen Eigenschaften wie z. B. das initiale Tumorstadium, ist auch der körperliche Zustand des Patienten Prognose bestimmend. So gilt ein niedriger ECOG-Status als entscheidender Einflussfaktor für ein verlängertes Gesamtüberleben³⁶.

Trotz der noch immer kurzen Lebenserwartung des Patientenkollektives insgesamt nach Diagnosestellung sind Einzelfälle mit einem Langzeitüberleben nach Pankreasresektion von über 20 Jahren bekannt³⁷. Bis heute fehlen aber eindeutige Befunde und/oder biologische Prognoseparameter, die es ermöglichen, diese Patienten innerhalb des Gesamtkollektives vorab zu identifizieren.

1.5 Pathologie

Mit 90% bildet das duktale Adenokarzinom die häufigste histologische Variante aller malignen Pankreastumoren. Es entsteht im exokrinen Anteil der Bauchspeicheldrüse. Weitere Neoplasien und deren prozentuales Auftreten sind in der Tab.1.4 aufgelistet.

Tab.1.4 Histologische Einteilung des Pankreaskarzinoms (modifiziert nach *Diagnostic Histopathology of Tumors, Volume 1*³⁸)

Typ	Häufigkeit (%)
Solide Tumore	
Duktale Adenokarzinome	90
Neuroendokrine Tumore	2
Azinuszellkarzinome	1
Pankreatoblastome	<1
Zystische Tumore	
Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN)	2
Serös zystische Neoplasie	1
Muzinös zystische Neoplasie	1
Andere Zystische Tumore	1
Solide pseudopapilläre Neoplasie	<1
Nicht epitheliale Tumore	Rarität

70% der exokrinen Tumoren bilden sich im Pankreaskopf. Damit sind Korpus und Schwanz verhältnismäßig seltener betroffen. Die anatomische Unterteilung gelingt mit Hilfe angrenzender Gefäße. Die Grenze zwischen Kopf und Korpus bildet die V. mesenterica superior, zwischen Korpus und Schwanz die Aorta.

Die Qualität der Resektion wird anhand der R-Klassifikation eingeteilt. Ein mikroskopisch nicht nachweisbarer Tumor am Absetzungsrand wird als R0 Situation bezeichnet. Den genauen Abstand zwischen Absetzungsrand und Tumor gibt der zirkumferentielle Resektionsrand (CRM: circumferential resection margin) an. Ist dieser 1mm oder kleiner, erreicht den Resektionsrand jedoch nicht, gilt der Tumor als „CRM positiv bzw. R0 narrow“.

Bei einem Abstand von mehr als 1mm wird von einem CRM negativen bzw. „R0 wide“ Zustand gesprochen. Ein großer Abstand zum Absetzungsrand ist mit einer besseren Prognose für den Patienten verbunden³⁹.

Weiterhin werden Venen, Lymphgefäß und Nervenscheideninvasion im Resektat histopathologisch beurteilt, um genauere Aussagen über die Invasivität des Tumors zu treffen. Anhand vorhandenem Differenzierungsgrad, Mitosenanzahl, Muzinproduktion und Kernbeschaffenheit wird das Tumorgading festgelegt. Eine Übersicht der drei Differenzierungsgrade bietet Tab. 1.5.

Tab. 1.5 Histopathologisches Grading des duktaalen Pankreaskarzinoms (modifiziert nach histological typing of tumours of the exocrine pancreas G. Klöppel⁴⁰)

Grading	Differenzierung	Muzin- produktion	Mitosen (pro 10HPF)	Kern- beschaffenheit
1	gut differenziert	Stark	≤5	Leichte Polymorphismen
2	mäßig differenziert	unregelmäßig	6-10	Moderate Polymorphismen
3	schlecht differenziert	Keine	>10	Starke Polymorphismen, Kernvergrößerung

Um den Lymphknotenstatus, verlässlich beurteilen zu können, ist eine Mindestanzahl von 10 resezierten Lymphknoten gefordert. Zeigen sich alle Lymphknoten histologisch tumorfrei, liegt leitliniengerecht ein N0 Status vor. Sobald ein Lymphknoten Tumorgewebe aufweist, handelt es sich, unabhängig von der Anzahl der entnommenen Lymphknoten, um einen N1 Status. In Klammern sollte zusätzlich die Anzahl aller positiven, sowie resezierten Lymphknoten angegeben werden, z.B. N0(0/10).

Des Weiteren kann bei positiver Lymphknoteninvasion die Lymphknotenratio (LNR = Infiltrierte Lymphknoten / insgesamt entfernte Lymphknoten) bestimmt werden. Um diese verlässlich beurteilen zu können, wird wieder eine Mindestanzahl von 10 resezierten Lymphknoten gefordert. Dieser lässt eine genauere Aussage über die Prognose des Patienten zu als der einfache positive Lymphknotenstatus⁴¹. Als prognostisch günstig gilt eine Lymphknotenratio, die 20% nicht übersteigt⁴².

1.6 Biomarker der Onkologie

Die Biomarkers Definition Working Group beschreibt Biomarker als objektiv messbare Moleküle, die Rückschlüsse auf biologische Prozesse zulassen. Neben physiologischen und pathologischen Prozessen, werden auch pharmakologische Reaktionen des Organismus berücksichtigt⁴³. In der Onkologie handelt es sich bei diesem biologischen Prozess um eine Tumorerkrankung.

Verschiedene Typen an Biomarkern finden in der Diagnostik von Krebserkrankungen Anwendung. Abhängig von der Aussage, die der Biomarker liefert, können Tumormarker, Prognosemarker und prädiktive Marker unterschieden werden.

Der klassische Tumormarker, weist je nach seiner Spezifität und Sensibilität (Anteil falsch positiver bzw. falsch negativer Befunde) auf das mögliche Vorhandensein einer Krebserkrankung im Organismus hin und dient in Einzelfällen zur Diagnosesicherung, Überprüfung des Therapieerfolges und des weiteren klinischen Verlaufes⁴⁴.

Ein Prognosemarker erlaubt eine Einschätzung des Krankheitsverlaufes, z.B. hinsichtlich des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens einer Krebserkrankung.

Ein prädiktiver Marker liefert Informationen über einen möglichen Therapieerfolg.

Ein im klinischen Alltag verwendeter prädiktiver Marker ist z. B. die HER2/neu Mutation bei Mammakarzinomen, die mit einem guten Therapieansprechen auf den monoklonalen Antikörper Trastuzumab verbunden ist⁴⁵.

Für das duktales Pankreaskarzinom existieren zurzeit keine eindeutigen Empfehlungen zur Anwendung von Prognose- oder prädiktiven Markern. Dennoch finden Tumormarker im klinischen Alltag ihre Anwendung. Die Antigene CA-19.9 und CEA dienen zur Verlaufskontrolle der Tumorerkrankung, wobei ersteres eine höhere Sensitivität und Spezifität aufweist⁴⁴.

Es existieren vielfältige Hinweise, dass tumorinfiltrierende Immunzellen einen prognostischen und prädiktiven Stellenwert einnehmen. Basierend auf dem heutigen Wissen der Tumorummunologie lässt die immunhistochemische Analyse von tumorinfiltrierenden Immunzellen Rückschlüsse auf die Prognose bestimmter Tumorerkrankungen zu.

1.7 Überblick über die Tumorummunologie

Grundlage der heutigen Tumorummunologie, bildet die im Jahre 1957 publizierte Theorie von Burnley und Thomas. Sie besagt, dass die Tumorentstehung vom

Immunsystem überwacht und verhindert werden kann⁴⁶. 1991 erweiterten Bruggen et al. diese Theorie, indem sie erstmals tumorspezifische Antigene nachwiesen: Das in Melanomen exprimierte Antigen MZ2-E führte zu einer zytotoxischen T-Zell Antwort gegen das Tumorgewebe⁴⁷.

Durch Komplexbildung mit Humanes Leukozyten Antigen (HLA) Molekülen werden diese Antigene direkt auf der Oberfläche von Tumorzellen oder nach deren Phagozytose durch Antigen präsentierende Zellen (APZ) präsentiert. Der Kontakt mit einem T-Zell-Rezeptor (TZR) resultiert in der Aktivierung der T-Lymphozyten. Eine Immunantwort gegen das Tumorgewebe ist die Folge. Heute sind viele verschiedene dieser Tumor assoziierten Antigene (TAA) bekannt, die von Novellino et al. in einer Datenbank zusammengefasst wurden⁴⁸.

Die antitumorale Immunantwort führt langfristig zu einer Veränderung der Immunogenität des Tumorgewebes und dadurch zu einer Ausbreitung der Krebserkrankung. Dieser Prozess läuft in drei Phasen ab und wird unter dem Begriff Immunoediting zusammengefasst⁴⁹:

Die erste Phase, der Eliminierungsphase, besteht aus der eigentlichen Immunosurveillance. Angeborenes sowie erworbenes Immunsystem überwachen die Entstehung von Tumorerkrankungen. Krebszellen werden anhand ihrer tumorspezifischen Antigene erkannt und eliminiert. Gelingt dies nicht vollständig, d.h. können sich einige dieser Tumorzellen der Elimination durch das Immunsystem entziehen, spricht man von Immunevasion. Grund hierfür sind die durch Mutation entstehenden Tumorzellvarianten. Diese mutierten Tumorzellen zeichnen sich durch eine schwache Immunogenität aus. Sie werden in ihrem Wachstum kaum eingeschränkt, während immunogene Tumorzellen durch das Immunsystem eliminiert werden (Immunoselection)⁵⁰.

In Phase zwei, der Gleichgewichtsphase, halten Immunosurveillance und Immunevasion das Gleichgewicht. Der Tumor gewinnt nicht an Größe, wird allerdings auch nicht vollkommen eliminiert. Dieses Gleichgewicht kann bis zu Jahren andauern.

Die letzte Phase wird als Escape-Phase bezeichnet. Einzelne Tumorzellen durchbrechen die immunologische Barriere und breiten sich systemisch aus. Dies gelingt einerseits durch einen nahezu vollständigen Verlust der Immunogenität einiger Tumorzellen, andererseits durch immunsuppressive Mechanismen innerhalb der Mikroumgebung des Tumorgewebes. Einem dieser Mechanismen liegt die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen durch das Tumorgewebe zugrunde, die

durch ihre immunsuppressive Wirkung eine Elimination der Tumorzellen durch das Immunsystem verhindern können.

1.8 Regulatorische T-Zellen (Treg)

1.8.1 Struktur und Interaktion

Ein funktionierendes Immunsystem basiert auf einer Balance zwischen Aggressivität und Toleranz. Gerät diese aus dem Gleichgewicht, kann es zu einer überschießenden Immunreaktion gegen körpereigene Strukturen kommen. Diese fehlende Toleranz, z.B. bei Autoimmunerkrankungen konnte mit einer Verminderung von Abwehrzellen mit hemmenden Eigenschaften in Verbindung gebracht werden. Erstmals wurden diese, als suppressive T-Zellen, im Jahre 1970 beschrieben⁵¹.

Sie stellen eine Subpopulation der CD4⁺T-Helferzellen dar und zeichnen sich durch das Oberflächenantigen CD25⁺ aus. Dieses bildet die α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors⁵².

Weitere typische Strukturen konnten auf der Oberfläche dieser regulatorischen Zellen (Treg) nachgewiesen werden. Zu ihnen gehören glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR)⁵³ und cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA4)⁵⁴. Verantwortlich für die Expression dieser Oberflächenstrukturen ist forkhead box protein 3 (FOXP3).

FOXP3 gilt als entscheidender Transkriptionsfaktor für die Differenzierung in regulatorischer T-Zellen. Es wird angenommen, dass er auf genetischer Ebene die zentrale Schaltstelle für die Funktion von Treg darstellt. So aktiviert oder hemmt er die Expression von schätzungsweise 700 Genen⁵⁵. Durch Bindung von FOXP3 an die Genloki von IL-2 und TNFgamma folgt eine Deacetylierung der Histone. Eine verminderte Expression ist die Folge. Anders bei Genabschnitten die für GITR, CD25 und CTLA-4 codieren. Durch Acetylierung der Histone wird deren Expression hochreguliert⁵⁶.

FOXP3⁺ wird als spezifischer Marker für regulatorische T-Zellen angesehen. Er wird unter anderem immunhistochemisch bestimmt und gilt grundsätzlich als Nachweis von Treg Zellen im untersuchten Gewebe.

Die Differenzierung von regulatorischen T-Lymphozyten findet hauptsächlich im Thymus statt. Notwendig dafür ist neben der Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) durch MHC-Moleküle eine Costimulation des Oberflächenantigens CD28.

Diese erfolgt durch seinen Liganden CD80/86 (B7), der neben APZ auch auf Epithelzellen des Thymus exprimiert wird⁵⁷.

Zelenay et al. beschrieben eine Zellpopulation mit den Oberflächenmarkern FOXP3⁺CD4⁺, jedoch ohne zwangsläufig CD25 zu exprimieren. Diese waren in der Lage sich unabhängig vom Thymus in FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ umzuwandeln. Ein Costimulation des CD28 Oberflächenantigens war für eine Differenzierung nicht notwendig. Somit scheinen sie im peripheren Blutkreislauf ein Reservoir für Treg zu bilden⁵⁸. Während im Thymus gebildete Treg als natürliche Treg bezeichnet werden, werden jene, die in der Peripherie entstehen als adaptive Treg Zellen beschrieben⁵⁹.

1.8.2 Immunregulatorische Funktionen

Regulatorische T-Zellen (Treg) exprimieren im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen hohe Konzentrationen der antiinflammatorischen Zytokine IL-10, TGF- β 1 und IL-35⁶⁰. Auch membrangebundenes TGF- β , konnte in Treg nachgewiesen werden. Dieses übt durch direkten Zellkontakt seine inhibierende Wirkung auf andere Zellen des Immunsystems aus⁶¹. Dieser Zusammenhang konnte explizit zwischen Treg und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) nachgewiesen werden⁶².

Für die die supprimierende Wirkung von Treg scheint die Anwesenheit von IL-2 essentiell zu sein. Durch Bindung an dessen Rezeptor CD25 konnte die Synthese des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 nachgewiesen werden⁶³.

Zusätzlich verfügt CD25 auf Treg über eine deutlich höhere Affinität zu IL-2 als Rezeptoren in der Zellmembran von konventionellen T-Zellen, in denen es die Proliferation aktiviert. Bei moderater IL-2-Konzentration können nahegelegene Treg durch kompetitive Bindung den proliferativen Effekt von IL-2 auf T-Helfer Zellen unterbinden⁶⁴.

APZ tragen den Oberflächenmarker CD80/CD86 (B7) in ihrer Zellmembran. Dieser kann neben CD28 auch CTLA-4 binden. Durch den Kontakt mit B7 und CTLA-4, welches sich wiederum in der Oberfläche von Treg befindet, wird die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) Expression eingeleitet. IDO führt zur Bildung von apoptotischen Metaboliten und dadurch zum induzierten Zelluntergang der APZ⁶⁵. Ebenso konnte in Treg die Expression von Granzym A und Perforin nachgewiesen werden. Durch CD18 (Integrin- β 2) abhängigen Kontakt führen diese zur Lyse der Zielzelle. Angriffspunkte waren CD8⁺, sowie CD4⁺Lymphozyten, CD14⁺ Makrophagen und dendritische Zellen⁶⁶.

Treg besitzen durch ihre Oberflächenmoleküle CD39 und CD73 die Möglichkeit Adenosin zu sezernieren. Ab einer gewissen perizellulären Adenosinkonzentration wird dadurch der Typ1 purinogene Adenosin Rezeptor A2A auf T-Zellen stimuliert. Diese Stimulation hemmt die T-Zell Aktivität⁶⁷.

Abbildung 1.1 zeigt eine Übersicht aller immunologischen Funktionen der regulatorischen T-Zellen.

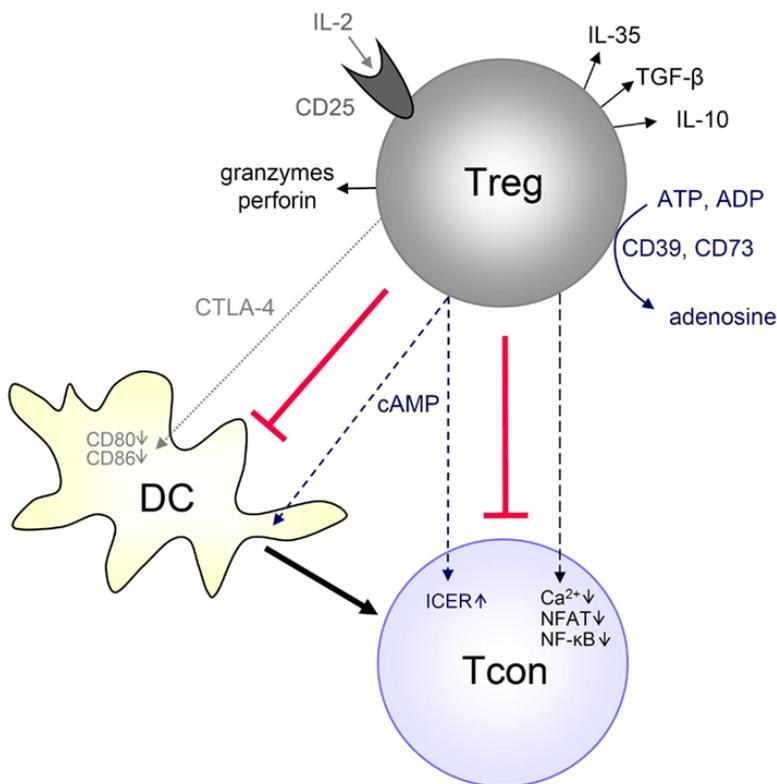


Abb.1.1 Funktion der regulatorischen T-Zelle (Entnommen aus „molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression“⁶⁸) DC = dendritische Zelle, T con = konventionelle T-Zelle

1.9 Zielsetzung und Fragestellung

Das Ziel der Arbeit war, die Infiltration der regulatorischen T-Zellen in duktalem Pankreaskarzinomen nachzuweisen, differenziert zu untersuchen und hinsichtlich möglicher statistischer Aussagen auszuwerten.

Der Nachweis regulatorischer Immunzellen wurde mittels immunhistochemischer Untersuchung an Gewebeschnitten geführt. Gewählt wurde eine Antikörperfärbung gegen den Transkriptionsfaktor FOXP3, einen spezifischen Marker für Treg.

Die Auswertung erfolgte anhand mikroskopischer Analyse.

Um bestehende Publikationen zu diesem Thema zu ergänzen, wurden folgende Fragestellungen formuliert:

Lassen sich in allen Pankreaskarzinomen FOXP3⁺ T-Zellen (regulatorische T-Zellen) nachweisen?

Gibt es eine Korrelation zwischen Anzahl der FOXP3⁺ T-Zellen und postoperativem Gesamtüberleben?

Wie zeigt sich das Verteilungsmuster von FOXP3⁺ T-Zellen im Tumorrandbereich und hat es einen Einfluss auf das Gesamtüberleben?

Inwiefern korreliert die Treg Infiltration mit gängigen Prognoseparametern wie Tumorgrading oder Lymphknotenstatus?

Hat die Treg Infiltration Einfluss auf die Lokalisation des Erstrezidivs?

Gelingt der FOXP3⁺ Nachweis ausschließlich in Immunzellen oder lässt sich die Expression des Transkriptionsfaktors auch in Karzinomzellen nachweisen?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum von 6 Jahren (07.2008 bis 07.2014) wurden 83 Patienten, die an einem exokrinen Pankreaskarzinom erkrankten für die Arbeit untersucht. Alle Patienten wurden am Universitätsklinikum Magdeburg operiert. Um potentielle Patienten für die Arbeit zu finden, wurde das online Archiv des pathologischen Institutes der Uniklinik Magdeburg nach Pankreasresektaten durchsucht. Als Ursache für die Resektion wurden ausschließlich Adenokarzinome des Pankreas herausgefiltert. Neuroendokrine Tumore des Pankreas (pNET) wurden, genau wie Patienten mit Vorläuferläsionen des exokrinen Pankreaskarzinoms (IPMN, PanIN) nicht berücksichtigt. Waren die zu den Resektaten passenden HE-Färbungen ebenfalls im pathologischen Institut archiviert, konnte der Patient für die Arbeit ausgewertet werden.

Der Krankheitsverlauf wurde bis zum 15.12.2015 verfolgt und dokumentiert. Den retrospektiven Krankenverlauf bestehend aus Patientendaten, Diagnostik, Operation, prä- und postoperativer Verlauf, sowie Histologie, wurde in einem eigens für die Arbeit erstellten, 8-seitigen Dokumentationsformular erfasst. Tab. 2.1 zeigt eine Übersicht der dokumentierte Daten. Die Datenerfassung gelang mittels Auswertung der jeweiligen Patientenakten, die im Aktenarchiv der Uniklinik Magdeburg gelagert wurden. Fehlende Daten konnten durch schriftliche Kontaktaufnahme zum Tumorzentrum Magdeburg ergänzt werden. Anschließend wurde der Krankheitsverlauf aller 83 Patienten verfolgt. Diese Datenerhebung erfolgte anhand eines „Follow-Up“ Dokumentationsbogens. Durch schriftliche und telefonische Kontaktaufnahme zu behandelnden Hausärzten und Onkologen wurden Daten bezüglich Überleben und Rezidiven erhoben. Sämtliche Daten wurden in einer Excel-Datei zusammengefasst und anschließend statistisch ausgewertet.

Tab.2.1 Zusammenfassung des Dokumentationsformulars

Patientendaten	Name, Geschlecht, Kontaktdaten, Hausarzt, Onkologe, Aufnahme datum
Diagnostik	Diagnosedatum, Diagnoseart, CEA, CA19-9, Biopsie, Tumorlokalisierung, Staging
Präoperativer Verlauf	Galleableitung, neoadjuvante Chemotherapie
Operation	OP-Datum, OP-Verfahren, Multiviszeralresektion,

	Gefäßrekonstruktion, postoperative ITS Tage
Histologie	TNM-Klassifikation, Grading, Perineuralscheideninfiltration, Lymphgefäßinfiltration, Blutgefäßinfiltration, R-Status, CRM-Klassifikation
Postoperativer Verlauf	Geplante adjuvante Chemotherapie, Komplikationsart, Entlassungsdatum

Patienten, bei denen die Recherche des ausführlichen, retrospektiven Datensatzes bzw. das Follow-Up nicht gelang, fielen trotz vorhandener HE-Schnitte und Tumorblöcke im Nachhinein noch aus den Untersuchungen heraus.

Das Patientenkollektiv bestand aus 45 Männern und 38 Frauen. Das Durchschnittsalter lag beim Operationszeitpunkt bei 67,8 Jahren bei einer Spannweite von 38 bis 84 Jahren. Bei den männlichen Patienten lag das Durchschnittsalter mit 67,4 Jahren 0,8 Jahre unter dem der weiblichen Patientengruppe. Eine graphische Übersicht bietet Abb. 2.1.

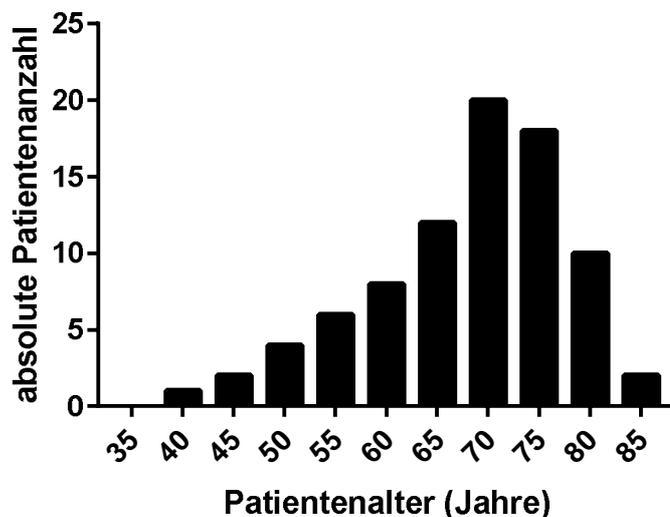


Abb. 2.1 Häufigkeitsverteilung des Patientenalters

2.2 Probenotyp

Es handelte sich um Resektate aus Pankreaskopf, -korpus und -schwanz. Alle Gewebeproben beinhalteten, wie oben bereits beschrieben, Anteile eines exokrinen Pankreaskarzinoms.

Die Aufarbeitung und Bewertung der Resektate erfolgte, wie zur Diagnosesicherung üblich, durch einen Facharzt der Pathologie der

Universitätsklinik Magdeburg. Die Gewebeproben wurden in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin gebettet. Aus jedem Tumor wurden anhand dieser Paraffinblöcke Schnitte erstellt und mit Hämatoxylin-Eosin eingefärbt. Diese wurden im Rahmen der Diagnosesicherung durch einen Pathologen des Uniklinikums Magdeburg beurteilt und ein ausführlicher pathologischer Bericht erstellt. Nach abgeschlossener pathologischer Diagnostik wurde das aufgearbeitete Tumorgewebe im Archiv des pathologischen Institutes des Universitätsklinikums Magdeburg gelagert. Dieses stand für die immunhistochemische Analyse zur Verfügung. Die jeweiligen Tumorblöcke, in denen der maligne Tumor ausgedehnt und eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurden für die weitere Untersuchung gewählt. Von diesen Blöcken wurden mittels Mikrotom (Leica RM 2145) neue 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einem Objektträger fixiert. Diese Rohschnitte waren Ausgangspunkt für die immunhistochemische Untersuchung der Pankreaskarzinome.

Biopsien waren aufgrund der zu geringen Gewebemenge nicht zur Analyse geeignet.

2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistologie gehört zu den zentralen Methoden der heutigen Histopathologie. Sie ermöglicht es Zellbestandteile wie Proteine, Lipide und Kohlenhydrate an Gewebeproben nachzuweisen. Hierbei macht man sich spezifische Molekülabschnitte dieser Strukturen zu Nutze, die Epitope. Bei dem eingesetzten Primärantikörper handelt es sich um einen gegen dieses Epitop gerichteten Antikörper. Monoklonale Antikörper sind, anders als polyklonale Antikörper, ausschließlich gegen ein einzelnes Epitop eines Antigens gerichtet und somit spezifischer in ihrer Bindung.

Es erfolgt eine Antigen-Antikörper-Bindung zwischen dem Antikörper der Zielstruktur des Präparates. Diese Bindung kann mit Hilfe eines Detektionssystems nachgewiesen werden. Grundlage des Detektionssystems sind Chromogene, farblose Stoffe die nach chemischer Reaktion Farbstoffe bilden. Abhängig von der Anzahl der Antigen-Antikörper-Bindung im Präparat, werden entsprechend viele Chromogene umgesetzt. Die Stärke der Farbreaktion korreliert mit der Menge an Antigen-Antikörper-Bindungen.

Der Einsatz der Immunhistochemie spielt bei der Diagnose von Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle. So wird nicht nur die Suche nach

Mikrometastasen und unbekanntem Primärtumoren verbessert, sondern auch genauere Aussagen über die Tumorentität ermöglicht. Der Nachweis von speziellen Oberflächenmarkern kann eine Einschätzung über das biologische Tumorverhalten und der daraus folgenden Therapie zulassen⁶⁹.

2.4 Sensitivitätsprüfung (Positivkontrolle)

Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung, musste die notwendige Sensitivität des angewandten Antikörpers sichergestellt werden. Eine hohe Sensitivität entspricht einer starken Antigen-Antikörper Affinität.

Zur Überprüfung eignet sich Gewebe, welches von Natur aus eine hohe Konzentration an FOXP3 positiven Treg Zellpopulationen enthält. Das gewählte Testgewebe einer Tonsille, färbte sich unter dem verwendeten Antikörper entsprechend stark positiv an.

2.5 Färbeprotokoll

Die immunhistochemische Färbung wurde mit Hilfe des vollautomatisierten Färbesystem Ventana BenchMark ULTRA von der Firma Roche durchgeführt. Jeder histologische Schnitt wird vor Beginn mit einem Barcode bedruckt. Anhand dessen wird das vorher festgelegte Färbeprotokoll abgerufen. Alle verwendeten Reagenzien wurden speziell für die Benutzung der Ventana BenchMark Modelle ULTRA, GX und GT hergestellt. Die einzige Ausnahme bildet der primäre Antikörper. Hierbei handelt es sich um den Anti-FOXP3-Antikörper [236A/E7] (ab20034), einem monoklonalen IgG1 Mausantikörper, der Firma Abcam.

2.5.1 FOXP3-Antikörper

Bei dem verwendete FOXP3-Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Mausantikörper. Dessen Gewinnung gelingt aus Zellreihe eines einzelnen B-Lymphozyten einer Maus. Durch Injektionen eines Antigen in die Maus bilden, wie auch im menschlichen Organismus, die B-Lymphozyten spezifische Antikörper gegen das injizierte Antigen. Diese B-Lymphozyten werden anschließend aus dem Milzgewebe der Maus isoliert und in vitro mit Myelomzellen fusioniert. Es entstehen Hybridomzellen. Hybridomzellen produzieren große Mengen des spezifischen Antikörpers und weisen durch den Verlust der Apoptosefunktion eine deutlich längere Lebensdauer auf. Die Hybridomzelllinie mit der besten Epitop-

Antigen-Bindung wird ausgewählt. Aus ihr wird der Primärantikörper gewonnen, der für die immunhistochemischen Färbung verwendet wird⁷⁰. Da diese Antikörper aus Klonen derselben Zellreihe stammen, handelt es sich um monoklonale Antikörper.

2.5.2 Entparaffinierung und Vorbereitung

Der Ventana BenchMark ULTRA Färbeautomaten bietet die Möglichkeit bis zu 30 Schnitte gleichzeitig zu färben. Im ersten Vorgang müssen die Pankreaskarzinomschnitte vom Paraffin weitestgehend befreit werden. Diese Entparaffinierung wurde bei 72 °C und unter Verwendung von „EZ Prep“ Lösung (Ventana Medical Systems; Bestellnummer: 05279771001) durchgeführt. Die hohen Temperaturen sorgen für eine Verflüssigung des Paraffins, das anschließend mit Hilfe des Detergenten „EZ Prep“ gelöst werden kann.

Das vom Paraffin befreite Gewebe wurde auf 95 °C erhitzt und anschließend mit ULTRA CC1 (Cell conditioner) (Ventana Medical Systems; Bestellnummer: 05424569001), einem Tris-Puffer pH 7.6, für 64 Minuten inkubiert. Dies dient dem Zweck der Antigendemaskierung. Durch die vorherige Fixierung des Präparates in Formalin bildeten sich kovalente Bindungen zwischen den Proteinen des Gewebes. Diese müssen, mit Hilfe von CC1, gespalten werden, um die Antigene für die diagnostischen Antikörper zugänglich zu machen.

2.5.3 Immunhistochemische Färbung

Der FOXP3-Antikörper wird auf die vorbehandelten Objektträger in einer Verdünnung von 1:40 durch den Ventana BenchMark ULTRA aufgetragen. Diese müssen, um eine ausreichende Antigen-Antikörper Bindung zu erreichen, für 32 Minuten bei 37 °C inkubiert werden.

Das anschließend verwendete Detektionssystem, welches dem Präparat seine typische braune Farbe verleiht, war das ultraView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems; Bestellnummer: 05269806001). Dies ist eine von Ventana entwickelte Lösung, bestehend aus einem Peroxidase-Inhibitor, einem HRP Multimer, DAB, Wasserstoffperoxid und einer Kupferlösung. Die Färbereaktion des Detektionssystems ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, werden die im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidasen zuerst mit dem Peroxidase-Inhibitor inaktiviert.

Der HRP Multimer ist ein polyklonaler, sekundärer Antikörper der gegen primäre Maus- und Hase-Antikörper gerichtet ist. Da es sich bei dem primären FOXP3-Antikörper um einen IgG1 Maus-Antikörper handelt, bindet der HRP Multimer an diesen.

Die konstante Region des HRP Multimer ist an zahlreiche Meerrettichperoxidasen (Englisch: horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt. HRP ist ein Enzym, welches das Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) umsetzt. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid oxidiert DAB unter Bildung von Wasser enzymatisch. DAB bildet freie Radikale, die zu einem Komplex mit delokalisierten Elektronenpaaren polymerisieren. Die chemische Reaktion ist in Abb.2.3 detailliert dargestellt.

Diese Eigenschaften aus großen Molekülen mit frei wandernden Elektronenpaaren bilden die Grundvoraussetzungen für einen organischen Farbstoff⁷¹.

Im Falle des DAB zeigt sich diese Reaktion als brauner Farbumschlag.

Zudem enthält das Detektionssystem eine 0,4%ige Kupfersulfatlösung (5g/l). Diese erhöht den Farbkontrast des entstandenen DAB-Polymers⁷². Da der Farbumschlag nicht direkt durch die Antigenbindung ausgelöst wird, sondern durch Bindung am Primärantikörper, handelt es sich um eine indirekte Färbemethode.

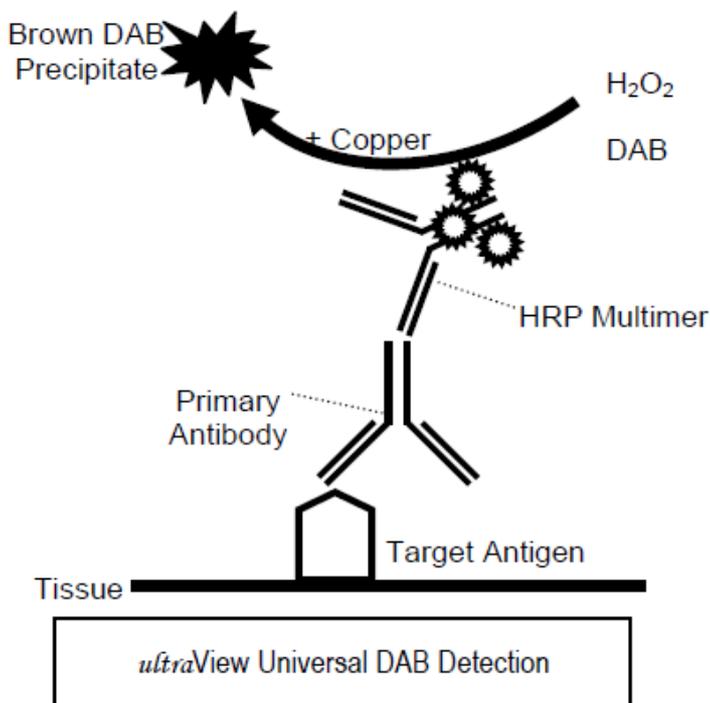


Abb.2.2 Nachweisreaktion des ultraView DAB Detection Kit (entnommen aus ultraView Detection Kit Brochure von Ventana)

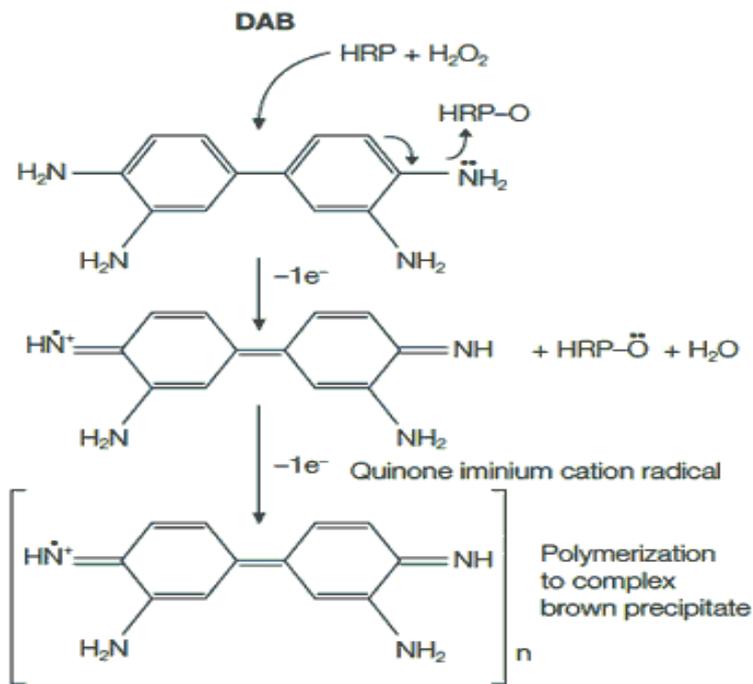


Abb.2.3 Farbreaktion des Chromogens DAB (modifiziert aus Bio-Rad Laboratories Inc., detection methods⁷³)

2.5.4 Gegenfärbung

Die für die blaue Grundfarbe notwendige Gegenfärbung wurde per Hand durchgeführt. Die Schnitte wurden aus dem Ventana BenchMark ULTRA entnommen, 10 Minuten unter fließendem Wasser gespült und anschließend in destilliertes Wasser getaucht. Nach einminütigem Einwirken von Hämalan nach Mayer, wurden die Schnitte erneut 10 Minuten unter Leitungswasser gespült. Bei Hämalan nach Meyer handelt es sich um eine hämatoxylinhaltige Lösung. Die genauen Bestandteile sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Nach Lufttrocknung folgte die Entwässerung der Schnitte unter Anwendung einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%, 90%, 96%) und anschließendem Xylolbad. Im letzten Schritt wurden die Schnitte in Leica CV Mount (Leica Biosystems; Bestellnummer 14046430011) zur Fixierung eingedeckt.

2.5.5 Übersicht verwendeter Substanzen

Tab.2.2 Übersicht der für die FOXP3-Färbung benötigten Reagenzien.

Reagenz	Wirkung	Durchführung
Ventana EZ Prep Concentrate (10X)	Entparaffinierung	Ventana BenchMark ULTRA
Ventana ULTRA Cell Conditioning (ULTRA CC1)	Antigen Demaskierung	Ventana BenchMark ULTRA
Abcam Anti-FOXP3 antibody [236A/E7] (ab20034)	Antigen Bindung	Ventana BenchMark ULTRA
Ventana ultraView Universal DAB Detektionssystem: <ul style="list-style-type: none"> - Peroxidase Inhibitor: 3% H₂O₂ - HRP Multimer: < 50 µg/ml Ziege-Anti-Maus-IgG, Ziege-Anti-Maus-IgM, Ziege-Anti-Kaninchen in Proteinpuffer - DAB Chromogen: 0,2% - H₂O₂: 0,04 % in Phosphatpufferlösung - Copper: 5g/L CuSO₄ 	Nachweis der Antikörper-Antigen Bindung	Ventana BenchMark ULTRA
Hämalaun nach Mayer(1000ml): <ul style="list-style-type: none"> - 800ml destilliertes H₂O - 1g Hämatoxylin - 0,2g NaIO₃ - 50g Kalialaun - 50g Chloralhydrat - 1g Citrat 	Gegenfärbung	manuell
Aufsteigende Alkoholreihe: Ethanol 70%, 90%, 96% Xylol	Entwässerung	manuell
Leica CV Mount	Eindeckung	manuell

2.6 Mikroskopie

Die mikroskopische Auswertung erfolgte unter Verwendung eines Axio Imager 2 Lichtmikroskop mit integrierter AxioCam von Zeiss. Verbunden mit der ebenfalls

von Zeiss entwickelten Software, AxioVision, war es möglich die gewählten Ausschnitte virtuell zu dokumentieren.

Zur Orientierung wurden die immunhistochemischen Schnitte mit den jeweiligen Serienschnitten in Hämatoxylin-Eosin verglichen. Durch Betrachtung des Tumorareals in zwei verschiedenen Färbemethoden konnte ein möglichst aussagekräftiges Hauptgesichtsfeld (Englisch: high power fields = HPF) ausgewählt werden. Die Dokumentation der Schnitte erfolgte verblindet. Während der histologischen Untersuchung lagen keine klinischen Informationen des Patienten vor.

Pro Schnitt wurden 3 HPF bei zwanzigfacher Vergrößerung fotografisch dokumentiert. Da die Kamera nur einen Ausschnitt des eigentlichen Okularfeldes aufnimmt ergibt sich bei zwanzigfacher Vergrößerung eine Gesichtsfeldgröße von 0,15mm². Diese 0,15mm² großen Hauptgesichtsfelder wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

Das HPF befindet sich im invasiven Grenzbereich (engl. invasive margin (IM)). Halama et. al definierten den IM bei der Analyse des Kolorektalkarzinoms als Bereich in dem invasives Tumorstadium auf gesundes Gewebe trifft. Von dieser Grenze reicht er sowohl in den Tumor als auch in das gesunde Gewebe 500µm weit hinein⁷⁴. In der vorliegenden Arbeit wurden die Bildausschnitte innerhalb des IM so gewählt, dass ca. 50% Karzinom und 50% tumorfreies Gewebe darstellt sind. Abbildung 2.4 veranschaulicht den Bereich, in dem die HPF dokumentiert wurden, sowie die Aufteilung eines HPF.

Tumorfreies Gewebe wurde als angrenzendes entzündliches, fibrosiertes oder physiologisches Pankreasgewebe definiert. Tumorhaltiges Gewebe als duktales Adenokarzinom.

Es wurden die Ausschnitte als Hauptgesichtsfelder festgelegt, die die intensivste immunhistochemische Färbung aufwiesen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass Bilder aus jeweils unterschiedlichen Bereichen innerhalb des IM eines Schnittes fotografiert wurden.

Die dokumentierten Ergebnisse wurden unter Mithilfe eines Facharztes der Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg erfasst und ausgewertet.

Tumour regions (CT & IM)



IM (invasive margin)

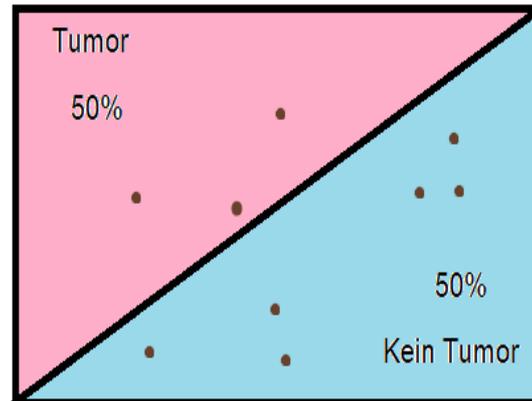


Abb.2.4 Gewählte Ausschnitte des Tumorgewebes

Links: Schematische Darstellung des Tumors; CT = center of the tumor, IM = invasive margin, blauer Bereich = tumorfrei. Der rote Pfeil markiert beispielhaft den Bereich eines HPF (modifiziert aus "Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours"⁷⁵)

Rechts: Schematische Darstellung eines HPF; 3 intratumorale und 6 peritumorale positiv gefärbte Zellen. $3/9 = 33\%$ aller Zellen liegen intratumoral.

2.7 Auszählung und Auswertung

Von allen immunhistochemisch gefärbten Pankreaskarzinomen wurden jeweils 3 digitale Fotos aus dem IM erstellt, die alle einzeln manuell ausgezählt wurden. Anschließend wurde der Mittelwert der 3 Bilder pro Schnitt berechnet. Das erhaltene Resultat lieferte eine Übersicht über die Anzahl der im IM gelegenen regulatorischen T-Zellen.

Da sich in jedem HPF 50% Tumor und 50% tumorfrees Gewebe zeigte, wurde anschließend die Anzahl in beiden Bereichen separat ausgezählt. Der erhaltene Wert der intratumoral gelegenen positiven Zellen wurde durch die Gesamtzahl dividiert. So konnte nicht nur die Anzahl infiltrierender Treg im invasiven Grenzbereich bestimmt werden, sondern auch deren intratumoral gelegener, prozentualer Anteil. Eine Unterscheidung zwischen peritumoraler und intratumoraler Verteilung der positiven Zellen innerhalb des invasiven Grenzbereiches war somit möglich.

Des Weiteren konnte bei einem Teil der Schnitte zusätzlich zu den FOXP3 positiven Immunzellen auch FOXP3-positive Tumorzellen identifiziert werden. Diese wurden, abhängig ob eine Umsetzung des Chromogens in

Pankreaskarzinomzellen zu beobachten war, in eine positive oder negative Expression eingeteilt.

Da das beschriebene Untersuchungsverfahren zu einem gewissen Anteil immer untersucherabhängig ist, sollten die intra- sowie die interobserver Variabilität möglichst gering gehalten werden. Diese beschreibt eine Variabilität der Ergebnisse, die bei der Auswertung zu unterschiedlichen Zeitpunkten des gleichen Untersuchers (intraobserver) bzw. eines anderen Untersuchers (interobserver) auftreten können. Um diese Variabilität zu beschränken wurden die Ergebnisse zweifach zu unterschiedlichen Zeitpunkten ausgewertet. Zusätzlich wertete ein weiterer Doktorand dieselben Ergebnisse parallel aus. Lagen nach diesen Auswertungen uneinheitliche Ergebnisse vor, wurden diese gemeinsam diskutiert.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung, sowie die Erstellung von Graphen erfolgte mit GraphPad Prism 7.0 für Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Die Software bietet statistische Analyse von parametrischen (einfacher und gepaarter t-Test, ANOVA-Varianzanalyse), sowie nicht parametrischen (Mann-Whitney-U-Test, Wilcoxon-Test, Kruskal-Wallis-Test und Friedmann-Test) Stichproben. Des Weiteren wurde die Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier angewandt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Für die Erstellung rein deskriptiver Diagramme wurde Microsoft Excel 2007 verwendet.

Bei einer statistischen Analyse der klinisch-pathologischen Daten wurde das gesamte Patientenkollektiv mit einbezogen ($n=83$). Um den Einfluss der Treg Infiltration zu analysieren konnte nur auf diejenigen Patienten zurückgegriffen werden, bei denen auch eine immunhistochemische Analyse erfolgte ($n=79$).

2.8.1 Überlebenszeitanalyse

Die Patienten wurden anhand ihrer histopathologischen Eigenschaften in zwei Gruppen eingeteilt und anschließend anhand der Kaplan-Meier-Methode verglichen. Patienten die am Ende des Follow-up (15.12.2015) lebten wurden zensiert und mit 0 gekennzeichnet. Bis zu diesem Zeitpunkt verstorbene Patienten wurden nicht zensiert. Patienten die unmittelbar postoperativ ($<7d$) und somit an den Folgen der Operation und nicht des eigentlichen Tumorprogresses

verstarben, wurden nicht in die Überlebenszeitanalyse mit einbezogen. Somit verblieben für die Überlebenszeitanalysen 81 bzw. 77 Patienten.

Nach diesem Prinzip wurde das Überleben der Patienten in Bezug auf diverse Eigenschaften des Tumorgewebes untersucht. Neben histopathologischen Parametern wie Lymphgefäß-, Blutgefäß- und Perineuralscheideninfiltration wurde auch der Einfluss der immunhistochemischen Antikörperfärbung untersucht. Hierbei wurde nicht nur der Einfluss von Anzahl regulatorischer T-Zellen, sondern auch deren Verteilungsmuster, sowie die FOXP3-Expression in Karzinomzellen selbst in Bezug auf das postoperative Gesamtüberleben überprüft.

2.8.2 Zusammenhänge zwischen Treg Infiltration und klinisch-pathologischen Parametern

Um einen Zusammenhang zwischen klinisch-pathologischen Parametern und der Treg Infiltration herzustellen wurde der nicht-parametrische Man-Whitney-U Test angewandt. Dieser vergleicht zwei ungepaarte, nicht normalverteilte Stichproben. Nicht-parametrische Verfahren stellen geringere Anforderungen an die Verteilung der Messwerte in der Grundgesamtheit. So müssen die Daten nicht normalverteilt sein und die Variablen müssen lediglich ordinalskaliert (z.B. N1/N0, viele/wenige Treg) sein. Somit bietet sich der Man-Whitney-U Test auch bei kleinen Stichproben mit vereinzelt Ausreißern, wie in der vorliegenden Arbeit der Fall, ein geeignetes Untersuchungsverfahren.

Um den Lymphknotenstatus beurteilen zu können wurden die Patienten jeweils eine Gruppe mit positiver und negativer Lymphknoteninfiltration eingeteilt. Während die Stichprobengröße der N1-Gruppe unverändert blieb, konnten, abhängig von der Definition unterschiedliche Stichprobengrößen für die N0-Gruppe ermittelt werden: Geht man davon aus, dass für einen validen N0 Status mindestens 10 resezierte Lymphknoten gefordert werden, liegt eine geringere Stichprobengröße vor als bei allen Patienten ohne positiven Lymphknotenbefund. Beide Möglichkeiten wurden auf Signifikanz geprüft.

Beim Differenzierungsgrad wurden geprüft, ob eine schlechte Differenzierung einen signifikanten Unterschied in infiltrierenden Treg aufweist. Diese Stichprobe wurde mit gut und mäßig differenzierten Tumoren verglichen.

Abhängig von der Lokalisation des Erstrezidivs wurden die passenden Patienten erneut in zwei Stichproben eingeteilt: Lebermetastasen und Lokalrezidiv. Das

Patientenkollektiv wurde auf einen Unterschied der Treg Infiltrationsdichte im Primärkarzinom geprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

3.1.1 Rezidive

In der Zeit von OP-Datum bis Ende der Datenerfassung am 15.12.2015 wurde der Patientenverlauf weiter verfolgt. Die Tabelle fasst Überleben und Rezidive aller Patienten zusammen.

Tab.3.1 Übersicht des postoperativen Verlaufs

	Verstorben Anzahl (Prozent)	Überlebt Anzahl (Prozent)	
Rezidiv	41 (49,4%)	10 (12%)	51
Kein Rezidiv	7 (8,4%)	25 (30,1%)	32
	48	35	83

Das postoperative Überleben aller bis zum 15.12.2015 verstorbenen Patienten lag bei durchschnittlich 18,8 Monaten. Lediglich 2 der 83 Patienten verstarben in der ersten Woche postoperativ. Gründe waren ein Myokardinfarkt und eine Sepsis. Am Ende des Follow-up (15.12.2015) zeigten 4 Patienten ein Überleben von über 5 Jahren seit Diagnosedatum. Die 5-Jahres-Überlebensrate des Patientenkollektivs liegt damit bei 4,8%.

3.1.2 Präoperative Daten

Bevor eine Pankreasresektion durchgeführt werden kann, ist eine möglichst sichere Diagnosestellung obligat. Geeignete Verfahren hierfür sind CT, MRT, MRCP und die Endosonographie. Da sonographische Methoden untersucherabhängig sind und Untersuchungen mittels MRT die anatomischen Verhältnisse oft nicht exakt wiedergeben, gilt das CT als Standardverfahren der Pankreaskarzinomdiagnostik. Die ERCP weist Gangveränderungen und damit schlechter Raumforderungen nach, wodurch es zur Diagnosesicherung einen geringeren Stellenwert einnimmt. Alle genannten Verfahren kamen bei dem Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit in unterschiedlicher Kombination zum

Einsatz. Bei 3 der 83 Patienten blieb die Art der Diagnosesicherung ungeklärt. Bei 56 (67,5%) Patienten wurde das CT zur Diagnosesicherung verwendet, wovon es in 24 (28,9%) Fällen mit einem der anderen, oben genannten Verfahren kombiniert wurde. In den restlichen 24 (28,9%) Fällen wurde die Diagnostik ohne Einsatz eines CT durch mindestens eines der anderen Verfahren gesichert.

Unter den anderen Diagnosearten waren die Endosonographie (n=20) und die Bildgebung mittels MRT (n=14) am häufigsten. In 9 Fällen lieferte eine präoperative Biopsie die endgültige Diagnose.

Der Tumormarker CA19-9 wurde in 36 (43,4%) Fällen präoperativ bestimmt. Bei 31 Proben (86%) zeigte er eine Erhöhung über den Referenzbereich von 37 U/ml. Bei präoperativer Cholangitis oder fortgeschrittener Cholestase, wurde eine Gallenableitung mittels Stent bei 36 (43,4%) Patienten durchgeführt. Die durchschnittliche Verweildauer des Stents betrug knapp 27 Tage.

3.1.3 Operative Daten

Mit 63 Mal (75,9%) wurde bei Pankreaskopfresektionen die PPPD mit Abstand am Häufigsten durchgeführt. Die klassische Pankreasresektion nach Kausch-Whipple hingegen wurde nur 8 Mal (9,6%) durchgeführt. Bei Tumoren des Pankreaskorpus und Schwanzes wurde in allen 9 (10,8%) Fällen die Pankreaslinksresektion durchgeführt. In 3 (3,6%) Fällen waren Kopf sowie Korpus oder Schwanz betroffen. Hier war die totale Pankreatektomie das Operationsverfahren der Wahl. Eine Übersicht über alle angewandten Operationsverfahren zeigt Abb. 3.1.

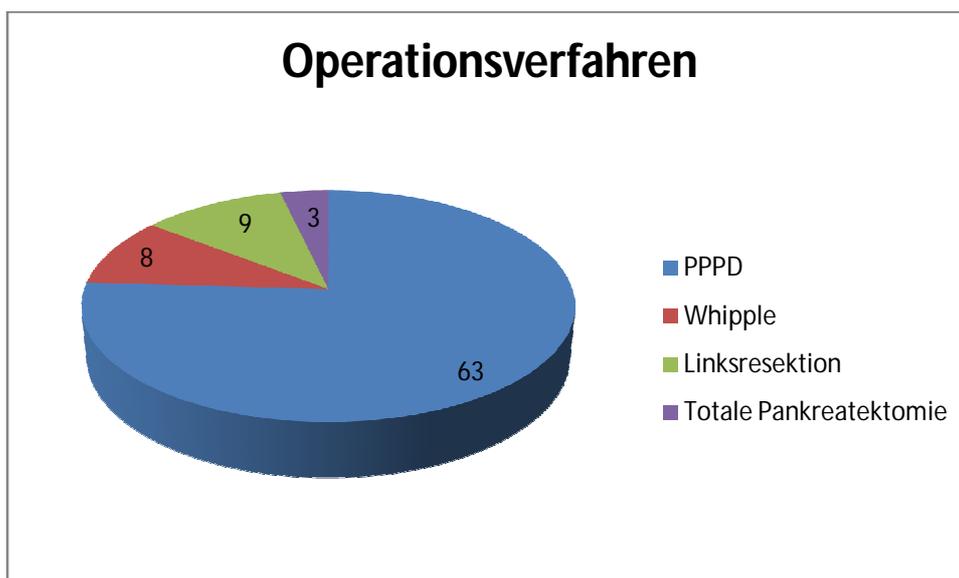


Abb.3.1 Operationsverfahren des Patientenkollektivs

Eine Multiviszeralresektion aufgrund eines ausgedehnten Tumorwachstums war in 12 (14,5%) der 83 Fälle notwendig. Eine Übersicht über die Verteilung der zusätzlich resezierten Organe ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

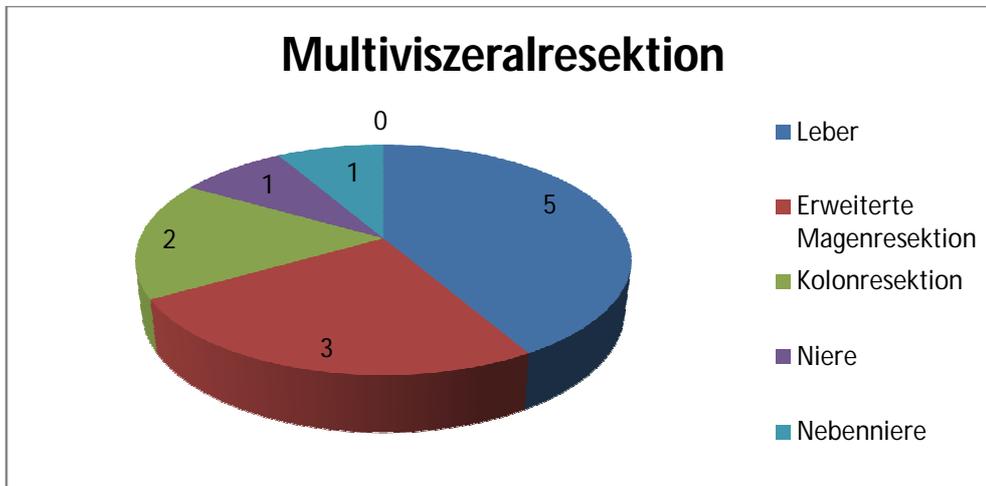


Abb.3.2 Verteilung der zusätzlich resezierten Organe

In 73 Fällen (88%), erwies sich das Pankreaskarzinom als potentiell resektabel. Es lag weder eine Fernmetastasierung noch ein ausgedehnter Lokalbefund vor.

8 Patienten (9,6%) zeigten intraoperativ eine borderline Resektabilität. Hier waren in 5 Fällen venöse, in einem Fall arterielle und in 2 Fällen arterielle sowie venöse Gefäße infiltriert. Die infiltrierten Gefäßabschnitte wurden reseziert und, sofern notwendig, einer Gefäßrekonstruktion unterzogen.

Entgegen aktuellen Forschungsergebnissen, die keine verbesserte Prognose in der Resektion des metastasierten Pankreaskarzinoms sehen, wurde bei Verdacht auf singuläre Lebermetastasen zusätzlich zur Pankreasresektion eine atypische Leberresektion, zur Entfernung möglicher Leberfilae, angeschlossen. Dies erfolgte bei 5 Patienten. Die histopathologische Untersuchung ergab in zwei dieser Fälle eine Pankreaskarzinommetastase. Somit lag definitionsgemäß bei 2 Patienten (2,4%) ein inoperables Stadium vor.

Bei 34 (40,9%) Patienten zeigten sich postoperative Komplikationen. Die Aufteilung der verschiedenen Komplikationen ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Pankreasfistel war mit 13 Fällen (15,7%) die häufigste Komplikation. Eine intraabdominelle Nachblutung wurde anhand eines Hb-Verlustes von mindestens 3 g/dl bzw. 1.86 mmol/l definiert. Diese trat bei 5 Patienten (6%) auf.

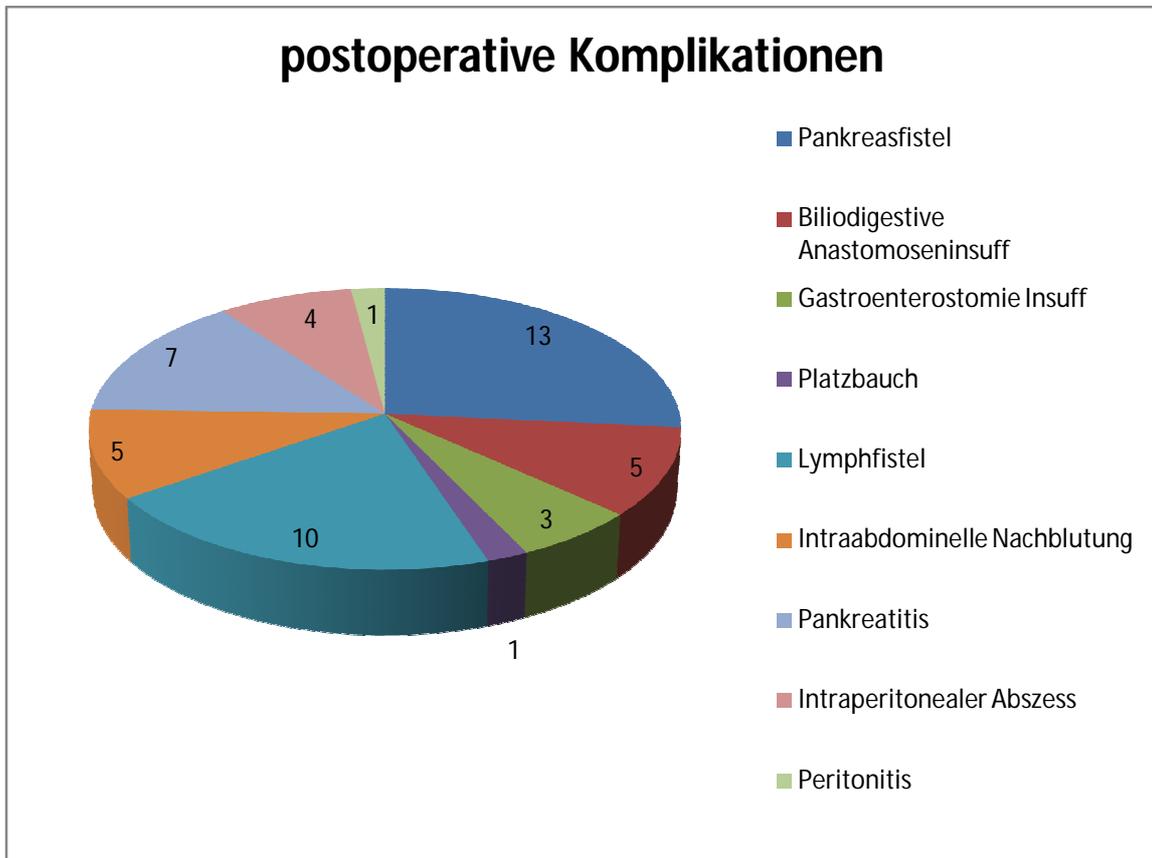


Abb.3.3 Verteilung der postoperativen Komplikationen

Bei 11 Patienten (13,3%) wurde aufgrund der postoperativen Komplikationen mindestens eine Revisionsoperation notwendig. Der häufigste Grund (n=5) war eine Pankreasfistel. Keiner der 83 Patienten verstarb intraoperativ.

3.1.4 Postoperative Daten

Die durchschnittliche postoperative Hospitalisierungszeit des Patientenkollektivs betrug 24 Tage. Davon wurden durchschnittlich 4 Tage auf der chirurgischen Intensivstation verbracht.

Mindestens 51 der 83 Patienten (61,4%) erhielten postoperativ eine adjuvante Chemotherapie. Aufgrund von Metastasenbildung oder Unverträglichkeit erfolgte in 11 Fällen (21,6%) eine Therapieumstellung.

Bestandteil der Erstlinientherapie war in 48 Fällen (94,1%) Gemcitabin. In 35 Fällen wurde es als Monotherapie, in 13 Fällen in Kombination mit Erlotinib oder nab-Paclitaxel verabreicht. 2 Patienten (3,9%) wurden postoperativ zuerst mit FOLFIRINOX therapiert. Der Wirkstoff 5-FU kam als Erstlinientherapie bei keinem der Patienten zum Einsatz. Lediglich nach Therapieumstellung aufgrund von Unverträglichkeiten wurde er 2 Patienten verabreicht. Bei einem Patienten blieb der eingesetzte Wirkstoff zur Erstlinientherapie ungeklärt.

Alle eingesetzten Chemotherapeutika wurden mit ihren Häufigkeiten in Abbildung 3.4 abgebildet. Berücksichtigt wurden neben der Erstlinientherapie auch eingesetzte Wirkstoff nach Therapieumstellung.

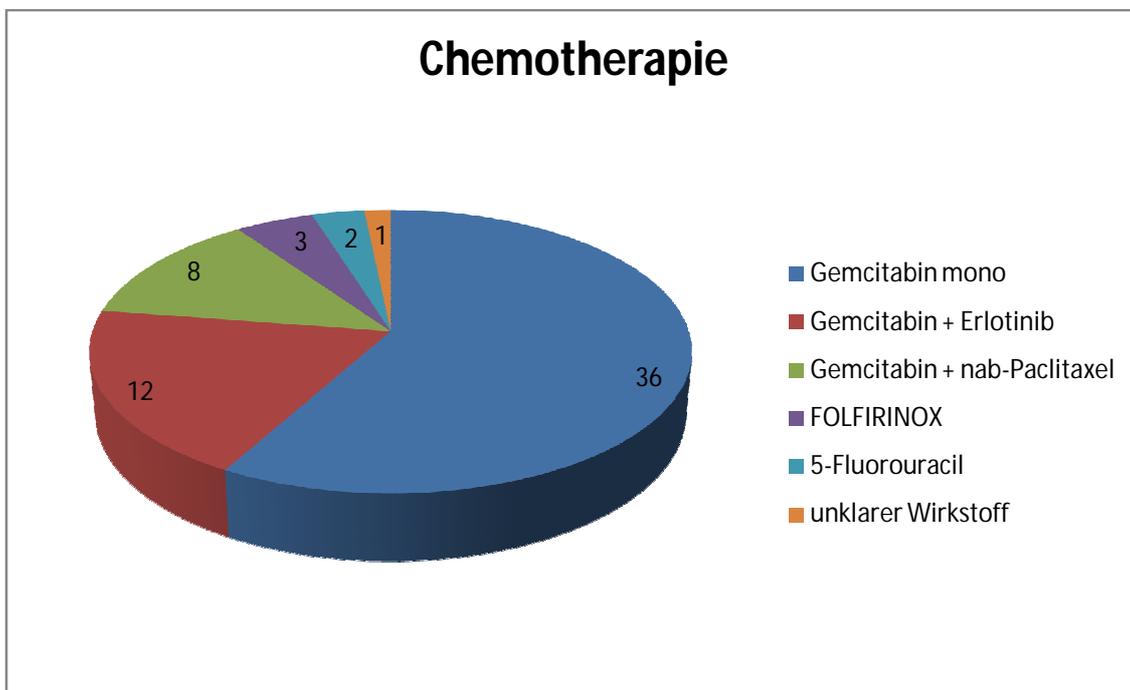


Abb.3.4 Verteilung der eingesetzten Chemotherapeutika

Wie oben bereits erwähnt, erlitten 51 (61,4%) Patienten während der Datenerfassung ein Rezidiv des Pankreaskarzinoms. Bis zur Ausbildung des Erstrezidivs verstrichen durchschnittlich 13,4 Monate. Bis zum Ende der Datenerfassung am 15.12.2015 verstarben 41 (80,4%) dieser Patienten.

Die Verteilung der Organmanifestation des Erstrezidivs wurde graphisch in Abb. 3.5 dargestellt. Seltene Organmanifestationen wie Gehirn- oder Knochenmetastasen wurden unter „sonstige“ zusammengefasst.

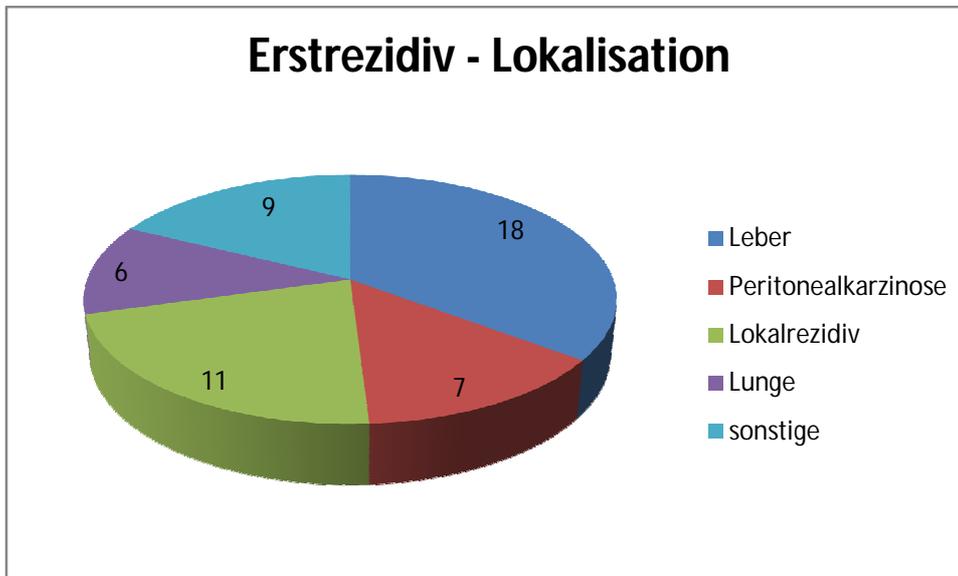


Abb.3.5 Verteilung der Organmanifestationen des Erstrezidivs

Zusätzlich zum Erstrezidiv konnte im weiteren Verlauf bei 11 Patienten (21,6%) ein multilokuläres Auftreten diagnostiziert werden.

3.1.5 Pathologie

Bei allen 83 Patienten erfolgte eine histopathologische Untersuchung des Resektates durch die Pathologie der Uniklinik Magdeburg. Die Informationen der pathologischen Berichte wurden im Rahmen der Dissertation zusammengefasst: Postoperativ lag bei 61 Patienten (73,5%) ein R0 Zustand vor. Da die Bestimmung des Abstandes des Tumors zum Resektionsrand (CRM-Konzept) erst seit 2013 Bestandteil der S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom ist, wurde dieser nur bei 14 der 61 Patienten bestimmt. Ein Abstand von über einem Millimeter (R0 wide) konnte bei 5 Patienten erreicht werden. Bei 9 Patienten reichte der Tumor nicht an den Resektatrand heran, der Abstand betrug allerdings unter einen Millimeter (R0 narrow).

Bei den restlichen 22 Patienten (26,5%) reichte der Tumor an den Resektionsrand heran. Somit lag eine R1 Situation vor. Makroskopisch sichtbare Tumoranteile, eine R2 Situation, lag bei keinem der Patienten vor, da auch intraoperativ diagnostizierte Lebermetastasen reseziert wurden.

Von 83 Patienten zeigte sich bei 48 (57,8%) ein N1 Status. Die Wertigkeit des N-Status korreliert mit der Anzahl intraoperativ resezierter Lymphknoten. So

empfehlen die S3 Leitlinien zum Pankreaskarzinom die Resektion von mindestens 10 regionäre Lymphknoten im Zuge einer Pankreaskarzinomresektion²⁶.

Diese Empfehlung konnte bei 25 (30,1%) der verbleibenden 35 Patienten mit N0 Status eingehalten werden. Bei den restlichen 10 Patienten (12%) wurden weniger als 10 Lymphknoten reseziert.

Um die LNR (lymph node ratio) der Patienten mit positivem Lymphknotenstatus zu bestimmt ist wieder eine Mindestanzahl von 10 resezierten Lymphknoten gefordert. Dies traf bei 36 der 48 Patienten zu. Von diesen zeigte sich bei 22 eine LNR von unter 20% (61,1%). Bei den verbleibenden 14 wurde eine LNR von mindestens 20% errechnet (38,9%, siehe Tabelle 3.2).

Tab.3.2 Lymphknotenstatus Übersicht

	≥10 LK reseziert	<10 LK reseziert	
Kein LK pos.	25 (N0)	10 (N0)	35
Mind. 1 LK pos.	36 (LNR<20% = 22) (LNR≥20% = 14)	12 (LNR unklar)	48 (N1)

Durch Beurteilung des T, N und M-Status der Patienten kann eine Einteilung nach UICC Stadium erfolgen. Neben den bereits erwähnten Fern- und Lymphknotenmetastasierungen ist die lokale Tumorausdehnung für das Tumorstadium entscheidend. 5 Patienten zeigten zum Operationszeitpunkt eine T1, 7 eine T2 und 71 eine T3 Situation. Eine Infiltration des truncus coeliacus oder der arteria mesenterica superior, und damit eine T4 Situation, lag bei keinem der Patienten vor. Anhand dieser Informationen wurde die Einteilung in das UICC-Stadium vorgenommen, deren Anzahl und prozentuale Verteilung in der Tabelle 3.3 zusammengefasst wurden.

Tab.3.3 UICC-Stadien des Patientenkollektivs

IA	4 (4,8%)
IB	6 (7,2%)
IIA	25 (30,1%)
IIB	46 (55,4%)
III	0 (0%)
IV	2 (2,4%)

Weiterhin prognostisch relevant ist der histopathologische Nachweis der Infiltration von Nerven, Lymph- und Blutgefäßen. In den meisten der 83 Präparate wurde der Pn, L und V Status des Pankreaskarzinoms durch einen Pathologen der Uniklinik Magdeburg bestimmt. Ein Beispiel für eine Perineuralscheideninfiltration ist in Abb.3.6 dargestellt. Weitere Details sind in der Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tab.3.4 Pn, L, V Status des Patientenkollektivs

	negativ, Anzahl (%)	positiv, Anzahl (%)	Gesamtanzahl
Perineural (Pn)	7 (8,6%)	74 (91,4%)	81
Lymphgefäß (L)	21 (29,2%)	51 (70,8%)	72
Gefäß (V)	55 (78,6%)	15 (21,4%)	70

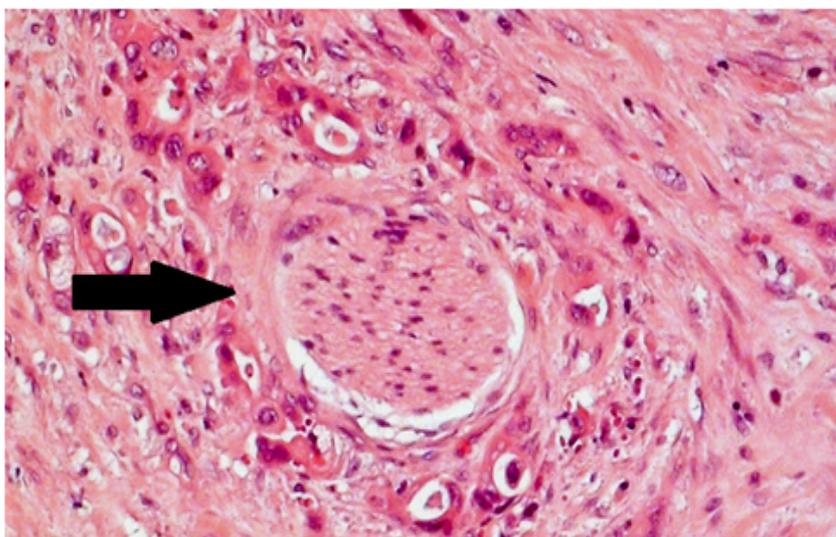


Abb.3.6 Patient Nr. 41; HE-Färbung eines duktales Pankreaskarzinoms des Pankreaskorpus. Darstellung einer Perineuralscheideninfiltration, Pn1.

Der Pfeil zeigt auf den infiltrierten Nerv. Weitere Informationen über die den Abbildungen zugehörigen Patienten sind im Anhang unter 7.1 Patientenkollektiv: Übersicht aufgeführt.

Neben dem Tumorstadium gehört auch das Grading zu den Prognose bestimmenden Tumoreigenschaften.

Nach UICC werden 3 Grade beim Pankreaskarzinom unterschieden. Ein unklarer Differenzierungsgrad, GX, lag bei 2 der 83 Patienten (2,4%) vor. Unter den verbleibenden 81 Patienten zeigten sich 11 Tumore (13,3%) gut G1, 49 (59%) mäßig G2 und 21 (25,3%) schlecht G3 differenziert.

3.2 Treg Infiltration im Pankreaskarzinom

Der immunhistochemische Nachweis mit FOXP3-Antikörpern wurde an 79 der 83 Patienten durchgeführt. Aufgrund mangelnder Gewebeprobe­menge, konnte keine Färbung bzw. Auswertung bei 4 Tumoren stattfinden. In allen 79 gefärbten Gewebep­roben ließen sich FOXP3⁺ Immunzellen mikroskopisch nachweisen. Bei einer Spannweite von 1-102 positiv gefärbten Zellen pro HPF, waren deutliche Unterschiede in der Treg Infiltration zu erkennen. Repräsentative Beispiele sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

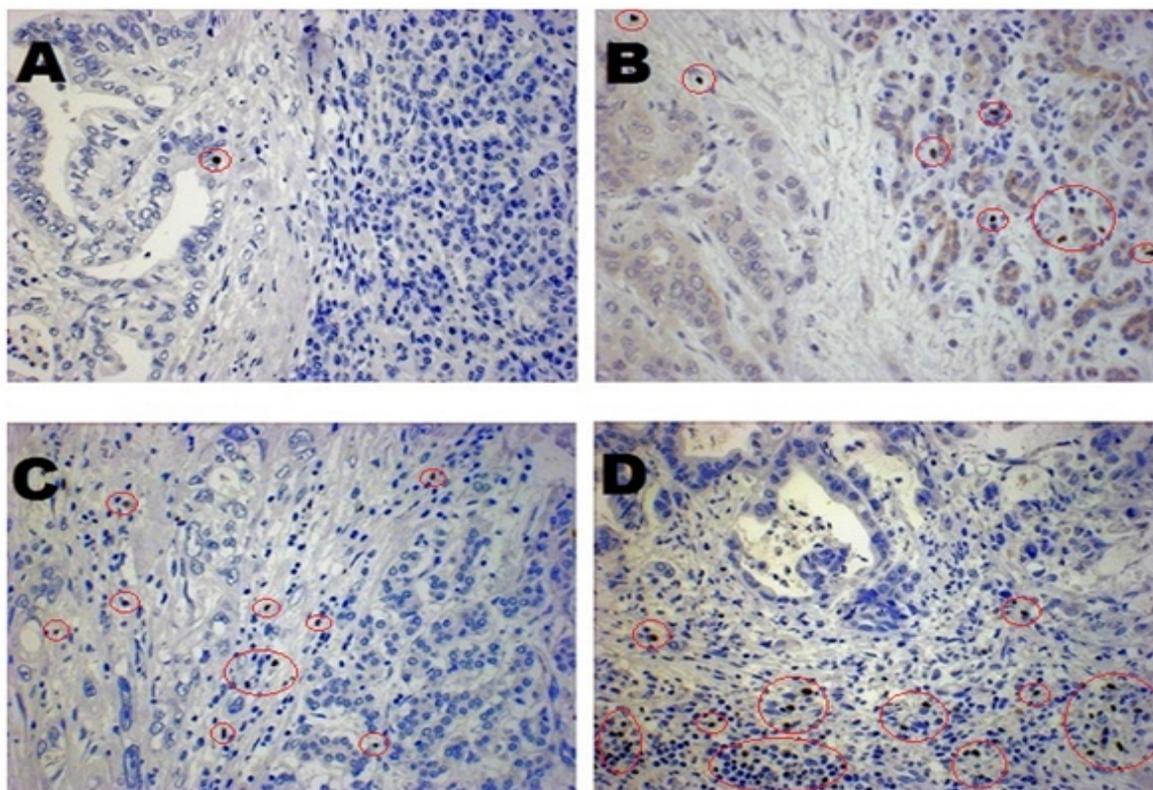


Abb.3.7 Repräsentative Beispiele für FOXP3⁺ T-Zell Infiltration

Immunhistochemische FOXP3 Färbung von duk­talen Pankreaskarzinomen. Bei allen 79 Patienten konnten regulatorische T-Zellen mit unterschiedlicher Intensität und Verteilung nachgewiesen werden. Weitere Informationen über die den Abbildungen zugehörigen Patienten sind im Anhang unter 7.1 Patientenkollektiv: Übersicht aufgeführt.

Bild A (Patient Nr. 45, HPF Nr. 2), B (Patient Nr. 29, HPF Nr. 1) und C (Patient Nr. 32, HPF Nr. 3) zeigen das Karzinomgewebe in der linken Bildhälfte. Bild D (Patient Nr. 47, HPF Nr. 1) in der oberen Bildhälfte. Positiv gefärbte Immunzellen wurden rot eingekreist. Eine geringe Infiltrationsdichte ist in Bild A zu erkennen. Bild B und C zeigen mäßig viele und Bild D viele infiltrierende Treg.

Auch beim Verteilungsmuster der Zellen sind Unterschiede erkennbar: In Bild C ist die Mehrzahl der regulatorischen T-Zellen in der intratumoralen Bildhälfte zu finden. In B und D hingegen überwiegen die peritumoral gelegenen Zellen.

Jedes Gesichtsfeld des invasiven Tumorrandes beinhaltete tumorfreies und eigentliches Tumorgewebe (siehe Abb. 3.7). So gelang es, die Verteilung der Treg innerhalb des invasiven Grenzbereiches weiter zu unterteilen:

Abhängig von der Anzahl positiv gefärbter Zellen, die tatsächlich innerhalb der Tumorthälfte lag, konnte ein peritumorales und ein intratumorales Verteilungsmuster unterschieden werden. Hierbei wurde sich an einer Publikation über Magenkarzinome von Mizukami et al. orientiert⁷⁶. Dort lag ein intratumorales Verteilungsmuster vor sobald das Verhältnis regulatorischer T-Zellen von 1:5 (innerhalb zu außerhalb des Tumors) erreicht wurde. Diese Grenze wurde gewählt, da intratumorale Treg generell deutlich seltener zu finden waren als peritumoral gelegene. Bezogen wurde sich nur auf das Verhältnis der Zellen und nicht auf deren absolute Anzahl.

Wie in Abb. 3.8 und der Tabelle „Patientenkollektiv: Übersicht“ im Anhang, zu erkennen ist, liegt auch in der vorliegenden Arbeit die Mehrheit aller regulatorischen T-Zellen nicht innerhalb des eigentlichen Tumorgewebes sondern im tumorfreien Bereich der HPF. Analog zu Mizukami et al. wurde auch hier nicht 50% sondern 1/3 als Grenze zwischen intratumoraler und peritumoraler Verteilung gewählt:

Von den ausgewerteten 79 Pankreaskarzinomen, waren bei 49 Patienten (62%) mindestens 1/3 der Zellen innerhalb des Tumorgewebes gelegen. Hier lag folglich ein intratumorales Verteilungsmuster vor. In den verbleibenden 30 Karzinomen (38%) konnten weniger als 1/3 der Treg innerhalb des Tumors gefunden werden. Somit lag bei ihnen ein peritumorales Verteilungsmuster vor.

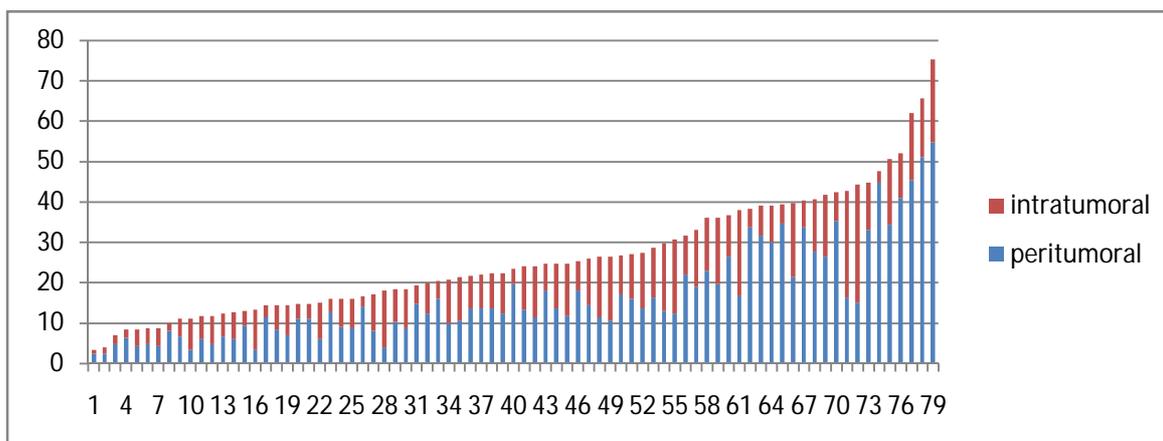


Abb.3.8 Graphische Darstellung der Treg Anzahl und Verteilung aller 79 Patienten.

X-Achse: Patienten

Y-Achse: Gesamtanzahl Treg, gemittelt aus 3 HPF

3.3 Überlebenszeitanalyse bei Blutgefäß-, Lymphgefäß- und Perineuralscheideninfiltration

Um den prognostischen Einfluss der histologischen Parameter V,L und Pn des Patientenkollektivs zu überprüfen, wurde drei separate Überlebensanalysen durchgeführt. Diese Analysen waren unabhängig von der immunhistochemischen Auswertung und sollten lediglich den Einfluss der histopathologischen Parameter demonstrieren.

Da nicht bei allen Tumorpräparaten eine eindeutige Diagnose auf alle drei histopathologischen Parameter gestellt wurde, variierte die Stichprobengröße bei den drei Überlebensanalysen. Die Größe der einzelnen Stichproben orientiert sich an Tab.3.4. Zusätzlich wurden zwei Patienten, die in der ersten Woche postoperativ verstarben aus der Stichprobe ausgeschlossen und in der Analyse nicht berücksichtigt. Das Patientenkollektiv mit einem negativen Infiltrationsstatus zeigte sich bei allen Parametern mit einem längeren Gesamtüberleben verbunden. Bei Blut- ($p=0,0021$) und Lymphgefäßinfiltration ($p=0,0318$) war ein signifikantes Ergebnis zu beobachten. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven der drei histopathologischen Parameter sind in Abb. 3.9, 3.10 und 3.11 graphisch dargestellt.

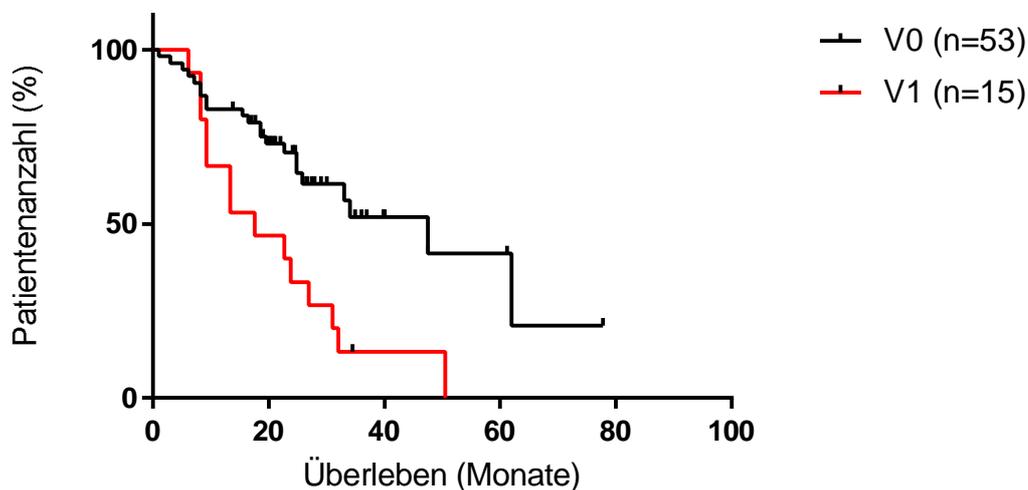


Abb. 3.9 Überlebenszeitanalyse bei Blutgefäßinfiltration (V)

Kaplan-Meier-Analyse von Patienten mit negativer (medianes Überleben = 47,5M) und positiver (medianes Überleben = 17,6M) Blutgefäßinfiltration.

Signifikant bei p -Wert 0,0021

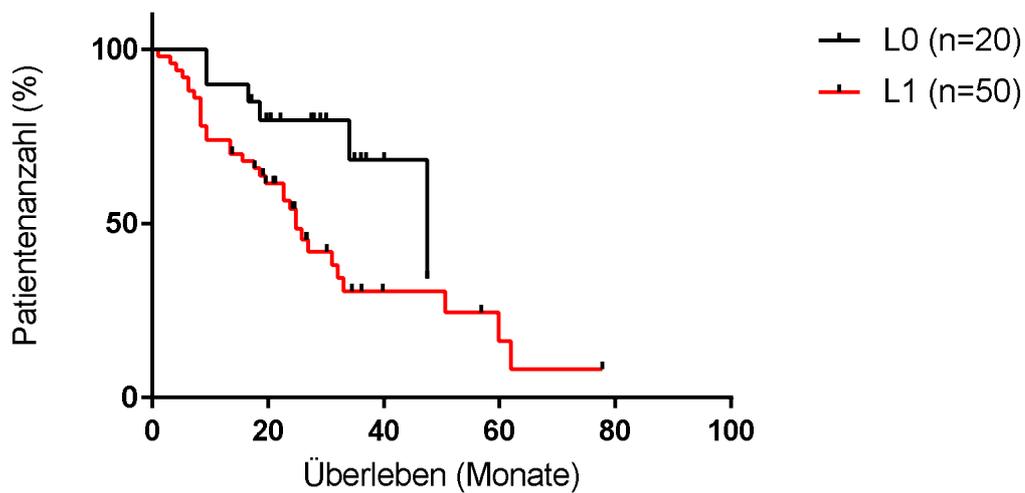


Abb.3.10 Überlebenszeitanalyse bei Lymphgefäßinfiltration (L)

Kaplan-Meier-Analyse von Patienten mit negativer (medianes Überleben = 47,5M) und positiver (medianes Überleben = 24,8M) Lymphgefäßinfiltration.

Signifikant bei p-Wert 0,0318

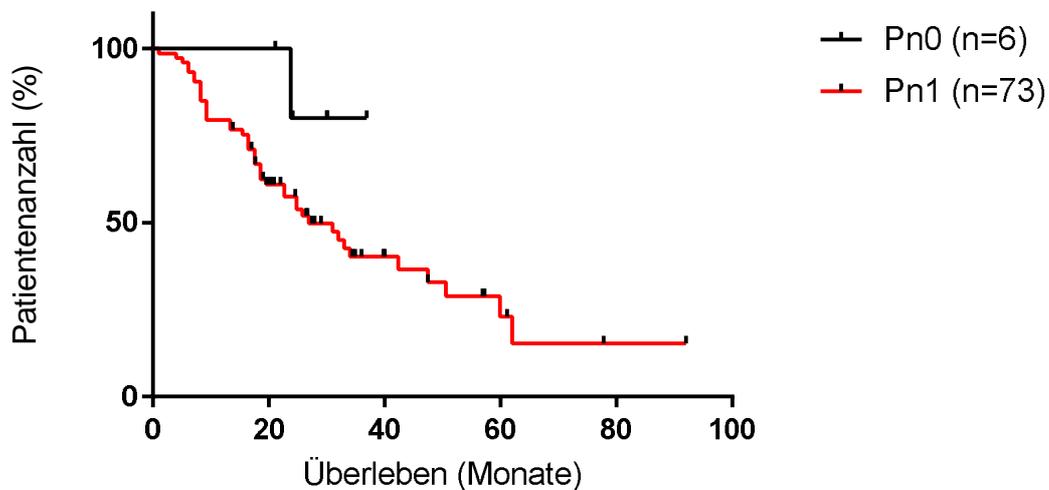


Abb. 3.11 Überlebenszeitanalyse bei Perineuralscheideninfiltration (Pn)

Kaplan-Meier-Analyse von Patienten mit negativer (aufgrund geringer Stichprobengröße keine genaue Aussage zum medianen Überleben möglich) und positiver (medianes Überleben = 26,9M) Perineuralscheideninfiltration.

Nicht signifikant p-Wert 0,147

3.4 Überlebenszeitanalyse der Treg Infiltration

Zur Beurteilung des Einflusses der Treg Infiltration auf das Gesamtüberleben aller Patienten mit erfolgter immunhistochemischer Analyse (n=79) wurde eine Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. Auch hier wurden zwei Patienten aufgrund ihres unmittelbaren, postoperativen Versterbens ausgeschlossen.

Abhängig vom Median (24) aller infiltrierender Treg wurden die 77 Patienten in 2 Gruppen eingeteilt: Patienten mit durchschnittlich mehr Treg als der Median wurden in die „Treg hoch“ Gruppe eingeteilt. Um in die „Treg niedrig“ Gruppe eingeteilt zu werden durfte der Median nicht überschritten werden.

Die Gruppe mit einer niedrigen Treg Infiltration zeigte mit durchschnittlich 32 Monaten jedoch kein signifikant längeres Gesamtüberleben, bei einem p-Wert von 0,336. Das mediane Gesamtüberleben der „Treg hoch“ Patientengruppe lag mit 23,8 Monaten nur 8,2 Monate darunter. Abb. 3.12 zeigte die entsprechende Kaplan-Meier-Überlebenskurve.

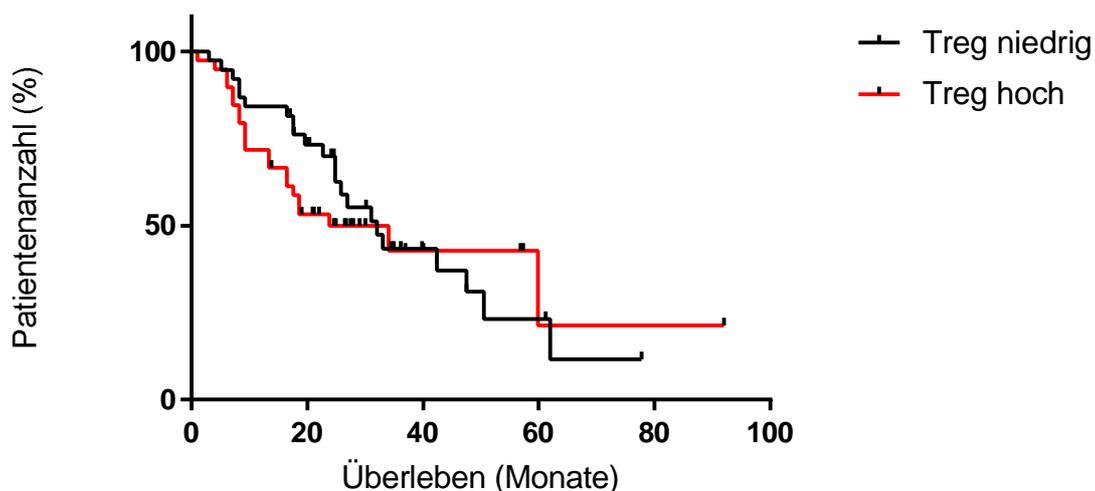


Abb.3.12 Überlebenszeitanalyse zur Treg Infiltration

Kaplan-Meier-Analyse der Treg Infiltrationsdichte. Bei einem p-Wert von 0,336 ergab sich jedoch kein signifikant längeres Überleben bei hoher Infiltrationsdichte.

3.5 Überlebenszeitanalyse der Treg Verteilung

Auch bei der Analyse der prozentualen Verteilung der Treg innerhalb der invasiven Grenzzone wurde dasselbe Patientenkollektiv in 2 Gruppen eingeteilt: ein peritumorales (<1/3 aller Zellen intratumoral gelegen; n=30) und ein intratumorales ($\geq 1/3$ aller Zellen intratumoral gelegen; n=47) Verteilungsmuster.

Bei einem p-Wert von 0,048 zeigte die Patientengruppe mit einem intratumoralen Verteilungsmuster ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben. Dieses lag, wie Abb. 3.13 zeigt, mit 24,8 Monaten im Median deutlich unter der Patientengruppe mit peritumoraler Verteilung (59,9 Monate).

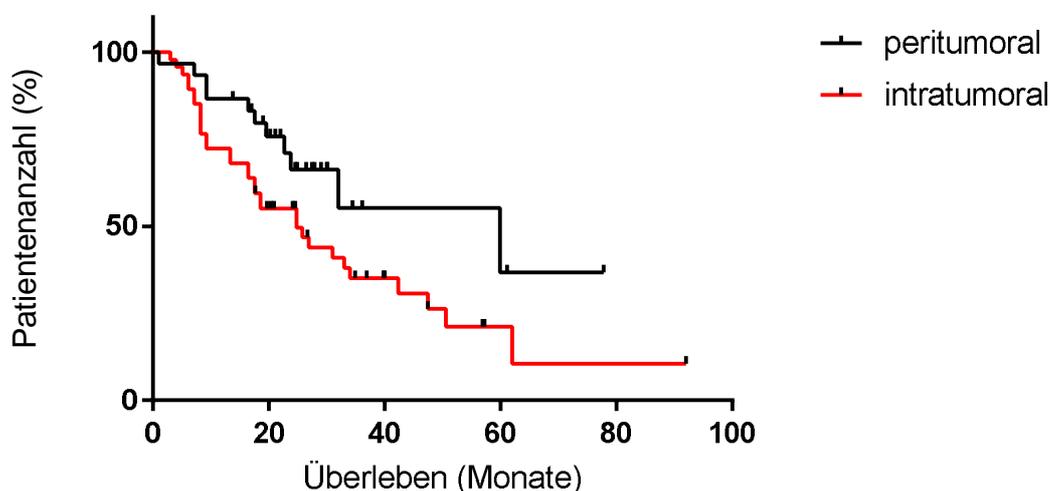


Abb.3.13 Überlebenszeitanalyse zur Treg Verteilung

Kaplan-Meier-Analyse der Treg Verteilung. Bei einem p-Wert von 0,048 zeigten Patienten mit einem peritumoralen Verteilungsmuster ein knapp signifikant längeres Gesamtüberleben.

3.6 Treg Infiltration und Differenzierungsgrad

Um die Treg Infiltration bezüglich Differenzierungsgrad des Tumors zu untersuchen wurden die 79 Patienten in 2 Gruppen eingeteilt und ein Mann-Whitney-U Test durchgeführt.

Gut und mäßig differenzierte Tumore (n=59) wurden mit schlecht differenzierten (n=19) verglichen. Bei einem der 79 Patienten konnte der Differenzierungsgrad nicht bestimmt werden (GX). Dieser wurde in der Analyse nicht berücksichtigt. Somit ergibt sich eine Stichprobengröße von n=78, deren Verteilung in Abbildung 3.14 dargestellt ist.

Die Anzahl infiltrierender Treg Zellen war signifikant höher bei schlecht differenzierten Pankreaskarzinomen (28,67/HPF gegenüber 20,67/HPF, p=0,01).

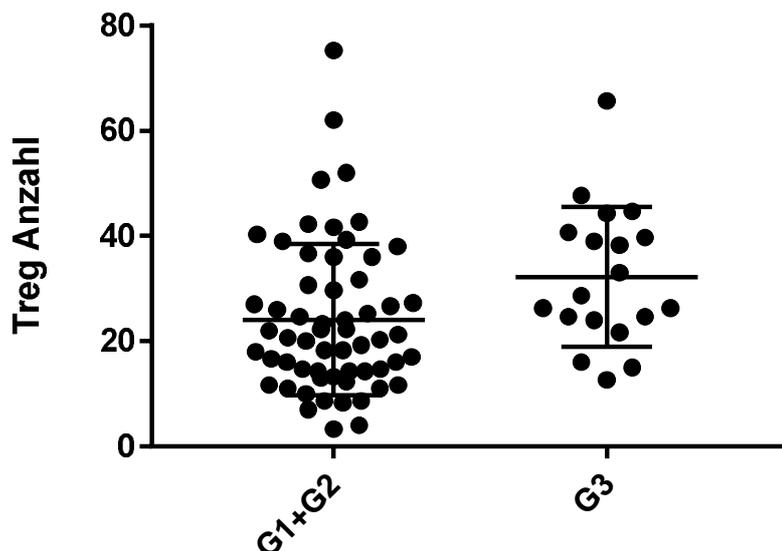


Abb. 3.14 Treg-Infiltration bei gut+mäßig differenziertem (G1+G2) und schlecht differenziertem Pankreaskarzinom (G3)

Es zeigte sich eine signifikant höhere Treg Dichte bei schlecht differenzierten Pankreaskarzinomen (G3); $p=0,01$

3.7 Treg Infiltration und Lymphknotenstatus

Für die Analyse der Treg Infiltration der Pankreaskarzinome hinsichtlich ihres Lymphknotenstatus wurden die Ergebnisse aus Tab.3.2 mit einbezogen. Da nur bei 79 Patienten eine immunhistochemische Analyse erfolgte, ergab sich eine Stichprobengröße von N1(n=46), N0 \geq 10(n=24) und N0<10(n=9).

Als N0 wurden alle Patienten eingestuft, die mindestens 10 resezierte, tumorfreie Lymphknoten vorzuweisen hatten. Der N1 Status war unabhängig von der Anzahl der resezierten Lymphknoten. Die verbleibenden 9 Patienten, bei denen kein positiver LK nachgewiesen wurde, aber weniger als 10 LK reseziert wurden, wurden hier nicht berücksichtigt.

Bei einem p-Wert von 0,060 war keine Signifikanz zu erkennen. Die Anzahl infiltrierender Treg lag bei positiver Lymphknoteninfiltration mit 25,67/HPF höher als bei denen mit negativem Lymphknotenstatus (19,5/HPF).

Untersucht man alle Patienten mit negativen Lymphknoten, unabhängig von deren Anzahl an intraoperativ entfernten Lymphknoten (N0 \geq 10+ N0<10), erhöht sich die Größe der N0-Stichprobe von 24 auf 33. Die Anzahl der Patienten mit positivem LK-Status bleibt unverändert. Mit größerer Stichprobe zeigt sich bei einem p-Wert von 0,048 eine signifikant stärkere Treg Infiltration bei positivem Lymphknotenstatus. Beide Analysen sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

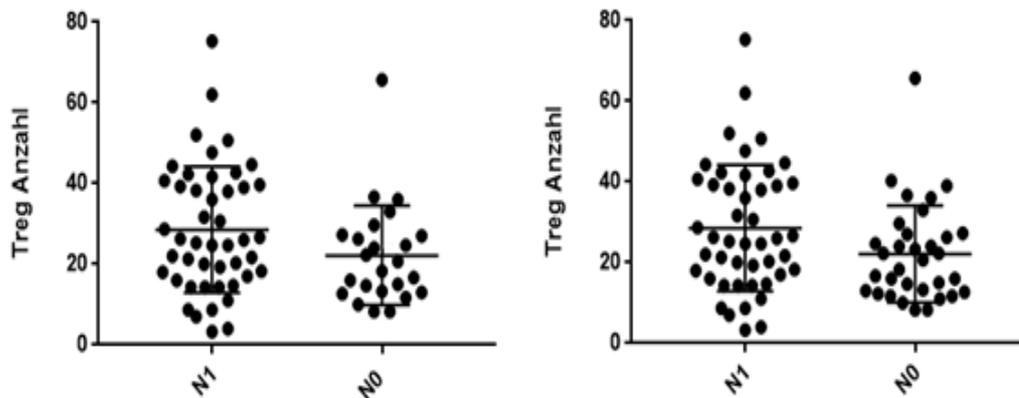


Abb.3.15 Treg-Infiltration bei negativem (N0) und positivem LK-Status (N1)

Links: N0-Status erfordert mindestens 10 resezierte LK (n=24); $p=0,060$

Rechts: N0-Status unabhängig von Anzahl der resezierten LK (n=33) $p=0,048$

3.8 Treg Infiltration und Primärrezidiv

Um den Einfluss der regulatorischen T-Zellen auf das Rezidiv zu untersuchen wurden die Stichproben anhand der Lokalisation ihres Primärrezidivs eingeteilt. Aufgrund der hierbei nur geringen Stichprobengröße wurden die beiden häufigsten Lokalisationen (Lebermetastase (n=16) vs. Lokalrezidiv (n=10)) anhand des Mann-Whitney-U-Tests miteinander verglichen und anschließend das Ergebnis in Abbildung 3.16 dargestellt. Die Anzahl infiltrierender Treg im Primärtumor lag bei Lebermetastasen bei durchschnittlich 27,67/HPF. Diese zeigte sich bei Lokalrezidiven mit durchschnittlich 18,5/HPF etwas niedriger. Bei einem p-Wert von 0,161 ist hier allerdings kein signifikantes Ergebnis zu beobachten.

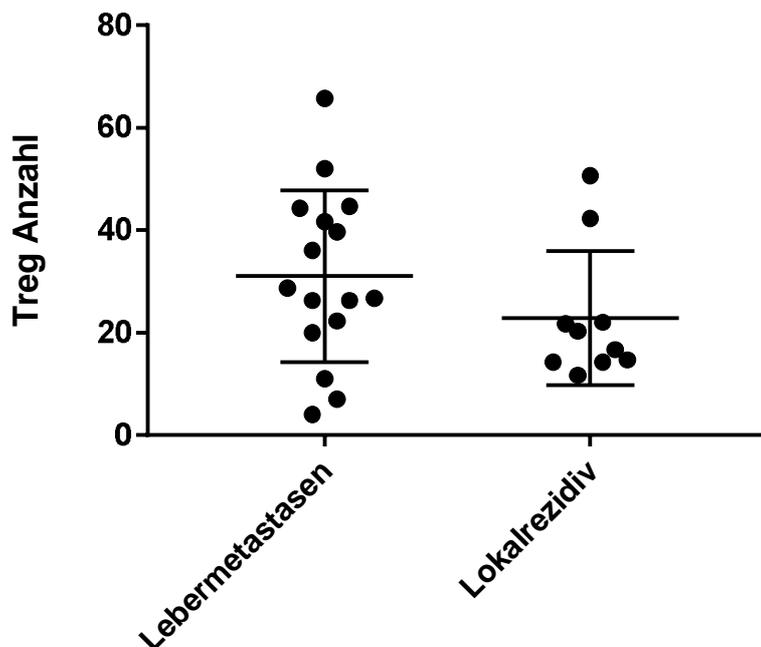


Abb. 3.16 Treg Infiltration des Primärtumors bei Erstrezidiv in Form von Lebermetastasen vs. Lokalrezidiv

Es findet sich eine höhere Treg-Dichte in Pankreaskarzinomen, die ein Erstrezidiv in Form von Lebermetastasen bilden. Bei einem p-Wert von 0,161 ist dies jedoch nicht signifikant.

3.9 FOXP3-Expression in Pankreaskarzinomzellen

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Präparate fiel auf, dass FOXP3 nicht ausschließlich in Immunzellen exprimiert wird. Auch in einigen exokrinen Pankreaskarzinomzellen selbst konnte dessen zytoplasmatische Expression nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 3.17 beispielhaft gezeigt, gelang dessen Nachweis unterschiedlich stark. Mit 44 der 79 Präparate (55,7%), zeigte die Mehrzahl der Tumore keine Expression des Transkriptionsfaktors. 35 Tumore (44,3%) wiesen eine positive Antikörperfärbung von malignen Parenchymzellen auf (siehe 7.1 Übersicht: Patientenkollektiv). Auffällig ist, dass die Umsetzung des Chromogens, und die dadurch resultierende braune Färbung, teilweise auch im Zytoplasma von gesundem Pankreasgewebe zu beobachten war.

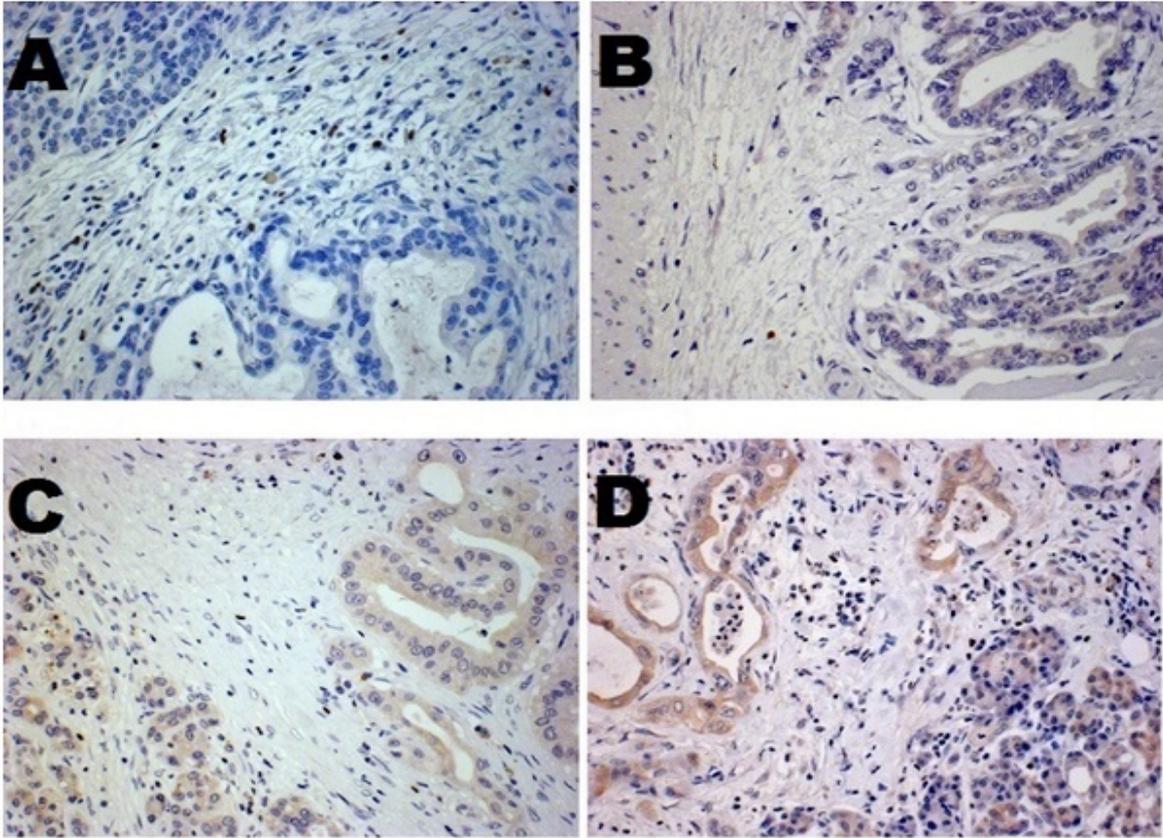


Abb. 3.17 Repräsentative Beispiele der FOXP3-Expression in Pankreasgewebe
Immunhistochemische FOXP3 Färbung von duktalem Pankreaskarzinomen. Bei 35 der 79
Patienten konnte auch eine Färbereaktion in Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen
werden. Weitere Informationen über die den Abbildungen zugehörigen Patienten sind im
Anhang unter 7.1 Patientenkollektiv: Übersicht aufgeführt.

In Bild A (Patient Nr. 66, HPF Nr. 3) befindet sich das Karzinomgewebe im unteren
Bildabschnitt. Es zeigt keine positive Farbreaktion. Bild B (Patient Nr. 18, HPF Nr. 2) und
C (Patient Nr. 63, HPF Nr. 2) zeigen das Karzinomgewebe in der rechten Bildhälfte. Eine
bräunliche Farbreaktion des Karzinomgewebes ist erkennbar. Das
Pankreaskarzinomgewebe in Bild D (Patient Nr. 20, HPF Nr. 1) liegt in der linken
Bildhälfte und zeigt eine deutliche Braunfärbung. Alle 4 Beispiele weisen unabhängig von
der FOXP3-Expression in Karzinomzellen, positiv gefärbte FOXP3⁺ T-Zellen auf.

In Bezug auf Überleben und klinisch-pathologische Parameter ließ die FOXP3⁺ Expression in Tumorgewebe allerdings keine eindeutigen Rückschlüsse zu. Die 77 zu analysierenden Patienten wurden in 2 Stichproben eingeteilt: positive Expression, unabhängig ob stark oder schwach positiv, (n=35) und negative Expression (n=44). Bei einem p-Wert von 0,317 zeigt eine positive Expression minimale Tendenz zu längerem postoperativen Gesamtüberleben. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abb. 3.18 lässt jedoch keinen klaren Unterschied erkennen.

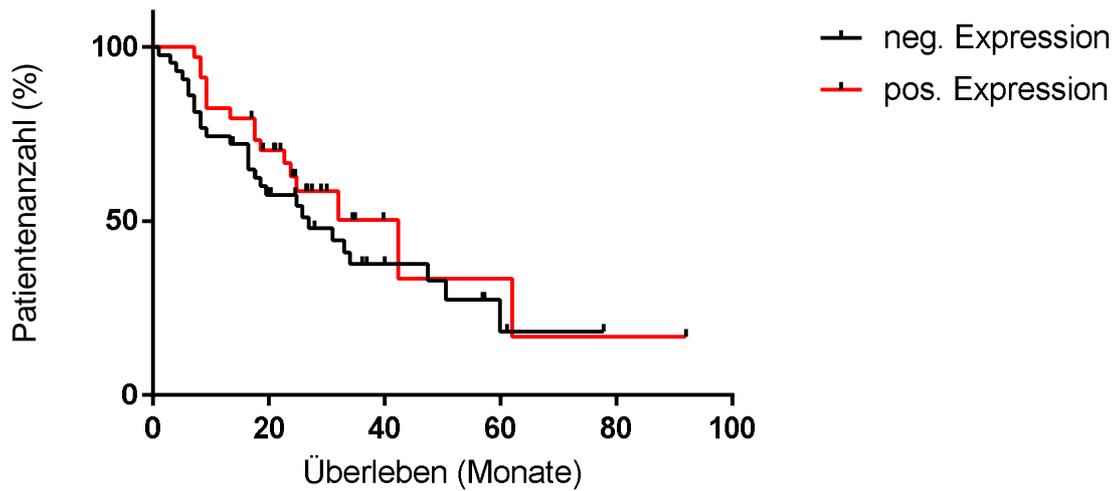


Abb. 3.18 Überlebenszeitanalyse der FOXP3-Expression in Pankreaskarzinomzellen

Kaplan-Meier-Analyse bei positiver und negativer FOXP3-Expression. Bei einem p -Wert von 0,317 ergab sich kein signifikanter Überlebensunterschied der beiden Stichproben.

4 Diskussion

Das Pankreaskarzinom lässt sich abhängig von klinisch-pathologischen Eigenschaften, wie dem Lymphknotenstatus und der lokalen Tumorausdehnung in Stadien einteilen. Dieses UICC Stadium lässt eine Aussage über die Prognose des Pankreaskarzinoms zu. Allerdings können auch bei gleicher Therapie innerhalb eines Tumorstadiums unterschiedliche Überlebenszeiten beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der Einfluss der körpereigenen Immunantwort sein. So zeigen Tumorpatienten, abhängig von deren Infiltration durch Immunzellen ein unterschiedliches Überleben⁷⁷. Eine Metaanalyse von Friedmann et al. über 120 Publikationen zu diesem Thema lieferte genauere Informationen über diese Art der Immunzellen⁷⁷:

Es zeigte sich ein unterschiedlicher Einfluss auf das rezidivfreie und Gesamtüberleben abhängig von Lokalisation, Dichte und Subpopulation der Tumor infiltrierenden Immunzellen. Eine hohe Anzahl an T-Zellen (CD3⁺), cytotoxische T-Zellen (CD8⁺) und Gedächtnis T-Zellen (CD45RO⁺) hatte generell einen positiven Einfluss auf das Überleben des Patienten, unabhängig von der Entität des Tumors. Andere Zelltypen wie B-Zellen, NK-Zellen, myeloid-derived suppressor cells (MDSC), Makrophagen und Subtypen der T-Helfer Zellen, darunter auch die Treg, konnten im Tumorgewebe in erhöhter Anzahl nachgewiesen werden. Deren Einfluss auf die Prognose scheint jedoch abhängig von der Art des Tumors unterschiedlich zu sein.

4.1 Treg Infiltration in Tumoren

In der vorliegenden Arbeit wurden in allen untersuchten Pankreaskarzinomen regulatorische T-Zellen in der Tumorgrenzzone gefunden. Dies wirft die Frage auf, ob Tumorgewebe die Infiltration von regulatorischen T-Zellen begünstigt. Bereits im Jahre 2001 beschrieb Woo et al.⁷⁸ erstmalig den Nachweis von regulatorische T-Zellen in soliden Tumoren. Es gelang der immunhistochemische Nachweis in Präparaten von Lungen- und Ovarialkarzinomen. Liyanage et al. beobachteten auch eine vermehrte Präsenz von Treg im peripheren Blut bei Mamma- und Pankreaskarzinomen⁷⁹.

Bei der Untersuchung von Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms, den PanIN (Pankreatische Intretheliale Neoplasie) und IPMN (intraduktal papillär muzinöse Neoplasie) zeigte sich ein vermehrtes Auftreten von Treg im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe. Bei Zunahme der Malignitätskriterien, bis hin zum

Pankreaskarzinom, war eine steigende Treg Dichte im Tumorstroma zu beobachten⁸⁰. Somit scheint ein direkter Zusammenhang zwischen Treg Infiltration und Tumorentstehung zu existieren.

Erklären lässt sich das vermehrte Auftreten im Tumorgewebe vermutlich durch direkte und indirekte Wirkung des Tumors. Dieser selbst, sowie die von ihm beeinflussten Immunzellen sezernieren das Chemokin CCL22. CCL22 ist ein Ligand für den sich auf Treg befindlichen Rezeptor CCR4. Durch Chemotaxis migriert die Immunzelle zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration, dem Tumor. Diesen Einfluss auf regulatorische T-Zellen zeigte Curiel et al. am Beispiel des Ovarialkarzinoms⁸¹.

Zudem konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass ein Teil von unreifen dendritischen Zellen unter dem Einfluss von Tumorzellen die Fähigkeit TGF- β zu sezernieren entwickelt. TGF- β wirkt proliferativ auf Treg, was deren vermehrtes Auftreten in Tumorgewebe erklären könnte⁸².

Die Kombination aus Chemotaxis und einer proliferativer Wirkung auf Treg in Tumornähe könnte erklären, warum in allen untersuchten Tumoren der Nachweis von regulatorischen T-Zellen gelungen ist.

Die eigentliche Infiltration der regulatorischen T-Zellen in das Tumorepithel erfolgt mittels Adhäsionsmolekülen. Der Mechanismus konnte am Beispiel des Pankreaskarzinoms erläutert werden. Zu den Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Pankreaszellen zählen MAdCAM-1, VCAM-1, CD62-E (E-Selektin), und ALCAM (CD166). Deren Expression zeigte sich im Tumor stärker als in gesundem Pankreasgewebe. Die Liganden dieser Rezeptoren befinden sich spezifisch auf der Oberfläche von regulatorischen T-Zellen. Somit kann die Infiltration von Treg in das Tumorgewebe erleichtert stattfinden⁸³.

4.2 Treg Infiltration als Prognosemarker bei Tumorerkrankungen

Die Infiltration von FOXP3⁺ T-Zellen im Tumorgewebe gilt heute als prognostischer Marker vieler solider Tumorentitäten. Der Grund liegt in ihrer immunsuppressiven Eigenschaft, die eine Immunreaktion gegen das Tumorgewebe unterdrückt. Nishikawa et al. untersuchten den Einfluss von Treg auf die Immunosurveillance bei Sarkomen im Mausmodell. Hierzu wurden Mäuse mit dem krebserregenden 3-methylcholanthrene (MCA) behandelt. Durch intravenöse Injektion von Treg wurde deren Anzahl im Blutkreislauf der Maus erhöht. Folge war eine Zunahme des karzinogenen Effektes des MCA und ein

daraus resultierendes Tumorwachstum⁸⁴. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass regulatorische T-Zellen unmittelbar mit der Genese maligner Tumore in Zusammenhang stehen.

Im Falle des Pankreaskarzinoms ließ sich ein Zusammenhang zwischen Gesamtüberleben und Treg Infiltration auch in anderen Studien mittels Immunhistochemie nachweisen. Die Kombination aus einer hohen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Anzahl, sowie einer niedrigen Treg Dichte im Tumorgewebe war mit einer besseren Prognose der Tumorpatienten verbunden⁸⁵. Dieser Effekt ließ sich auch bei anderen Tumorentitäten des Gastrointestinaltraktes nachweisen. So zeigte eine hohe Dichte an Treg beim hepatozellulären Karzinom (HCC) neben einem verkürztem Gesamtüberleben eine häufigere Gefäßinvasion⁸⁶.

Auch bei gynäkologischen Malignomen, wie dem Ovarial- und Mammakarzinom stand eine starke Treg Infiltration mit einem kürzerem Gesamtüberleben in Verbindung⁸¹⁸⁷. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung des Zervixkarzinom beschrieben. Ein geringes CD8⁺/Treg Verhältnis war hier ausschlaggebend für ein verkürztes Überleben⁸⁸. Dass der Einfluss von regulatorischen T-Zellen, abhängig von der Art des Tumors erhebliche Unterschiede aufweist, wird im Fall des Kolorektalkarzinoms deutlich. Patienten, die an einem Kolorektalkarzinom erkrankten, zeigen bei starker Expression von FOXP3⁺ Zellen innerhalb des Tumors eine bessere Prognose⁸⁹.

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen, wie bei den meisten Tumorentitäten, eine Tendenz zu verkürztem Gesamtüberleben bei starker Treg Infiltration auf. Diese ist mit einem Unterschied im medianen Gesamtüberleben von über 8 Monaten jedoch nicht signifikant. Da es sich beim Pankreaskarzinom um ein Malignom mit besonders schlechter Prognose handelt, sind 8 Monate ein verhältnismäßig langer Zeitraum. Zudem betrachtet die vorliegende Arbeit eine kleine Stichprobe. Bei größeren Patientenzahlen wäre ein Überlebenszeitraum dieser Größenordnung vermutlich signifikant.

Am Immunoediting innerhalb des Pankreaskarzinomgewebes sind, neben den Treg, jedoch auch andere Immunzelltypen beteiligt. Um den Einfluss regulatorischer T-Zellen auf das Pankreaskarzinom richtig einordnen zu können, ist es sinnvoll auch auf andere Subtypen kurz einzugehen:

Fukanga et al. zeigten erstmals im Jahre 2004 den positiven Einfluss von CD4⁺ und CD8⁺ tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) auf das Gesamtüberleben von Patienten mit reseziertem Pankreaskarzinom⁹⁰.

Dies wurde 2013 von Ino et al. bestätigt und durch den Einfluss von Treg und Makrophagen erweitert. Eine hohe Anzahl von regulatorischen T-Zellen unter allen CD4⁺ Zellen war mit einer schlechteren Prognose verbunden. Makrophagen lassen sich in die pro-inflammatorischen M1 und die anti-inflammatorischen M2 Makrophagen einteilen. Durch ihren anti-inflammatorischen Einfluss waren M2-Makrophagen, ähnlich wie Treg, bei vermehrter Infiltration ein deutlicher Hinweis auf eine ungünstige Prognose. Somit ist ein Übergewicht der M1-Makrophagen signifikant mit einem besseren Gesamtüberleben verbunden⁸⁵. Ebenfalls mit einer schlechteren Prognose verknüpft ist eine starke Mastzellinfiltration von Pankreaskarzinomen. In vitro konnte ein proliferativer Einfluss von Mastzellen auf Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden⁹¹. Diesen Effekt untersuchten Cai et al. im Jahre 2011 immunhistochemisch anhand 103 Pankreaskarzinom Resektaten. Der negative Einfluss von Mastzellen bestätigte sich nicht bei intratumoral oder peritumoral gelegenen Zellen. Betrachtet man jedoch die dazwischen liegende invasive Grenzzone (invasive margin oder intratumoral border zone), ließ sich der negative Effekt von Mastzellinfiltration bestätigen⁹². Dies zeigt, dass nicht alleine die Anzahl der nachgewiesenen Zellen einen Einfluss auf die Prognose des Patienten nehmen könnte, sondern auch deren Verteilung innerhalb des Gewebes.

Die regulatorische T-Zelle stellt mit ihren immunsuppressiven Eigenschaften also nur einen Teil des gesamten Immunoediting innerhalb des Pankreaskarzinoms dar. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht untersucht, in welchem Ausmaß die oben beschriebenen Immunzellpopulationen einen Einfluss auf das Tumorstadium nehmen. Eine andere, stark ausgeprägte Zellpopulation könnte die antitumorale Immunreaktion zusätzlich beeinflussen. Um den tatsächlichen Einfluss der regulatorischen T-Zellen auf das Gesamtüberleben des Patientenkollektivs sicher zu klären, muss sie im Zusammenhang aller am Immunoediting beteiligter Zellen betrachtet werden. Hierfür wären demzufolge weitere Analysen der Mikroumgebung des Tumors notwendig.

4.3 Verteilung der Treg Infiltration

Wie oben bereits angedeutet, scheint nicht allein die Dichte der Tumor infiltrierenden Immunzellen Einfluss auf die Tumorerkrankung zu haben. So zeigten Liu et al. durch immunhistochemische Analyse von neoadjuvant therapierten Mammakarzinomen, dass das Verteilungsmuster der Treg einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose des Patienten haben kann. Peritumoral gelegene regulatorische T-Zellen ließen eine Aussage über das Ansprechen einer Chemotherapie zu, wohingegen intratumorale Treg Rückschlüsse auf die Überlebenszeit des Patienten ermöglichten⁹³.

Anders verhielt es sich bei der Untersuchung von Nierenzellkarzinomgewebe. Hier zeigte eine hohe peritumorale Treg Dichte ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben. Intratumoral gelegene Treg hingegen schienen keinen Einfluss auf das Überleben des Patienten zu nehmen⁹⁴.

Auch beim Magenkarzinom zeigten Mizukami et al., dass die Verteilung der FOXP3⁺ T-Zellen eine entscheidende Bedeutung haben könnte. Die Grenze des Verteilungsmusters, anhand der eine Einteilung in zwei Gruppen durchgeführt wurde lag bei 1:5. Waren weniger als 1/5 aller Zellen intratumoral gelegen, lag ein peritumorales Verteilungsmuster vor. Mehr intratumoral gelegene Treg führten zur Einteilung in die Patientengruppe mit diffuser Verteilung. Letztere zeigte ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben⁷⁶.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Grenzbereich zwischen Tumor und tumorfreiem Gewebe (invasive Margin, IM) analysiert. In diesem Bereich trifft die Tumorexpanansion auf normales, sowie teils entzündliches Gewebe. Die hier befindlichen tumorinfiltrierenden Immunzellen stehen einer weiteren Ausbreitung der Tumorzellen im Wege. Um diese immunologische Barriere zu durchbrechen und sein invasives Wachstum fortzusetzen, benötigt der Tumor immunsupprimierende Einflüsse. Gelingen könnte dies, durch Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen, was deren Akkumulation im invasiven Grenzbereich erklären könnte. Vor allem auf der Seite des intratumoralen und damit unmittelbaren Tumorwachstums könnten die regulatorischen T-Zellen direkten Einfluss auf die Immuno-evasion des Tumors nehmen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde das Gesamtüberleben der Patienten zwei verschiedener Verteilungsmuster miteinander verglichen:

Ein peritumorales (<1/3 der Treg im Tumorbereich) und ein intratumorales (>1/3 der Treg im Tumorbereich) Verteilungsmuster innerhalb des IM. Hier zeigt sich ein

signifikant kürzeres Gesamtüberleben bei einer intratumoralen Verteilung. Eine Erklärung könnte die enge Lagebeziehung der regulatorischen T-Zellen zu Tumorzellen sein. Das Tumorgewebe könnte stärker von den immunsupprimierenden Mechanismen der Treg profitieren, als dies bei größerer Entfernung möglich wäre. Die Tumorzellen wären vor einer antitumoralen Immunantwort lokal geschützt, was ein aggressiveres Tumorwachstum und ein daraus resultierendes verkürztes Gesamtüberleben zur Folge haben könnte.

4.4 Einfluss auf klinisch-pathologische Eigenschaften

Hiraoka et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen Treg im Tumorgewebe und klinisch-pathologischen Tumoreigenschaften des Pankreaskarzinoms. Signifikant häufigere Fernmetastasierung, schlechterer Differenzierungsgrad und höheres Tumorstadium waren in der Gruppe mit größerem Treg Anteil zu beobachten⁸⁰.

Jiang et al. zeigten ähnliche Ergebnisse auf. Neben Tumorstadium und Differenzierung, bestand auch ein Zusammenhang mit einer Lymphknoteninfiltration. Eine starke Treg Infiltration im Primärtumor war signifikant häufiger mit Lymphknotenmetastasen verbunden. Genauere Ergebnisse lieferte die Exstirpation und anschließende feingewebliche Untersuchung dieser tumorinfiltrierten Lymphknoten. Auch hier zeigte sich die Treg Anzahl im Vergleich zu tumorfreien Lymphknoten signifikant erhöht⁹⁵. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass nicht nur Primärkarzinome, sondern auch deren Metastasen mit einer erhöhten Treg Dichte in Verbindung stehen.

Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pankreaskarzinome wiesen eine stärkere Treg Infiltration im Primärtumor bei positivem Lymphknotenbefall auf. Durch Beeinflussung der lokalen antitumoralen Immunantwort könnte die systemische Ausbreitung entlang des Lymphsystems begünstigt werden.

Nach Einbeziehung aller Patienten mit negativem Lymphknotenstatus, unabhängig von der Gesamtzahl resezierter Lymphknoten, vergrößert sich die „N0“ Stichprobe von 24 auf 33 und erreicht so ein signifikantes Ergebnis. Bei den zusätzlich einbezogenen 9 Patienten, liegt zwar ein negativer N-Status vor, dies jedoch ohne eine Mindestanzahl von 10 untersuchten Lymphknoten vorzuweisen. Folglich kann in diesen Fällen zwar von einem negativen Lymphknotenstatus ausgegangen werden, leitliniengerecht nachgewiesen ist dieser jedoch nicht.

Auch schlecht differenzierte Tumore waren signifikant stärker durch Treg Infiltration gekennzeichnet als gut und mäßig differenzierte Pankreaskarzinome. Zu Grunde liegen könnte hier die oben beschriebene Zunahme der Expression von Chemokinen (CCL2)⁸¹ sowie Adhäsionsmolekülen (MAdCAM-1, VCAM-1, CD62-E, und ALCAM)⁸³ durch das Tumorgewebe, die eine Infiltration erleichtern. Ein schlechterer Differenzierungsgrad könnte mit der vermehrten Expression dieser Moleküle einhergehen und dadurch eine stärkere Treg Dichte zur Folge haben. Infiltrierte Treg könnten durch Hemmung der intratumoralen Immunantwort die Aggressivität des schlecht differenzierten Karzinoms zusätzlich begünstigen und dadurch die Prognose des Patienten verschlechtern.

4.5 Einfluss auf die Lokalisation des ersten Rezidivs

Die Literatur liefert Hinweise, dass regulatorische T-Zellen auch in Zusammenhang mit Fernmetastasierung bei Pankreaskarzinomen stehen. So wurde beobachtet, dass bei metastasierten Karzinomen eine erhöhte Zahl regulatorischer T-Zellen im Blutkreislauf nachweisbar ist⁹⁶. Hiraoka et al. verglichen die Anzahl infiltrierender, regulatorischer T-Zellen im Primärtumor von lokal begrenzten mit systemisch ausgebreiteten Karzinomen. Hier fiel auf, dass bereits fernmetastasierte Tumore eine höhere Treg Dichte aufwiesen⁸⁰.

Den Tumor infiltrierende, sowie zirkulierende Treg scheinen demnach eine Absiedlung der Pankreaskarzinomzellen in andere Organen zu begünstigen.

Diese Information könnte auf den weiteren Krankheitsverlauf nach kurativer Resektion übertragbar sein. Zeigen sich im Tumorsektat viele regulatorische T-Zellen, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass der Tumor die lokale Immunosurveillance bereits überwunden hat. Absiedlungen in Form von Mikrometastasierung wären die Folge. Somit bestünde eine höhere Tendenz im postoperativen Verlauf manifeste Fernmetastasen auszubilden, als dies bei Tumoren mit geringer Treg Dichte der Fall wäre. Somit könnte anhand der Treg Dichte eine mögliche Fernmetastasierung prognostiziert werden, bevor dies durch bildgebende Verfahren möglich wäre. Eines der Ziele dieser Arbeit war es diese Theorie anhand des Ortes des Erstrezidivs zu überprüfen.

Zu den Orten des Erstrezidivs bei Pankreaskarzinomen gehören, wie auch bei anderen Tumorerkrankungen, neben Fernmetastasen auch Lokalrezidive. Vergleicht man diese mit der häufigsten Art der Fernmetastasierung, den

Lebermetastasen, zeigen letztere eine höhere Treg Dichte im Primärkarzinom. Regulatorische T-Zellen scheinen also Einfluss auf den postoperativen Krankheitsverlauf im Sinne des Rezidivortes zu nehmen. Diese Beobachtung wurde bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Bei kleiner Stichprobenzahl (n=26) ist jedoch kein signifikantes Ergebnisse ($p=0,161$) zu beobachten.

Ließen sich diese Ergebnisse in größeren Stichproben signifikant bestätigen, hätte dies bedeutenden Einfluss auf die postoperative Therapie. Abhängig von der Treg-Dichte und möglicherweise anderen Parametern könnte man die adjuvante Therapieplanung individuell auf den Patienten anpassen. Patienten mit einer niedrigen Treg-Dichte und einem hohem Risiko für isolierte Lokalrezidive könnten anhand der immunhistochemischen Resektatanalyse herausgefiltert werden. Diese Subgruppe von Patienten könnte potentiell von einer lokalen adjuvanten Therapie wie etwa einer Radiochemotherapie profitieren. Dies müsste sicherlich in weiteren klinischen Studien untersucht werden.

4.6 FOXP3-Expression in Pankreaskarzinomzellen

Hinz et al. zeigten erstmals im Jahre 2007, dass eine Foxp3-Expression nicht nur im Kern hämatopoetischen Zellen, sondern auch im Zytoplasma von Tumorzellen nachgewiesen werden kann. Bei 39 immunhistochemisch untersuchten Pankreaskarzinomen wurde in 60% eine FOXP3-Expression der Tumorzellen selbst beobachtet. Eine anschließende RT-PCR bestätigte die Existenz von FOXP3 mRNA, die durch Translation zur Synthese des Transkriptionsfaktors führt. Auch ein Westernblot bestätigte, dass FOXP3 in Tumorzellen tatsächlich nachgewiesen werden konnte. In gesundem Pankreasgewebe gelang dieser Nachweis nicht⁹⁷.

Ebert et al. zeigten ähnlich Ergebnisse: Die Untersuchung verschiedener Tumorentitäten, darunter Melanomen, zeigte, dass die FOXP3⁺ Expression nicht ausschließlich auf Immunzellen beschränkt ist. Auch EBV transformierte B-Zellen zeigten eine FOXP3⁺ Expression, die in physiologischen B-Zellen nicht nachweisbar ist. Da das Epstein-Barr-Virus eine tumorinduzierende Wirkung besitzt, könnte eine maligne Entartung mit der FOXP3⁺ Expression in Zusammenhang stehen⁹⁸.

Hinz et al. vermuteten eine Variante des Molekularen Mimikri, die dem Pankreaskarzinom die Immunevasion erleichtert. Ähnlich der regulatorischen T-Zellen, die FOXP3 in großen Mengen exprimieren, könnte ein

immunsupprimierender Einfluss auf zytotoxische T-Zellen ausgeübt werden. Im Rahmen des Immunoediting könnte diese Eigenschaft die Immunosurveillance verkürzen und so ein schnelleres Tumorwachstum begünstigen. Zudem wurde gezeigt, dass die Expression von FOXP3 zu einer Herunterregulierung der Phosphodiesterase 3B (PDE3B) führt, was mit erhöhter metabolischer Fitness und Apoptoseresistenz bei regulatorischen T-Zellen in Verbindung gebracht wird⁹⁹.

Durch die FOXP3-Expression des Tumors könnten diese Eigenschaften übernommen werden und so das Karzinomwachstum beschleunigen. Auch ein verringertes Ansprechen auf Chemotherapie könnte so erklärt werden. Diese Theorie konnte von Hinz et al. allerdings nicht mit signifikanten Ergebnissen belegt werden. Als Grund hierfür wurde die kleine Stichprobe von nur 39 untersuchten Proben genannt.

Auch aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ließ eine FOXP3⁺ Expression in Tumorzellen keine Rückschlüsse auf die Prognose des Patienten zu. Im Vergleich mit FOXP3⁻ Tumorpräparaten zeigte sich, trotz einer größeren Stichprobe von 77 Patienten, ebenfalls kein eindeutiger Einfluss auf das postoperative Gesamtüberleben.

Anders als in der Publikation von Hinz et al., gelang in der vorliegenden Arbeit auch der Nachweis des Transkriptionsfaktors im gesunden Pankreasgewebe. Eine falsch-positive Färbung des gesamten Pankreasgewebes kann demnach nicht vollständig ausgeschlossen werden. Damit sind Interpretation und mögliche Schlussfolgerungen aus der vorhandenen FOXP3 Expression ohne einen weiteren Nachweis, in Form eines Westernblot oder PCR kaum möglich.

4.7 Operative Daten

Das mittlere Erkrankungsalter zum Operationszeitpunkt lag bei 67,8 Jahren. Dies liegt unter dem aktuellen durchschnittlichen Erkrankungsalter in Deutschland von über 70 Jahren². In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings nur Patienten miteinbezogen, die zum Diagnosezeitpunkt potentiell kurativ resektabel waren. Neben einem fortgeschrittenen Tumorstadium führt auch eine schlechte körperliche Verfassung, zum Beispiel durch stark ausgeprägt Begleiterkrankungen, dazu von einer Operation abzusehen. Da ein fortgeschrittenes Alter häufiger mit dem Auftreten von Begleiterkrankungen verbunden ist, würde dies den etwas jüngeren Altersdurchschnitt des Patientenkollektivs erklären.

Die geringe intraoperative bzw. postoperative Mortalität von 2,4% entspricht in etwa dem in der Literatur genannten Wert eines spezialisierten Zentrums. Da die Pankreasresektion zu den Routineeingriffen im Universitätsklinikum Magdeburg zählt, bestätigt die vorliegende Arbeit die aktuelle Literatur. Auch eine Komplikationsrate von bis zu 50% ist für ein spezialisiertes Zentrum nicht ungewöhnlich¹².

Mit 4,8% liegt die 5-Jahres-Überlebensrate überdurchschnittlich hoch für Pankreaskarzinome. Allerdings bestand das Patientenkollektiv aus primär resezierten Pankreaskarzinomen, was die Überlebenszeit deutlich verlängert. Jedoch liegt sie noch immer weit von der 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 20% entfernt, die bei R0 resezierten Pankreaskarzinomen beobachtet worden ist¹². Dies könnte durch den postoperativen R Status zu erklären sein. Bei über einem Viertel des Patientenkollektivs konnte kein R0 Zustand erreicht werden. Zudem waren am Ende des Follow-up noch 35 Patienten am Leben, die theoretisch noch die 5-Jahres-Überlebenszeit erreichen könnten.

4.8 Methodenkritik

4.8.1 Datenerhebung

Die erfassten Daten der vorliegenden Arbeit erfolgten im Rahmen einer retrospektiven Untersuchung. Eine mögliche unvollständige Dokumentation und Datenerhebung könnte die Datenqualität sowie die Ergebnisse beeinflussen.

Die zur Überlebenszeitanalyse eingeteilten Patientengruppen (viele Treg vs. wenige Treg) unterscheiden sich in ihrem Altersmedian mit 67 zu 68,1 Jahren nur minimal. Das Alter hat in diesem Zusammenhang also vermutlich keinen erheblichen Einfluss. Allerdings ist bekannt, dass die Überlebenszeit bei Pankreaskarzinompatienten nicht nur vom Patientenalter sondern auch vom körperlichen Verfassung (ECOG-Status) bzw. Vorerkrankungen abhängig ist³⁶. Diese wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erfasst.

Eine Überlebenszeitanalyse mit gängigen, histopathologischen Prognoseparametern wie dem V,L und Pn, zeigte bei einem negativen Status jeweils ein längeres Gesamtüberleben. Im Falle von V und L sind diese Ergebnisse hoch signifikant. Bei einer kleinen Stichprobe von lediglich 6 Patienten ohne Perineuralscheideninfiltration ist trotz allem eine klare Tendenz erkennbar.

Diese Ergebnisse können als Hinweis für eine solide Erhebung des Datensatzes gewertet werden.

4.8.2 Immunhistochemische Färbung

Neben der Erfassung klinischer Daten nimmt auch die Durchführung der immunhistochemischen Färbung selbst Einfluss auf die Ergebnisse. So kann das Resultat abhängig von Färbemethode und Färbeprotokoll variieren und einer Reproduzierbarkeit im Wege stehen¹⁰⁰.

Ein zusätzlicher Faktor ist die subjektive Auszählung positiver Zellen. Untersucherabhängig kann das gleiche Präparat unterschiedliche Ergebnisse liefern. Zudem sollte die Dichte der positiven, infiltrierenden Immunzellen genau definiert werden (positive Zellen/definierte Fläche). Bestenfalls werden mehrere Schnitte aus verschiedenen Tumorbereichen zur Analyse gewählt um ein möglichst aussagekräftigen Überblick über das immunologische Geschehen des gesamten Tumors zu erhalten.

Auch diese Problematik könnte in dieser Arbeit eine Rolle spielen. Um die Färbung möglichst einheitlich zu gestalten, wurde ein vollautomatisierter Färbeautomat verwendet. Dieser war in der Lage ein zuvor festgelegtes Färbeprotokoll bei allen durchgeführten Färbungen exakt gleich durchzuführen. Lediglich die Gegenfärbung mit Hämalan nach Mayer wurde manuell durchgeführt. Der verwendete Primärantikörper ist gegen den Transkriptionsfaktor FOXP3 gerichtet, welches als spezifischster Marker für regulatorische T-Zellen gilt. Neben CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Zellen sind jedoch weitere T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften bekannt, die diese Kombination aus Oberflächenmerkmale nicht aufweisen. Zu ihnen gehören die deutlich selteneren Th3 und Tr1 Zellen¹⁰¹. Da diese Zellen nicht durch den verwendeten Antikörper nachgewiesen werden können, bleibt unklar inwieweit andere regulatorische Zellen Einfluss auf die Ergebnisse nehmen.

Die Fotodokumentation der ausgewählten HPF hatte das Ziel die Objektivität und Reproduzierbarkeit zu verbessern. Bei einer einheitlichen Aufnahmefläche von 0,15 mm² aller HPF war die Dichte positiver Zellen untereinander vergleichbar. Durch die virtuelle Sicherung der Bilder kann das Ergebnis jederzeit erneut eingesehen und nachvollzogen werden. Jedoch stammten alle dokumentierten HPF aus einem Schnitt desselben Tumoreals. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass man bei der Untersuchung eines anderen Abschnittes desselben Tumors eine andere Treg Dichte vorfindet.

Bei bis zu 102 positiv gefärbten Zellen/HPF unterschiedlicher Intensität und Größe besteht die Möglichkeit einer gewissen untersucherabhängigen Variabilität der Ergebnisse. Aus diesem Grund erfolgte die Auszählung der Zellen doppelt zu

unterschiedlichen Zeitpunkten. Dies galt dem Ziel die intraobserver Variabilität zu kontrollieren. Um die interobserver Variabilität der Ergebnisse einschätzen zu können, erfolgte eine weitere Zählung, wie bereits in Abschnitt 2.7 beschrieben, durch einen unabhängigen Doktoranden. Abweichungen der Ergebnisse wurden diskutiert. Somit konnte ein höheres Maß an Objektivität erreicht werden.

4.8.3 Mikroskopische Auswertung

Laut aktuellem Stand der wissenschaftlichen Forschung, gilt die Treg Infiltration, wie oben beschrieben, als negativer prognostischer Marker für Patienten mit Pankreaskarzinom. Auch wenn nicht immer signifikant, werden diese Erkenntnisse auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Trotz des unumstrittenen prognostischen Wertes der Treg Infiltration, besteht keine einheitliche Auswertung der untersuchten Pankreaskarzinome. So scheint das Ergebnis nicht nur durch die Verteilung der analysierten Treg beeinflusst zu werden, sondern auch durch andere Subpopulationen der Tumor infiltrierenden Lymphozyten. Zudem existiert keine eindeutige Einteilung, ab wann eine Treg Infiltration als stark bzw. schwach gewertet werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde sich hierbei am Median orientiert. All dies erschwert eine Vergleichbarkeit mit den bereits veröffentlichten Studien.

Mit der oben beschriebenen Problematik setzten sich auch Galon et al. auseinander⁷⁵. Um eine einheitliche Auswertung zu etablieren initiierten sie eine internationale Arbeitsgruppe von Pathologen und Immunologen aus 23 Zentren 17 verschiedener Länder. Ziel dieser Arbeitsgruppe ist es den „Immunoscore“ als prognostischen Faktor in der klinischen Routinediagnostik aufzunehmen und dadurch den TNM-Status als TNM-I (Immune) zu ergänzen.

Diese weltweite, aktuell laufende Studie des Immunoscore soll einerseits die standardisierte Durchführung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse klären, andererseits den prognostischen Wert in der Routinediagnostik bestätigen. Die Arbeitsgruppe legte ein standardisiertes Vorgehen bei der Durchführung und Auswertung der Immunhistochemie vor. Gewählt wurden die am einfachsten durchführbaren Membranfärbungen, CD3⁺ und CD8⁺. Untersucht wird jeweils das Zentrum des Tumors (CT = center of the tumor) und dessen Grenzbereich (IM = invasive margin). Abhängig von der Anzahl positiv gefärbter Zellen in beiden Bereichen wird ein Immunoscore von I0 bis I4 festgelegt, wobei ein hoher Wert einer hohen Dichte dieser beiden Subtypen im Tumorgewebe entspricht. Bei dem

untersuchten Gewebe handelt es sich um Resektat von Kolorektalkarzinomen mit UICC-Stadium 1 bis 3.

Hierfür galten die Ergebnisse einer zuvor veröffentlichten Studie von Pagès et al. als Orientierung. Unter Einbeziehung von Anzahl und Verteilung von CD45RO⁺Gedächtniszellen und CD8⁺ T-Lymphozyten, wurde für Kolorektalkarzinom (KRK) ein Score zwischen 0 und 4 festgelegt. Insgesamt wurden 602 Tumore untersucht. Patienten mit einem Immunoscore von 4 zeigten eine signifikant verbesserte 5-Jahres-Überlebensrate als Patienten mit einem Immunoscore von 0 und 1¹⁰².

Die Ergebnisse der Studie von Galon et al. könnten einen erheblichen Einfluss auf die zukünftige immunhistochemische Auswertung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) haben.

Eine resultierende Standardisierung des Verfahrens würde die Aussagekraft zukünftig durchgeführter Studien verbessern und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse erleichtern.

Zudem scheint es möglich, den Immunoscore auf andere Tumorentitäten wie das Pankreaskarzinom zu übertragen. Eine Miteinbeziehung anderer TIL, wie die regulatorischen T-Zellen, in den Immunoscore wäre langfristig denkbar.

4.9 Ausblick: Treg in der Krebsimmuntherapie

Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse lassen keine direkten Rückschlüsse auf eine mögliche Tumormimmuntherapie zu. Dennoch bildet das Verständnis über Tumor infiltrierende Leukozyten die Grundlage für neue Therapieoptionen.

Die Krebsimmuntherapie basiert auf der Modifikation des körpereigenen Immunsystems. Durch dessen Beeinflussung soll die Immunreaktion gegen das Tumorgewebe verstärkt und somit das Tumorstadium eingedämmt werden. Bei einem der Therapieansätze handelt es sich um Impfungen mit vorbehandelten Immunzellen:

Die Immunisierung mit RNA-transfected DC (dendritische Zellen) beinhaltet eine autologe Zelltransplantation von Dendritische Zellen. Durch Transfektion wurden diese mit fremden RNA-Abschnitten beladen, die für Tumorantigene kodieren. Werden diese DC dem Patienten intradermal injiziert, folgt über Tumorantigenpräsentation die Rekrutierung antitumorale zytotoxischer T-Zellen. Eine tumorspezifische Immunantwort gegen das Karzinomgewebe ist die Folge¹⁰³.

Ein ähnlicher Mechanismus liegt bei der Immunisierung mit LAK (Lymphokin-aktivierten-Killerzellen) zugrunde. Leukozyten werden in vitro mit rekombinant hergestelltem IL-2 inkubiert. Es resultieren antitumorale Immunzellen mit zytotoxischen Eigenschaften. Diese können anschließend dem Patienten zur Krebstherapie injiziert werden¹⁰⁴.

Die Kombination aus DC Impfung und LAK-Zell Therapie wurde bereits klinisch an einer kleinen Patientengruppe mit inoperabler Pankreaskarzinomerkrankung getestet. In Kombination mit einer klassischen Chemotherapie zeigte diese Therapieoption erste Hinweise auf verlängerte Überlebenszeiten¹⁰⁵.

Um die antitumorale Wirkung dieser Impfungen zu verstärken und dadurch das Gesamtüberleben zu verlängern, scheint eine Minderung der immunsuppressiven Schutzmechanismen des Tumors notwendig. Einer dieser Mechanismen könnten regulatorische T-Zellen sein, deren Präsenz bei malignen Tumorerkrankungen allgemein nachweisbar ist. Durch Reduktion des Treg Anteils im Organismus, erhofft man sich eine verminderte Toleranz des Tumors und damit ein verbessertes Ansprechen der Krebsimmuntherapie.

Ein therapeutischer Ansatz bildet eine niedrige, oral verabreichte Dosis des Zytostatikums Cyclophosphamid. Nach abgeschlossener Therapie wurde eine signifikante Verminderung der zirkulierenden Treg im Blutkreislauf der Karzinompatienten beobachtet¹⁰⁶.

Ein ähnlicher, spezifischer gegen Treg gerichteter Ansatz, stellt das rekombinant hergestellte Diphtherietoxin Denileukin Difitox oder DAB(389)-IL dar, auch bekannt unter dem Handelsnamen ONTAK. Das Toxin ist an IL-2 gebunden und löst seinen toxischen Effekt über die Bindung an den CD25 Rezeptor auf Treg aus. Nach Rezeptorbindung folgt die Apoptose der Zielzelle und damit eine Reduktion der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut. Dieser Effekt konnte klinisch an metastasierten Nierzellkarzinompatienten erfolgreich getestet werden. Nach einer Impfung mit RNA-transfected DC, zeigte das Patientenkollektiv mit einer ONTAK Vorbehandlung eine signifikant stärkere antitumorale Immunantwort als Patienten ohne vorherige ONTAK Therapie¹⁰⁷.

Einen weiteren therapeutischen Ansatz bieten sogenannte Immun-Checkpoints, Rezeptoren in der Membran von T-Lymphozyten. Einer dieser Rezeptoren ist CTLA-4 (CD152), dessen Expression vermehrt auf der Oberfläche von regulatorischen T-Zellen beobachtet werden konnte⁵⁴. CTLA-4 ist strukturell verwandt mit dem Oberflächenrezeptor CD28. Beide sind in der Lage das auf APZ

gelegene CD80/86 (B7) zu binden, haben jedoch unterschiedliche Einflüsse auf das Immunsystem. Eine Bindung von CD28 an CD80/86 hat die Differenzierung und Proliferation von T-Zellen zur Folge¹⁰⁸. Somit wirkt es immunstimulierend. CTLA-4 hingegen leitet nach Bindung an CD80/86 die Induktion vonIDO und dadurch die Apoptose der APZ ein⁶⁵. Die Immunreaktion wird herunterreguliert. An dieser Stelle greift der gegen CTLA-4 gerichtete monoklonale Antikörper Ipilimumab (Handelsname: Yervoy) an. Durch Hemmung der durch CTLA-4 ausgelösten Signalkaskade soll die Immunantwort gegen das Tumorgewebe verstärkt werden. Für fortgeschrittene Stadien des malignen Melanoms findet er bereits klinische Anwendung. In einer Phase-III-Studie mit einer i.v. Dosis von 10mg/kg zeigte sich Ipilimumab einem Plazebo hinsichtlich des gesamt- sowie metastasenfreien Überlebens überlegen¹⁰⁹.

Auch bei der Therapie des Pankreaskarzinoms wird Ipilimumab aktuell klinisch getestet. Bei einer Minimaldosis von 3mg/kg zeigten Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien in einer Phase-II-Studie jedoch kein eindeutiges Ansprechen auf die Antikörpertherapie¹¹⁰. Eine weitere klinische Studie kombinierte Ipilimumab (10mg/kg) mit GVAX. Bei GVAX handelt es sich um einen Impfstoff aus genetisch modifizierten Pankreaskarzinomzellen, die durch in vitro Bestrahlung ihre Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben. Sie sezernieren den immunstimulierenden GM-CSF. Die Kombination aus dem Immun-Checkpoint-Hemmer (Ipilimumab) und einem Krebsimpfstoff (GVAX) zeigte eine Tendenz zu verlängertem Gesamtüberleben im Vergleich zur alleinigen Ipilimumabtherapie¹¹¹.

5 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom gehört mit einer durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von unter 5% zu den aggressivsten Tumorerkrankungen des Menschen. Allerdings konnten bei Patienten des gleichen Tumorstadiums unter identischer Therapie erhebliche Unterschiede im Gesamtüberleben beobachtet werden. Verantwortlich hierfür könnte der Einfluss des körpereigenen Immunsystems zu sein. Teil davon sind die immunsupprimierenden regulatorischen T-Zellen, mit ihrem spezifischen Transkriptionsfaktor FOXP3.

Ziel der Arbeit war es den Einfluss regulatorischer T-Zellen auf den Krankheitsverlauf von Pankreaskarzinompatienten zu überprüfen. Hierfür wurde die immunhistochemische Antikörperfärbung gegen FOXP3 an Paraffinpräparaten erfolgreich etabliert. In allen untersuchten Pankreaskarzinomen gelang der Nachweis einer Treg Infiltration. Zur Analyse und Fotodokumentation wurde der invasive Grenzbereich (IM) des Tumors ausgewählt. Jeweils 3 High Power Fields (HPF = 0,15 mm², abgebildet sind 50% Tumor und 50% tumorfreies Gewebe) wurden dokumentiert und die Anzahl positiver Treg ausgezählt und gemittelt. Durch einen umfassenden, retrospektiven Datensatz gelang es die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse in einen klinischen Zusammenhang zu bringen.

Im untersuchten Kollektiv zeigten Patienten mit starker Treg Infiltration ein um über 8 Monate verkürztes, postoperatives Gesamtüberleben. Bei kleinem Patientenkollektiv (n=79) konnte allerdings kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen (Treg hoch vs. Treg niedrig) beobachtet werden. Jedoch ist das Gesamtüberleben bei einem intratumoralen Verteilungsmuster der Treg (>1/3 der Treg auf Seiten des Tumors) signifikant verkürzt.

Eine starke Treg Infiltration war zudem signifikant häufiger mit einem positiven Lymphknotenstatus sowie einem signifikant schlechteren Differenzierungsgrad des Tumors verbunden. Die Ergebnisse lassen auch vermuten, dass regulatorische T-Zellen einen Einfluss auf die Lokalisation des Erstrezidivs haben könnten. Erstmals konnte gezeigt werden, dass Patienten mit postoperativem Lokalrezidiv tendenziell eine geringere Treg Infiltration des Primarius aufweisen als dies bei Patienten mit postoperativer Lebermetastasierung der Fall war.

Regulatorische T-Zellen scheinen daher sowohl die biologische Aggressivität des Tumors als auch dessen systemische Ausbreitung zu begünstigen.

6 Literatur

1. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer***136**, E359–E386 (2015).
2. Krebs in Deutschland 2009/2010 -
KID2013.pdf;jsessionid=557772E25675F954133B3CDAC775ADFD.2_cid363.
3. Blackford, A. *et al.* Genetic Mutations Associated With Cigarette Smoking in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.***69**, 3681–3688 (2009).
4. Mohr, S. B., Garland, C. F., Gorham, E. D., Grant, W. B. & Garland, F. C. Ultraviolet B irradiance and vitamin D status are inversely associated with incidence rates of pancreatic cancer worldwide. *Pancreas***39**, 669–674 (2010).
5. Whitcomb, D. C. & Pogue-Geile, K. Pancreatitis as a risk for pancreatic cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.***31**, 663–678 (2002).
6. Raimondi, S., Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.***6**, 699–708 (2009).
7. Rahib, L. *et al.* Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.***74**, 2913–2921 (2014).
8. Hartwig, W., Werner, J., Jäger, D., Debus, J. & Büchler, M. W. Improvement of surgical results for pancreatic cancer. *Lancet Oncol.***14**, e476-485 (2013).
9. Doi, R. *et al.* Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial. *Surg. Today***38**, 1021–1028 (2008).
10. Whipple, A. O. Observations on radical surgery for lesions of the pancreas. *Surg. Gynecol. Obstet.***82**, 623–631 (1946).
11. Traverso, L. W. & Longmire, W. P. Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy. *Surg. Gynecol. Obstet.***146**, 959–962 (1978).

12. Halloran, C. M. *et al.* Complications of pancreatic cancer resection. *Dig. Surg.***19**, 138–146 (2002).
13. Geer, R. J. & Brennan, M. F. Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *Am. J. Surg.***165**, 68-72; discussion 72-73 (1993).
14. Shrikhande, S. V. *et al.* Pancreatic resection for M1 pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.***14**, 118–127 (2007).
15. Kleeff, J. *et al.* Surgery for recurrent pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann. Surg.***245**, 566–572 (2007).
16. Choti, M. A., Dixon, E. & Tyler, D. Pretreatment assessment of resectable and borderline resectable pancreatic cancer: Expert consensus statement by Callery *et al.* *Ann. Surg. Oncol.***16**, 1734–1735 (2009).
17. Ouaiissi, M. *et al.* Vascular reconstruction during pancreatoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas improves resectability but does not achieve cure. *World J. Surg.***34**, 2648–2661 (2010).
18. Nikfarjam, M. *et al.* Additional organ resection combined with pancreaticoduodenectomy does not increase postoperative morbidity and mortality. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract***13**, 915–921 (2009).
19. Lin, P.-W., Shan, Y.-S., Lin, Y.-J. & Hung, C.-J. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic head cancer: PPPD versus Whipple procedure. *Hepatogastroenterology***52**, 1601–1604 (2005).
20. Justin, V., Fingerhut, A., Khatkov, I. & Uranues, S. Laparoscopic pancreatic resection—a review. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.***1**, (2016).
21. Berberat, P. O., Friess, H., Kleeff, J., Uhl, W. & Büchler, M. W. Prevention and treatment of complications in pancreatic cancer surgery. *Dig. Surg.***16**, 327–336 (1999).

22. Bassi, C. *et al.* Pancreatic fistula rate after pancreatic resection. The importance of definitions. *Dig. Surg.***21**, 54–59 (2004).
23. Bassi, C. *et al.* Postoperative pancreatic fistula: An international study group (ISGPF) definition. *Surgery***138**, 8–13 (2005).
24. Kazanjian *et al.* Management of pancreatic fistulas after pancreaticoduodenectomy: results in 437 consecutive patients. (2005).
25. Zovak, M., Mužina Mišić, D. & Glavčić, G. Pancreatic surgery: evolution and current tailored approach. *Hepatobiliary Surg. Nutr.***3**, 247–258 (2014).
26. S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom - AWMFS3Leitlinie2013.pdf.
27. Neoptolemos, J. P. *et al.* Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA***304**, 1073–1081 (2010).
28. Hammel, P. *et al.* Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled After 4 Months of Gemcitabine With or Without Erlotinib: The LAP07 Randomized Clinical Trial. *JAMA***315**, 1844–1853 (2016).
29. Gillen, S., Schuster, T., Meyer zum Büschenfelde, C., Friess, H. & Kleeff, J. Preoperative/Neoadjuvant Therapy in Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Response and Resection Percentages. *PLoS Med.***7**, (2010).
30. Sultana, A. *et al.* Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.***25**, 2607–2615 (2007).
31. Vaccaro, V. *et al.* Metastatic pancreatic cancer: Is there a light at the end of the tunnel? *World J. Gastroenterol. WJG***21**, 4788–4801 (2015).
32. Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.***364**, 1817–1825 (2011).

33. Kleeff, J., Michalski, C., Friess, H. & Büchler, M. W. Pancreatic cancer: from bench to 5-year survival. *Pancreas***33**, 111–118 (2006).
34. Cameron, J. L., Riall, T. S., Coleman, J. & Belcher, K. A. One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies. *Ann. Surg.***244**, 10–15 (2006).
35. Beger, H. G., Rau, B., Gansauge, F., Poch, B. & Link, K.-H. Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts. *World J. Surg.***27**, 1075–1084 (2003).
36. Kalsner, M. H., Barkin, J. & MacIntyre, J. M. Pancreatic cancer. Assessment of prognosis by clinical presentation. *Cancer***56**, 397–402 (1985).
37. Adham, M. *et al.* Long-term survival (5-20 years) after pancreatectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma: a series of 30 patients collected from 3 institutions. *Pancreas***37**, 352–357 (2008).
38. Fletcher, C. D. M. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. (Elsevier Health Sciences, 2013).
39. Chang, D. K. *et al.* Margin clearance and outcome in resected pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.***27**, 2855–2862 (2009).
40. Histological Typing of Tumours of the Exocrine Pancreas G. Klöppel, E. Solcia, D.S. Longnecker, C. Capella, and L.H. Sobin In Collaboration with Pathologists in 7 Countries.
41. Riediger, H. *et al.* The lymph node ratio is the strongest prognostic factor after resection of pancreatic cancer. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract***13**, 1337–1344 (2009).
42. Slidell, M. B. *et al.* Impact of Total Lymph Node Count and Lymph Node Ratio on Staging and Survival after Pancreatectomy for Pancreatic Adenocarcinoma: A Large, Population-Based Analysis. *Ann. Surg. Oncol.***15**, 165 (2008).

43. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.***69**, 89–95 (2001).
44. Nazli, O., Bozdag, A. D., Tansug, T., Kir, R. & Kaymak, E. The diagnostic importance of CEA and CA 19-9 for the early diagnosis of pancreatic carcinoma. *Hepatogastroenterology***47**, 1750–1752 (2000).
45. Oldenhuis, C. N. a. M., Oosting, S. F., Gietema, J. A. & de Vries, E. G. E. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990***44**, 946–953 (2008).
46. Burnet, M. Cancer—A Biological Approach. *Br. Med. J.***1**, 841–847 (1957).
47. van der Bruggen, P. *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science***254**, 1643–1647 (1991).
48. Novellino, L., Castelli, C. & Parmiani, G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother. CII***54**, 187–207 (2005).
49. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity***21**, 137–148 (2004).
50. Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.***6**, 715–727 (2006).
51. Gershon, R. K. & Kondo, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology***18**, 723–737 (1970).
52. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. | The Journal of Immunology.

Available at: <http://www.jimmunol.org/content/155/3/1151.long>. (Accessed: 21st March 2017)

53. Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. & Sakaguchi, S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.***3**, 135–142 (2002).
54. Takahashi, T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.***192**, 303–310 (2000).
55. Zheng, Y. *et al.* Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature***445**, 936–940 (2007).
56. Chen, C., Rowell, E. A., Thomas, R. M., Hancock, W. W. & Wells, A. D. Transcriptional Regulation by Foxp3 Is Associated with Direct Promoter Occupancy and Modulation of Histone Acetylation. *J. Biol. Chem.***281**, 36828–36834 (2006).
57. Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L. & Singer, A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat. Immunol.***6**, 152–162 (2005).
58. Zelenay, S. *et al.* Foxp3⁺ CD25[–] CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***102**, 4091–4096 (2005).
59. Bluestone, J. A. & Abbas, A. K. Opinion-Regulatory Lymphocytes: Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.***3**, 253–257 (2003).
60. Collison, L. W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature***450**, 566–569 (2007).
61. Nakamura, K., Kitani, A. & Strober, W. Cell Contact–Dependent Immunosuppression by Cd4⁺Cd25⁺Regulatory T Cells Is Mediated by Cell

- Surface–Bound Transforming Growth Factor β . *J. Exp. Med.***194**, 629–644 (2001).
62. Ghiringhelli, F. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor– β –dependent manner. *J. Exp. Med.***202**, 1075–1085 (2005).
63. de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H. & Scheffold, A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.***34**, 2480–2488 (2004).
64. Busse, D. *et al.* Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***107**, 3058–3063 (2010).
65. Mellor, A. L. & Munn, D. H. Ido expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.***4**, 762–774 (2004).
66. Grossman, W. J. *et al.* Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death. *Immunity***21**, 589–601 (2004).
67. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.***204**, 1257–1265 (2007).
68. Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P. H. Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Front. Immunol.***3**, (2012).
69. Jaffer, S. & Bleiweiss, I. J. Beyond hematoxylin and eosin--the role of immunohistochemistry in surgical pathology. *Cancer Invest.***22**, 445–465 (2004).
70. MonoclonalAntibodies, N. R. C. (US) C. on M. of P. *Generation of Hybridomas: Permanent Cell Lines Secreting Monoclonal Antibodies*. (National Academies Press (US), 1999).
71. Lyon, H. *Theory and Strategy in Histochemistry: A Guide to the Selection and Understanding of Techniques*. (Springer Science & Business Media, 2012).

72. Mulisch, M. & Welsch, U. *Romeis - Mikroskopische Technik*. (Springer-Verlag, 2015).
73. Detection Methods | Applications & Technologies | Bio-Rad. Available at: <http://www.bio-rad.com/en-dk/applications-technologies/detection-methods>. (Accessed: 26th February 2017)
74. Halama, N. *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.***71**, 5670–5677 (2011).
75. Galon, J. *et al.* Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J. Pathol.***232**, 199–209 (2014).
76. Mizukami, Y. *et al.* Localisation pattern of Foxp3+ regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer. *Br. J. Cancer***98**, 148–153 (2008).
77. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer***12**, 298–306 (2012).
78. Woo, E. Y. *et al.* Regulatory CD4+CD25+ T Cells in Tumors from Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer and Late-Stage Ovarian Cancer. *Cancer Res.***61**, 4766–4772 (2001).
79. Liyanage, U. K. *et al.* Prevalence of Regulatory T Cells Is Increased in Peripheral Blood and Tumor Microenvironment of Patients with Pancreas or Breast Adenocarcinoma. *J. Immunol.***169**, 2756–2761 (2002).
80. Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T. & Hirohashi, S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***12**, 5423–5434 (2006).

81. Curiel, T. J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.***10**, 942–949 (2004).
82. Ghiringhelli, F. *et al.* Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.***202**, 919–929 (2005).
83. Nummer, D. *et al.* Role of Tumor Endothelium in CD4 + CD25 + Regulatory T Cell Infiltration of Human Pancreatic Carcinoma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.***99**, 1188–1199 (2007).
84. Nishikawa, H. *et al.* Accelerated chemically induced tumor development mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells in wild-type hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***102**, 9253–9257 (2005).
85. Ino, Y. *et al.* Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br. J. Cancer***108**, 914–923 (2013).
86. Gao, Q. *et al.* Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.***25**, 2586–2593 (2007).
87. Bates, G. J. *et al.* Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.***24**, 5373–5380 (2006).
88. Jordanova, E. S. *et al.* Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***14**, 2028–2035 (2008).
89. Salama, P. *et al.* Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.***27**, 186–192 (2009).

90. Fukunaga, A. *et al.* CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas***28**, e26-31 (2004).
91. Strouch, M. J. *et al.* Crosstalk between mast cells and pancreatic cancer cells contributes to pancreatic tumor progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.***16**, 2257–2265 (2010).
92. Cai, S.-W. *et al.* Prognostic significance of mast cell count following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Surgery***149**, 576–584 (2011).
93. Liu, F. *et al.* Peritumoral FOXP3⁺ regulatory T cell is sensitive to chemotherapy while intratumoral FOXP3⁺ regulatory T cell is prognostic predictor of breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.***135**, 459–467 (2012).
94. Li, J. F. *et al.* The prognostic value of peritumoral regulatory T cells and its correlation with intratumoral cyclooxygenase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int.***103**, 399–405 (2009).
95. Jiang, Y. *et al.* FOXP3+ lymphocyte density in pancreatic cancer correlates with lymph node metastasis. *PLoS One***9**, e106741 (2014).
96. Ikemoto, T. *et al.* Clinical roles of increased populations of Foxp3+CD4+ T cells in peripheral blood from advanced pancreatic cancer patients. *Pancreas***33**, 386–390 (2006).
97. Hinz, S. *et al.* Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res.***67**, 8344–8350 (2007).
98. Ebert, L. M. *et al.* The Regulatory T Cell–Associated Transcription Factor FoxP3 Is Expressed by Tumor Cells. *Cancer Res.***68**, 3001–3009 (2008).
99. Curiel, T. J. Regulatory T-cell development: is Foxp3 the decider? *Nat. Med.***13**, 250–253 (2007).

100. van der Burg, S. H. *et al.* Harmonization of immune biomarker assays for clinical studies. *Sci. Transl. Med.***3**, 108ps44 (2011).
101. Buckner, J. H. & Ziegler, S. F. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res. Ther.***6**, 215–222 (2004).
102. Pagès, F. *et al.* In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.***27**, 5944–5951 (2009).
103. Mitchell, D. A. & Nair, S. K. RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *J. Clin. Invest.***106**, 1065–1069 (2000).
104. Rosenberg, S. A. & Mulé, J. J. Immunotherapy of cancer with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Surgery***98**, 437–444 (1985).
105. Kimura, Y. *et al.* Clinical and immunologic evaluation of dendritic cell-based immunotherapy in combination with gemcitabine and/or S-1 in patients with advanced pancreatic carcinoma. *Pancreas***41**, 195–205 (2012).
106. Ghiringhelli, F. *et al.* Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother. CII***56**, 641–648 (2007).
107. Dannull, J. *et al.* Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.***115**, 3623–3633 (2005).
108. Bour-Jordan, H. & Blueston, J. A. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J. Clin. Immunol.***22**, 1–7 (2002).
109. Eggermont, A. M. M. *et al.* Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.***16**, 522–530 (2015).

110. Royal, R. E. *et al.* Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997**33**, 828–833 (2010).
111. Le, D. T. *et al.* Evaluation of Ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997**36**, 382–389 (2013).

7 Anhänge

7.1 Patientenkollektiv: Übersicht

Nr.	H-Nr.		Alter ¹	Überleben ²	N-Status	Grading	Erstrezidiv	FOXP3 gesamt ³	intra. ⁴	% ⁵	PCa ⁶
1	08-10174	m	69	4,1	N1	G3	Lebermetastasen	28,67	12,33	43	-
2	08-11712	w	64	8,3	N1	G2	Lebermetastasen	41,67	15,33	37	-
3	08-13802	m	58	7,2	N1	G1	Knochenmetastasen	30,67	18,33	60	-
4	08-16222	w	74	18,6	pN0	G2	Lebermetastasen	keine IHC			
5	08-16357	m	59	62,0	N1	G2	Lungenmetastasen	18,33	8,00	44	+
6	08-16622	m	71	17,6	N1	G2	Lokalrezidiv	22,00	8,33	38	-
7	08-17012	m	60	22,7	N1	G3	Lebermetastasen	keine IHC			
8	08-4148	m	70	16,5	N1	G2	Peritonealkarzinose	38,00	21,33	56	-
9	08-5568	m	57	92,0+	N1	G3	Lungenmetastasen	24,67	11,00	45	+
10	08-7996	m	72	0++	pN0	G2	nein	13,33	10,00	75	+
11	08-8096	w	60	17,6	N1	G3	Lebermetastasen	44,67	11,67	26	+
12	08-9763	w	64	47,5	pN0	G3	Lungenmetastasen	12,67	6,67	53	-
13	09-14455	m	63	8,3	N1	G2	Lungenmetastasen	17,00	9,00	53	+
14	09-17538	m	53	9,3	pN0	G3	Lebermetastasen	26,33	15,67	59	+
15	09-2416	m	68	23,8	N1	G1	Malig. Pleuraerguss	25,33	7,33	29	+
16	09-4954	w	68	18,6	N1	G3	Lebermetastase	44,33	29,33	66	+
17	09-5096	m	57	8,3	N1	G2	Lebermetastasen	20,00	7,67	38	+
18	09-6188	m	68	42,4	pN0	G2	Lebermetastasen	11,00	4,33	39	+
19	09-8783	m	67	7,2	pN0	G2	Knochenmetastasen	18,33	9,67	53	+
20	09-9337	m	49	77,8+	N1	G2	nein	19,33	4,67	24	-
21	10-10669	m	48	16,5	N1	G1	Lymphknoten	8,67	4,00	46	-
22	10-12427	w	68	22,7	N1	G2	Lokalrezidiv	14,33	3,00	21	+
23	10-12673	m	69	59,9	N1	G1	Lungenmetastasen	39,00	9,00	23	-
24	10-16809	m	77	61,2+	pN0	G2	nein	8,33	2,00	24	-
25	10-17022	w	74	32,0	N1	G2	Lokalrezidiv	14,67	3,67	25	+
26	10-3280	w	71	50,6	pN0	G2	Peritonealkarzinose	11,67	5,67	49	-
27	10-4980	w	61	13,4	N1	G3	Lebermetastasen	39,67	18,33	46	-
28	11-15025	w	71	17,6	N1	G2	Lebermetastasen	7,00	2,33	33	+
29	11-15585	m	71	18,6	pN0	G2	nein	36,00	16,33	45	-
30	11-17198	w	46	26,9	N1	G3	Lokalrezidiv	21,67	8,00	37	-
31	11-18267	w	55	47,5+	pN0	G2	Mesenterialwurzel	20,67	10,67	52	-
32	11-3357	w	77	57,3+	pN0	G2	nein	29,67	16,67	56	-
33	11-3977	m	65	56,9+	N1	G2	nein	24,67	13,00	53	-
34	11-5059	m	64	33,1	pN0	G2	Truncus coeliacus	16,00	7,00	44	-
35	11-5697	w	54	19,6	N1	G2	Lokalrezidiv	20,33	4,33	21	-
36	12-11324	m	77	40,0+	pN0	G3	nein	24,00	12,67	53	-
37	12-11645	m	63	39,8+	pN0	G2	nein	22,33	8,67	39	+
38	12-12907	m	79	13,4	N1	G3	Lebermetastasen	26,33	15,00	57	+
39	12-15930	m	70	36,9+	pN0	G2	Mesenterialwurzel	27,00	11,00	41	-
40	12-16055	w	73	7,2	pN0	G3	Peritonealkarzinose	39,00	7,33	19	-
41	12-16966	m	67	31,0	N1	G2	Lokalrezidiv	14,33	7,33	51	-
42	12-17028	w	72	36,2+	N1	G2	nein	3,33	1,00	30	-
43	12-17198	m	80	36,1+	pN0	GX	nein	keine IHC			
44	12-8702	w	70	24,8	N1	G2	Lebermetastasen	4,00	1,67	42	-
45	13-10084	w	81	24,8	pN0	G1	Lebermetastasen	22,33	10,00	45	+
46	13-11059	m	73	27,8+	N1	G1	nein	39,33	4,67	12	-

47	13-11682	m	82	27,5+	pN0	G3	nein	24,67	6,67	27	+
48	13-12975	w	71	26,7+	N1	G2	nein	42,67	26,33	62	+
49	13-13284	m	54	26,5+	N1	G2	Lokalrezidiv	42,33	7,00	17	+
50	13-1429	w	83	34,5+	pN0	G2	Lokalrezidiv	16,67	2,67	16	+
51	13-14514	w	77	16,5	pN0	G3	Lebermetastasen	65,67	14,67	22	-
52	13-15641	w	49	24,9+	N1	G3	nein	40,67	13,00	32	+
53	13-16173	m	74	6,2	N1	G2	Peritonealkarzinose	26,00	11,67	45	-
54	13-16175	w	66	24,6+	pN0	G2	nein	36,67	10,33	28	+
55	13-16176	m	65	24,6+	N1	G2	Lungenmetastasen	14,33	6,00	42	-
56	13-16719	m	76	24,2+	pN0	G3	nein	15,00	9,00	60	+
57	13-17065	m	46	9,3	pN0	G3	Peritonealkarzinose	33,00	14,00	42	+
58	13-743	w	66	34,1	pN0	G2	Peritonealkarzinose	27,33	13,67	50	-
59	13-7750	m	70	25,8	pN0	G2	Lokalrezidiv	11,67	7,00	60	-
60	13-7867	w	61	30,2+	pN0	G3	nein	16,00	3,33	21	+
61	13-7891	w	65	30,1+	pN0	G2	nein	40,33	6,67	17	+
62	13-886	m	73	34,9+	pN0	G1	nein	12,33	5,67	46	+
63	13-9622	w	79	29,0+	N1	G2	Lebermetastasen	52,00	11,00	21	+
64	14-10340	m	78	1,0	N1	G1	nein	31,67	9,67	31	-
65	14-10444	w	80	8,3	N1	G2	Lebermetastasen	26,67	9,67	36	-
66	14-10898	w	84	20,4+	N1	G2	nein	18,00	14,00	78	-
67	14-11909	w	70	6,2	N1	G2	Lebermetastasen	36,00	13,00	36	-
68	14-12140	m	76	9,3	N1	G3	Peritonealkarzinose	38,33	4,67	12	-
69	14-14579	w	38	13,8+	N1	G1	nein	62,00	16,67	27	-
70	14-2106	w	60	22,1+	N1	G2	nein	75,33	20,67	27	+
71	14-3492	m	80	21,2+	N1	G3	Hirnmetastasen	47,67	3,00	6	+
72	14-3860	m	81	20,9+	pN0	G2	nein	24,00	10,67	44	+
73	14-4859	m	69	9,3	pN0	G2	nein	13,00	3,67	28	+
74	14-5019	m	74	20,3+	pN0	G2	nein	10,00	2,00	20	-
75	14-5726	m	76	19,7+	N1	G1	nein	21,33	10,67	50	-
76	14-5914	w	75	19,6+	pN0	G2	nein	14,67	3,67	25	-
77	14-6644	w	80	19,1+	N1	G2	Lokalrezidiv	50,67	16,33	32	+
78	14-752	m	75	15,5	N1	G3	Lokalrezidiv	keine IHC			
79	14-7613	w	74	3,1	N1	G2	nein	8,67	4,33	50	-
80	14-8419	w	74	5,2	pN0	GX	nein	8,33	4,00	48	-
81	14-8762	m	48	17,7+	N1	G1	AMS	16,00	7,33	46	-
82	14-9310	m	59	0++	N1	G2	nein	11,00	7,67	70	-
83	14-9559	w	68	17,1+	pN0	G2	nein	23,33	3,67	16	+

1. Alter des Patienten In Jahren zum OP-Zeitpunkt
2. postoperatives Überleben in Monaten,
+ bis zum Studienende am 15.12.2015 überlebt, ++ <7d postoperativ verstorben
3. Mittelwert aller Treg aus 3 HPF
4. Mittelwert aller intratumoral gelegenen Treg aus 3 HPF
5. Prozentsatz aller intratumoral gelegenen Treg (intratumoral/gesamt)
6. pos./neg. FOXP3 Nachweis in Pankreaskarzinomzellen

7.2 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Frau Prof. Dr. med. C. Bruns und ihres Nachfolgers Herr Prof. Dr. med. R. Croner für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Allgemein-/Viszeral- und Tumorchirurgie der OvG-Universität Magdeburg durchführen zu können.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Henry Ptok für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Auch dem Institut für Pathologie der OvGU Magdeburg bedanke ich mich für die Bereitstellung des fixierten und eingebetteten Gewebes sowie die umfangreiche Unterstützung des immunhistochemischen Färbeprozesses.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kalinski danke ich für die ausgiebige und lehrreiche Unterstützung bei der histopathologischen Auswertung der Präparate.

Weiterhin möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. med. Felix Popp bedanken, der mir während des gesamten Zeitraumes mit seiner klinischen und wissenschaftlichen Expertise stets hilfreich zur Seite stand.

7.3 Eidesstattliche Erklärung

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

„FOXP3 als prognostischer Marker beim chirurgisch therapierten Pankreaskarzinom–Eine retrospektive Analyse unter Einbeziehung der Immunhistochemie“

im Zentrum für Allgemein- und Viszeralchirurgie,

mit Unterstützung durch Prof. Dr. Henry Ptok,

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 01.04.2018

Unterschrift

7.4 Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.